



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN  
GENÉTICA PARA PLANTAS

Tesis para obtener el título de  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Esli Romero Mastranzo

Director

Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes

Codirector

Dra. Etelvina Gándara Zamorano

AGOSTO, 2020



## AGRADECIMIENTOS

## DEDICATORIA

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA .....	2
ÍNDICE .....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES .....	12
1. Historia de los plásmidos.....	12
2. Los plásmidos .....	16
2.1 Generalidades.....	17
2.2 Clasificación.....	18
2.3 Modificaciones sobre los plásmidos.....	19
3. Métodos de clonación .....	20
3.1 Clonación usando enzimas de restricción.....	20
3.2 Clonación T-A (Timina- Adenina).....	21
3.3 Clonación G-C (Guanina - Citosina).....	21
3.4 Clonación TOPO .....	21
3.5 Clonación Gateway .....	22
3.6 CCDB tóxico clave en la clonación eficiente .....	23
3.7 Clonación Golden Gate.....	23
3.8 Clonación independiente de secuencia y ligación SLIC.....	24

3.9 Clonación Gibson.....	25
4. <i>Agrobacterium</i> y el plásmido Ti.....	26
4.1 Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	37
Aplicaciones y casos de éxito en el uso de plásmidos .....	38
JUSTIFICACIÓN .....	39
HIPOTESIS .....	43
OBJETIVOS .....	43
General .....	43
ESPECÍFICOS .....	43
MATERIALES Y METODOS .....	44
Síntesis de ADN complementario (cDNA) mediante transcripción reversa (RT)...	44
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. ....	45
Extracción de plásmido mediante lisis alcalina.....	45
Preparación de células competentes .....	46
Transformación bacteriana por choque térmico .....	46
Purificación de banda en gel de electroforesis .....	47
Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	47
Ligación de fragmentos de ADN en vectores purificados.....	47
Agroinfiltración.....	47
Reactivos.....	48
RESULTADOS .....	50
Diseño <i>in silico</i> de plásmido de expresión para plantas .....	50
Primera modificación al plásmido pEarleyGate101 .....	52
Inserción del gen reportero mCherry.....	55
Cambio del gen de resistencia a antibiótico a espectinomicina.....	58
Transformación en <i>A. tumefaciens</i> para agroinfiltración de <i>Nicotiana tabacum</i> y validación de la expresión de mCherry. ....	66

Fusión transcripcional de mCherry y el gen NIa del Virus del Jaspeo del Jabaco	71
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	78
Eliminación ccdB e integración de mCherry .....	78
Cambio de resistencia a antibiótico .....	80
Prueba de la estabilidad, funcionalidad y viabilidad del vector binario generado ..	80
Fusión transcripcional mCherry-NIaTEV .....	85
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vectores binarios de T-DNA de <i>Agrobacterium</i> .....	32
Tabla 2. Cepas de <i>Agrobacterium</i> de uso frecuente .....	37
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de mCherry y SmR .....	44
Tabla 4. Enzimas usadas en este trabajo.....	48
Tabla 5. Enzimas de restricción usadas en este trabajo, se describe el sitio de corte .....	48
Tabla 6. Plásmidos usados en este trabajo .....	49
Tabla 7. Antibióticos usados en este trabajo .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de vectores modulares.....	15
Figura 2. Línea de tiempo que muestra los avances más relevantes del diseño de vectores plasmídicos desde 1970 hasta 2018. ....	16
Figura 3. Arquitectura y categorías de los vectores plasmídicos más comunes.....	19
Figura 4. Clonación mediada por enzimas de restricción .....	20
Figura 5. Principales métodos de clonación .....	26
Figura 6. Estructura del plásmido Ti .....	28

Figura 7. Diagrama esquemático de sistemas de co-integración/intercambio y sistemas de vectores binarios de T-DNA para introducir genes en plantas utilizando la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	31
Figura 8. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT) .....	38
Figura 9. Representación del plásmido pEarleyGate 101.....	51
Figura 10. Eliminación de <i>ccdB</i> , cambio de resistencia a antibiótico a espectinomicina y adición de mCherry (pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec) .....	52
Figura 11. Digestión del plásmido pEarleyGate 101 con la enzima XhoI .....	53
Figura 12. A) Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con el plásmido pEarleyGate 101 modificado al que se le escindió el fragmento con el gen <i>ccdB</i> de muerte . B) Electroforesis de los plásmidos extraídos de colonias candidatas a portar el vector pEarleyGate 101 modificado (pEG-s/ <i>ccdB</i> ) .....	54
Figura 13. Esquema del plásmido pEG-s/ <i>ccdB</i> producido in silico.....	55
Figura 14. Digestión pEG-s/ <i>ccdB</i> con EcoRI .....	55
Figura 15. Aislamiento de mCherry .....	56
Figura 16. Sitio múltiple de clonación del vector pEG-s/ <i>ccdB</i> in silico.....	57
Figura 17. Linearización de pEG-s/ <i>ccdB</i> con BamHI y XbaI y purificación de banda .....	58
Figura 18. Transformación y selección de pEG-s/ <i>ccdB</i> con mCherry .....	58
Figura 19. Diagrama de los vectores A) pEG-s/ <i>ccdB</i> y B) pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry.....	59
Figura 20. Plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry .....	60
Figura 21. Digestión de pHDE-35S-Cas9-mCherry, pEG-s/ <i>ccdB</i> , pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry y purificación de banda .....	61
Figura 22. pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec y pEG-s/ <i>ccdB</i> -spec en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	62
Figura 23. Plásmidos extraídos de colonias candidatas seleccionadas .....	63
Figura 24. Esquema de los plásmidos pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec y pEG-s/ <i>ccdB</i> -spec .....	64
Figura 25. Digestión enzimática con NdeI de los plásmidos pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec y pEG-s/ <i>ccdB</i> -spec y PCR de los plásmidos pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec.....	65
Figura 26. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con los plásmidos pEG-s/ <i>ccdB</i> -spec (A) y pEG-s/ <i>ccdB</i> -mCherry-spec (B).....	66
Figura 27. Colony PCR para amplificar mCherry a partir de colonias de <i>A. tumefaciens</i> . .....	67

Figura 28. Visualización en con luz UV de hojas de <i>N. tabacum</i> transformadas por agroinfiltración con el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec .....	68
Figura 29. ARN total de hojas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec.....	69
Figura 30. PCR de ADNc de ARN extraído de hojas de <i>N. tabacum</i> .....	70
Figura 31. PCR para mCherry .....	71
Figura 32 A) Plásmidos pJet-TEV 1 y 2. B) Digestión de los plásmidos pJet-TEV 1 y 2 con la enzima BglII se observa un fragmento de 1312 pb; 3: control negativo plásmido pJet-TEV sin digerir. ....	72
Figura 33. PCR punto final para mCherry y NiaTEV .....	73
Figura 34. Estandarización de la PCR para amplificar el fragmento mCherry-NlaTEV. ....	74
Figura 35. PCR mCherry-NlaTEV con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.....	75
Figura 36. Transformación y plásmidos pJet-mCherry-NlaTEV. ....	76
Figura 37. Visualización in silico del fragmento mCherry-NlaTEV ligado al vector pJet1.2 .....	77
Figura 38. Digestión de pJet-mCherry-TEV con enzimas de restricción.....	77
Figura 39. PCR y digestión con BamHI de mCherry-NlaTEV.....	78
Figura 40. Esquemas generados in silico de los plásmidos obtenidos experimentalmente a partir de pEarleyGate 101.....	82
Figura 41. Sitio XbaI presente en el extremo 3' de mCherry posiblemente bloqueadas por metilación Dam .....	83
Figura 42. Fragmento de 2826 pb clonado para cambiar resistencia a espectinomicina .....	84

## ABREVIATURAS

**µg:** microgramo.

**µL:** microlitro.

**A:** Adenina.

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ATM:** transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation).

**C:** Citosina.

**DAM:** Metiltransferasa de ADN adenina (DNA adenine methyltransferase).

**DCM:** Metiltransferasa de ADN citosina (DNA cytosine methyltransferase).

**G:** Guanina.

**Kb:** Kilopares de bases.

**LB:** Borde izquierdo (left border).

**M:** Molar.

**MCS:** Sitio múltiple de clonación (multicloning site).

**OCS:** Octopina sintasa.

**Ori:** Origen de replicación.

**Pb:** Pares de bases.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

**pEG-s/ccdB:** pEarleyGate 101 sin caset de muerte.

**pEG-s/ccdB-mCherry:** pEarleyGate 101 sin caset de muerte y con mCherry.

**pEG-s/ccdB-mCherry-spec:** pEarleyGate 101 sin caset de muerte, con mCherry y resistencia a espectinomicina.

**pEG-s/ccdB-spec:** pEarleyGate101 sin caset de muerte y con resistencia a espectinomicina.

**RB:** Borde derecho (right border).

**Ri:** inductor de raíz (root inducing).

**SEVA:** Arquitectura europea estándar de vectores (Standard European Vector Architecture).

**SLIC:** Clonación independiente de secuencia y ligación (Sequence and Ligation Independent Cloning).

**T:** Timina.

**Taq:** *Thermus aquaticus*.

**T-DNA:** ADN de transferencia.

**TEV:** Virus del Jaspeado del tabaco (*Tobacco Etch Virus*)

**Ti:** Inductor de tumores (tumor inducing).

**Tm:** Temperatura de fusión.

**YFP:** Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein).

## RESUMEN

La clonación de genes dentro de vectores plasmídicos es de gran importancia para el estudio de su función. A pesar de existir una gran variedad de variedad de vectores plasmídicos que son ampliamente utilizados para la investigación o en la industria, no siempre se encuentran al alcance de toda la comunidad científica o los costos de los insumos para emplearlos pueden ser elevados, lo que representa una limitante en el desarrollo fluido de la tecnología. En este trabajo se aborda la modificación del vector de clonación Gateway pEarleyGate101 para la expresión de proteínas recombinantes en plantas mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas. Las modificaciones que se realizaron fueron: 1) La supresión de la región Gateway del que contiene el gen de toxicidad *ccdB* para 2) poder propagar el plásmido en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 3) la inserción del gen reportero mCherry, 4) el cambio de resistencia al antibiótico kanamicina por espectinomicina, estas modificaciones permitieron generar 4 nuevos plásmidos: pEG-s/*ccdB*, pEG-s/*ccdB*-spec, pEG-s/*ccdB*-mCherry y pEG-s/*ccdB*-mCherry-spec. La expresión del gen reportero mCherry en plantas de *N. tabacum* se llevó a cabo mediante la agroinfiltración del plásmido pEG-s/*ccdB*-mCherry-spec, aunque es necesario corroborar la presencia de la proteína, se evidenció la expresión de mCherry a nivel de ARN. Como parte de la investigación realizada en el laboratorio 401 de Cultivos Vegetales del edificio EMA6 sobre la generación de una plataforma para el control de Potyvirus y otros virus de RNA que afectan plantas, se generó la fusión transcripcional del gen reportero mCherry con el gen *NIa* del Virus del Jaspeo del Tabaco, la fusión fue clonada en el plásmido vector pJet1.2 para ser integrada en alguno de los plásmidos generados y ser usada en estudios posteriores en planta.

## INTRODUCCIÓN

La Biotecnología ha existido desde el momento en el que el hombre descubrió la agricultura, comenzando por la selección artificial de animales y plantas, para la obtención de alimentos tales como carne, leche, vegetales, semillas, frutos y alimentos fermentados, además de la domesticación de animales para trabajo entre otros beneficios; el término Biotecnología fue acuñado por primera vez por el ingeniero húngaro Károly Ereki en su libro *Biotechnology of Meat, Fat and Milk Production in an Agricultural Large-Scale Farm* (Badal McCreath y Rupika, 2017), y fue hasta 1992 en el Convenio sobre Diversidad Biológica, cuando se dio a conocer un concepto más formal e internacional de la Biotecnología, el cual la define como “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos para usos específicos”.

El código genético se ha convertido en uno de los temas centrales de estudio de la biotecnología moderna y las ciencias de la vida, pues se considera un sofisticado lenguaje molecular utilizado por las células para producir sus proteínas, las cuales cumplen con diversas funciones para mantener la vida, y darles características especiales y/o distintivas (Mukai, Lajoie, Englert, y Söll, 2017). Aunque dicho lenguaje difiere entre organismos, la naturaleza del ADN está bien definida y se conserva para todos estos. La decodificación de la información almacenada en el ADN en forma de genes permite la expresión de este lenguaje, que a su vez está controlada por programas transcripcionales que permiten la expresión génica de manera precisa. Es decir, los genes están gobernados por una red de secuencias reguladoras próximas o remotas y múltiples eventos y maquinarias moleculares complejas (Danino, Even, Ideses, y Juven-Gershon, 2015). Dando lugar a la síntesis del mensajero molecular que llamamos ARN, dicho mensaje es traducido por los ribosomas para dar lugar a las proteínas.

Conocer y entender el dinamismo y flujo de la información genética nos permite crear tecnologías y herramientas moleculares sofisticadas y precisas, permitiendo aislar, copiar, insertar y borrar secuencias nucleotídicas, conocer la lectura de genomas de manera parcial o total, atenuar o potenciar la expresión génica, manipular e incluso editar de manera puntual el ADN aún dentro de la célula (Thurtle-Schmidt y Lo, 2018). La manipulación del material genético es de gran importancia para las industrias: farmacéutica, alimenticia, de polímeros, agricultura, ganadera, energética entre otras

dando lugar no solo al desarrollo tecnológico, sino también a la generación de conocimiento, esto gracias a técnicas como la edición puntual y la clonación molecular (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2018; Martien y Amador-Noguez, 2017; Nikoleli, Nikolelis, Siontorou, Karapetis, y Varzakas, 2018; Raman, 2017).

Actualmente, la clonación molecular para la manipulación del ADN se ha vuelto más sencilla gracias a la creación de sofisticadas herramientas moleculares y sus aplicaciones que han aumentado de forma exponencial, y que han hecho mucho más sencilla y versátil la clonación de ADN (Ashwini, Murugan, Balamurugan, y Sathishkumar, 2016). La clonación molecular no sería posible sin el desarrollo de vectores plasmídicos los cuales se utilizan como vehículos moleculares capaces de almacenar y transportar información genética a un organismo receptor, gracias a esto se ha comprendido de mejor manera la función de los genes y se ha podido emular o copiar de forma sintética lo que las células hacen canónicamente y trasladarlo a otros hospederos es decir, hacer que un organismo adquiera información genética y la exprese, ya que la mayoría de las veces es imposible, poco rentable o muy lento hacerlo en los hospederos originales; esta revolución biotecnológica ha sido una puerta de entrada a un sin fin de aplicaciones en todos los campos de las ciencias de la vida acelerando por ejemplo, el progreso de la generación de vectores para terapia génica, producción de proteínas recombinantes y producción de vacunas (Ashwini, *et al.*, 2016), Sin embargo, el desarrollo de plantas y cultivos mejorados se ha presentado como un área de oportunidad para la manipulación genética frente a los nuevos desafíos que enfrenta la sociedad, tales como el cambio climático, aparición de plagas resistentes, alta demanda y calidad de los alimentos ante el crecimiento exponencial de la población.

Existe una gran gama de plásmidos que poseen diferentes características y propósitos de uso, ya sea para guardar y conocer información genética, expresar proteínas o estudiar interacciones entre proteínas y su función (Nora *et al.*, 2019), dentro de dichos plásmidos se encuentran aquellos que funcionan como vectores para plantas desarrollados a partir del plásmido Ti nativo de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, estos se caracterizan por tener un segmento llamado “ADN de transferencia” (T-DNA por transfer DNA) utilizada por *Agrobacterium* para inducir en plantas el síntoma de agalla de la corona debido a la presencia de genes que codifican factores de crecimiento, a su vez el T-DNA está flanqueado por pequeñas secuencias conocidas

como borde izquierdo y borde derecho que son reconocidas por la maquinaria de transferencia del T-DNA modificaciones, que se explicarán más adelante, en la región del T-DNA son características de los vectores usado para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de plantas (Bahramnejad, Naji, Bose, y Jha, 2019).

A pesar de que los vectores son ampliamente utilizados en la investigación o en la industria, no siempre se encuentran al alcance de toda la comunidad científica, esto representa una limitante en el desarrollo fluido de la tecnología. El propósito de este trabajo fue diseñar y generar vectores de expresión genética para plantas a partir de la modificación del vector pEarleyGate 101 para inducir la expresión de proteínas recombinantes en plantas, creando una tecnología igual de eficiente a un menor costo.

## ATECEDENTES

### 1. Historia de los plásmidos

En las décadas de 1940 y 1950 científicos como Leonard Huskins, Ernst Caspari, GW Beadle entre otros estudiaban los factores citoplasmáticos que podían transferirse entre células (hoy conocidos como plásmidos), en ese momento se creía que estos agentes extra nucleares eran orgánulos, genes individuales, parásitos (virus) o simbiosis. No fue hasta 1952 que Joshua Lederberg aclaró la clasificación de estos factores citoplasmáticos de la herencia y propuso el término "plasmid" (plásmido es español) derivado de la palabra "citoplasma" y de la palabra "id" (latín para "it") para referirse de forma genérica a cualquier determinante hereditario extracromosomal (Lederberg, 1952). En los años 70 la palabra plásmido ganó popularidad entre la comunidad científica ya que el término aprobado por la comunidad en ese momento era "episoma" propuesto por Élie Jacob y François Wollman (Addgene, 2017), definido como "un elemento genético no esencial que podría existir de forma autónoma o integrada en el cromosoma".

Antes de la utilización de plásmidos como herramienta molecular, el bacteriófago lambda era empleado por los biólogos moleculares que estudiaban la genética bacteriana. En 1973 un pequeño grupo de Científicos, entre ellos Stanley Falkow, Stanley Cohen, Herbert Boyer y Charles Brinton idearon utilizar la enzima EcoRI recién descubierta y su sitio de corte predecible para desarrollar el primer experimento de clonación en un plásmido (Cohen, Chang, Boyer, y Helling, 1973). Cohen y sus colegas manipularon con la enzima EcoRI el plásmido pSC101 que confiere

resistencia a tetraciclina, desarrollando el plásmido pSC102 que induce resistencia a Kanamicina, al seleccionar colonias de *Escherichia coli* transformantes, estas fueron resistentes a ambos antibióticos. Al ser esto posible, pSC101 se volvió el primer vector plasmídico de clonación y fue un gran salto para la biología molecular.

Durante los siguientes años locus de diferentes especies bacterianas (eventualmente de mamíferos, plantas y otros organismos) fueron aislados y estudiados, entre ellos aquellos que contenían promotores, orígenes de replicación, genes de resistencia a antibióticos, estos fueron integrados en plásmidos para desarrollar nuevos vectores de clonación como el pBR322 (todavía en uso), uno de los primeros y más significativos vectores artificiales (Bolívar *et al.*, 1977). El plásmido pBR322 se construyó con fines de clonación general y es considerado uno de los vectores bacterianos más importantes, pues de él se han derivado más herramientas para muchas otras funciones, algunos de los cambios funcionales y estructurales que se han llevado a cabo incluyen la adición de nuevos sitios de corte por enzimas de restricción, cambios en el marcador de selección, aumento de la estabilidad y la capacidad para generar un alto número de copias, adición de péptido señal para facilitar la secreción de proteínas, y finalmente cambio en el origen de replicación para vectores lanzadera, permitiendo su propagación en diferentes hospederos (Nora *et al.*, 2019). Una de las series de plásmidos derivados del pBR322 son los pUC, principalmente compuestos por un promotor-operador lac, del operón de lactosa, además de requerir hospederos compatibles para la complementación de un sistema de detección que permite distinguir colonias transformantes por el desarrollo de color azul, proporcionando así una herramienta de selección positiva. De la misma forma en que los vectores de clonación se derivaron uno de otro, muchos vectores de expresión se derivaron de la serie pUC, como el mutante lacUV5 el cual contiene 2 mutaciones de pares de bases en el hexámero 10 del promotor *lac* clásico y el promotor híbrido tac (Nora, Westmann, Martins-Santana, *et al.*, 2019). Otras modificaciones sobre las regiones de los promotores/operadores incluyen el del operón de triptófano, direccionando hacia necesidades específicas en los sistemas de expresión de proteínas. En 1989 surge la serie de plásmidos pRS para levaduras, estos vectores, son de tamaño pequeño, de alrededor de 5kb, con varios sitios de restricción únicos, 4 marcadores de selección y como se basaban en el pBLUESCRIPT, las colonias transformantes de *E. coli* se podían seleccionar por color. Los vectores

pRS fueron un punto de partida para nuevos diseños y construcciones de vectores para levaduras (Sikorski y Hieter, 1989).

En 1998 se introduce el termino metagenómica por Handelsman que posteriormente se convirtió en una rama de las ciencias ómicas y permitió analizar genomas compuestos de comunidades microbianas y sus productos potenciales para nuevas aplicaciones Biotecnológicas, por lo que la cantidad de información genética problema para clonar dentro de un vector en cada experimento para la construcción de librerías metagenómicas resulta en insertos muy largos conocidos como cósmidos, los cuales son vectores capaces de almacenar insertos de ADN de 30-40 Kb que contienen sitios cos del fago lambda, usados como un método más eficiente para identificar operones completos y conjuntos de genes biosintéticos. Sin embargo, la falta de mecanismos de control en el número de copias generalmente disminuye la estabilidad de los cósmidos, por lo que se desarrollaron los fósmidos, vectores similares a los cósmidos con la diferencia de que ellos usan el factor F de *E. coli*, lo que hace el número de copias de los fósmidos altamente regulado a 1 o 2 copias en la célula y la replicación está restringida a *E. coli* este hecho pudo evitar la interferencia de toxicidad en pruebas metagenómicas, además los fósmidos son capaces de llevar insertos de ADN de 40-50 kb (Santana-Pereira y Liles, 2017). En 2004 el fósrido pCC1FOS fue utilizado en un estudio metagenómico donde se clonaron fragmentos de aproximadamente 40 kb del metagenómica de *Collimonas fungivorans* (Leveau, Gerards, De Boer, y Van Veen, 2004).

En los últimos años los avances en la clonación molecular, los métodos computacionales y la secuenciación automatizada de ADN han permitido superar el desafío del diseño de vectores. La generación de los vectores pZ en 1997 para el estudio de elementos reguladores en bacterias fue el inicio de la era de los vectores modulares en donde Lutz y Burjard introdujeron el término “modularidad” en vectores ampliamente usados en sistemas tecnológicos y organizacionales. Los sistemas de productos se consideran modulares, por ejemplo, cuando se pueden extraer y combinarse en una nueva variedad de configuraciones (Figura 1)

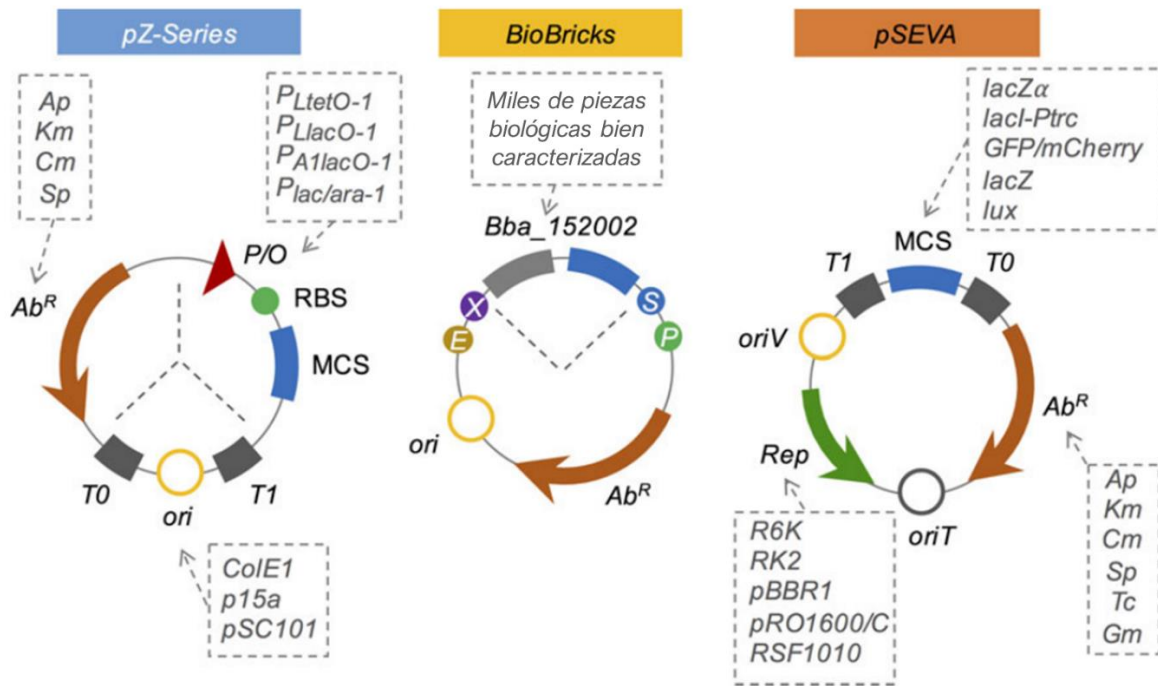


Figura 1. Generación de vectores modulares. Adaptada de “The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools” por Nora et al, 2019.

Los vectores pZ fueron organizados en tres módulos principales físicamente separados por sitios de restricción específicos: 1) módulo de resistencia a antibiótico, 2) módulo de origen de replicación y 3) módulo regulador de expresión transcripción. Por lo que cada parte del sistema podría cambiarse fácilmente por una variante funcional y combinarse para dar lugar a la generación de una amplia gama de vectores estables. El resultado de esto dio lugar a una biblioteca de vectores únicos compuestos por diferentes componentes, pero con la misma arquitectura y en donde el punto central de su creación era evaluar la eficiencia de los elementos transcripcionales (Nora et al., 2019). Esto dio paso al surgimiento de la plataforma BioBrick, que utiliza una configuración muy interactiva para ensamblar circuitos complejos mediante la unión de fragmentos de prefijo y sufijo utilizando solo cuatro enzimas de restricción (EcoRI, XbaI, SpeI y PstI). Esta plataforma se fusiona con una colección de miles de partes biológicas bien caracterizadas y es ampliamente utilizada por la comunidad IGEM (Knight, 2003).

Otro desarrollo fue el de los vectores modulares pSEVA. En la plataforma SEVA, se seleccionan los orígenes de replicación de amplio rango de hospedadores lo que permite la replicación de los plásmidos en múltiples bacterias Gram negativas, esto se combina con varios marcadores de resistencia a antibióticos y muchos sistemas

funcionales en los sitios de clonación múltiple (MCS). Otra característica exclusiva de esta plataforma es la existencia de un origen de transferencia (*oriT*) para permitir la movilización de los plásmidos a las bacterias objetivo mediante conjugación (Silva-Rocha *et al.*, 2013). En la Figura 2 se resumen los acontecimientos más importantes en la historia de los plásmidos.

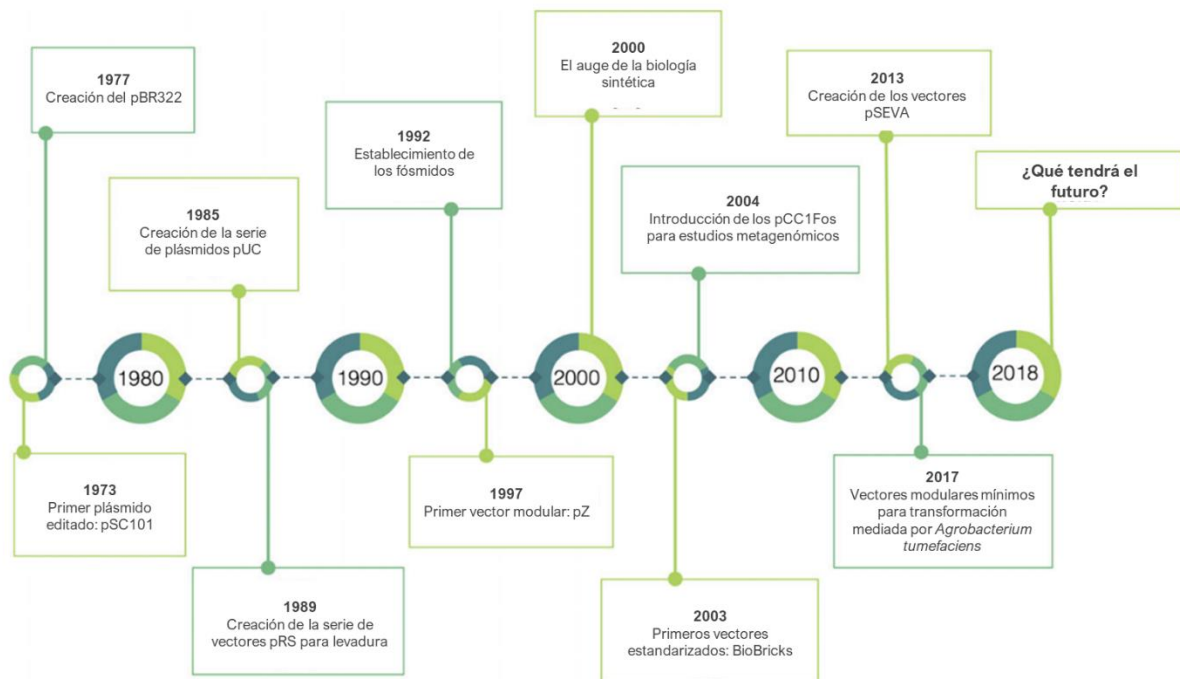


Figura 2. Línea de tiempo que muestra los avances más relevantes del diseño de vectores plasmídicos desde 1970 hasta 2018. Adaptada de Nora *et al.*, 2019.

A medida que surgen nuevas tecnologías y metodologías, los investigadores buscan herramientas moleculares más rápidas, mejoradas y fáciles de usar, dominar los principios y tecnologías del diseño de vectores se ha convertido en un desafío fundamental. Esto está haciendo espacio para el surgimiento de una disciplina completamente nueva llamada biología sintética. Este innovador campo de estudio combina partes y módulos biológicos para crear sistemas más confiables y robustos (Nora, Westmann, Martins-Santana, *et al.*, 2019). Los avances recientes en las técnicas de manipulación del ADN, como la síntesis, secuenciación y ensamblaje automatizados del ADN se han combinado con el marco de biología sintética, proporcionando nuevas perspectivas sobre el diseño y construcción de vectores.

## 2. Los plásmidos

La ingeniería genética también conocida como tecnología del ADN recombinante ha tomado como herramienta más importante a los vectores plasmídicos, tecnología que

continúa en expansión y experimentado adaptaciones. Los plásmidos han permitido varios descubrimientos importantes tanto en ciencia básica como aplicada, también han reforzado diferentes avances biotecnológicos.

Los plásmidos son vectores moleculares de ADN que se utilizan como medio de transporte, para entregar y manipular ADN extraño dentro de una célula huésped (Nora, Westmann, Martins-Santana, *et al.*, 2019). Su propagación se lleva a cabo en bacterias por lo que es necesario que contengan un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección que generalmente confiere resistencia a antibiótico. Aunado a lo anterior, la estabilidad estructural del plásmido en bacterias es un criterio necesario para la producción de ADN plasmídico. Los fragmentos de ADN que se integran dentro de los vectores plasmídicos también son parte importante del diseño final y funcional de estos, por lo que se prefiere el uso de técnicas que dependen de la recombinación homóloga o sitio específica para la integración de fragmentos grandes (>15 kb), mientras que la digestión de ADN por enzimas de restricción más ligación sigue siendo preferido para la clonación de fragmentos de pequeños y medianos (Tolmachov, 2009).

## 2.1 Generalidades

Los vectores plasmídicos deben tener características que los hacen adecuados para la transformación y selección en un organismo huésped, tres son cruciales en su arquitectura general. La primera componente es el origen de replicación (*ori*) que será reconocido por la maquinaria de replicación celular y que definirá el número de copias del plásmido, este puede ser reconocido por un organismo específico por lo que se les llama de hospedero estrecho, o bien puede ser reconocido por varias especies o géneros por lo que se les llama de amplio rango de hospedero, estos en particular codifican una proteína capaz de reconocer su propio origen de replicación dentro del plásmido (Durland, Toukdarian, Fang, y Helinski, 1990). El replicón estándar más utilizado en plásmidos artificiales es el origen de replicación tipo ColE1 del plásmido pMB1, que evolucionó a través de los plásmidos pBR322 y pUC8 / 9, este origen de replicación es multicopia por lo que asegura un alto rendimiento de ADN plasmídico que a menudo es lo más recomendable (Nora, Westmann, Martins-Santana, *et al.*, 2019).

El segundo componente es el marcador de selección, este puede ser cualquier gen que confiera una capacidad o ventaja selectiva de los transformantes positivos, desde la auxotrofia (dada por alguna enzima metabólica que falta en el genoma del huésped) hasta la resistencia a antibióticos (Gnügge y Rudolf, 2017). La resistencia a antibióticos dada por un plásmido es una efectiva herramienta para eliminar células que no incorporaron plásmidos en un evento de transformación.

El tercer componente característicos, es el MCS que permite la clonación de un fragmento de ADN deseado y que está caracterizado por poseer sitios reconocidos por diferentes enzimas de restricción.

## 2.2 Clasificación

Los vectores se han clasificado en tres clases típicas: vectores de clonación, vectores de expresión y vectores reporteros Figura 3. Arquitectura y categorías de los vectores plásmidicos más comunes. Se denota el MCS, origen de replicación; AbR resistencia a antibiótico; Gen para la replicación en diferentes hospederos; R regulador relacionado al promotor; P promotor; Ter secuencia terminadora de la transcripción; Reporter: gen reportero. Adaptada de Nora *et al*, 2019.. Los vectores de clonación se utilizan para hacer numerosas copias de un fragmento de ADN de interés manteniéndolo estable dentro de un organismo huésped (Rodríguez y Denthardt, 1987). Los vectores de expresión se utilizan para inducir la producción de proteínas de interés en grandes cantidades, para esto generalmente contienen un genes reguladores y promotores que controlan la expresión del gen que se desea expresar (Stanley y Luzio, 1984). Los vectores reporteros poseen también un promotor y un gen de interés para modular la expresión de una proteína que como su nombre lo indica, permite informar sobre la expresión del gen de interés pudiendo inducirse reacciones de fluorescencia, luminiscencia o actividad enzimática (Juers, Matthews, y Huber, 2012), estos vectores reporteros permiten el análisis *in vivo* de la cinética de la expresión génica durante el crecimiento de un organismo lo que permite estudios sofisticados incluso a nivel de una sola célula (Elowitz, Levine, Siggia, y Swain, 2002). También existen una serie de vectores llamados “vectores lanzadera” (Figura 3<sup>a</sup>) estos poseen dos orígenes de replicación diferentes y dos marcadores de selección diferentes para poder ser integrados en dos organismos distintos (Struhl, *et al.*, 1979).

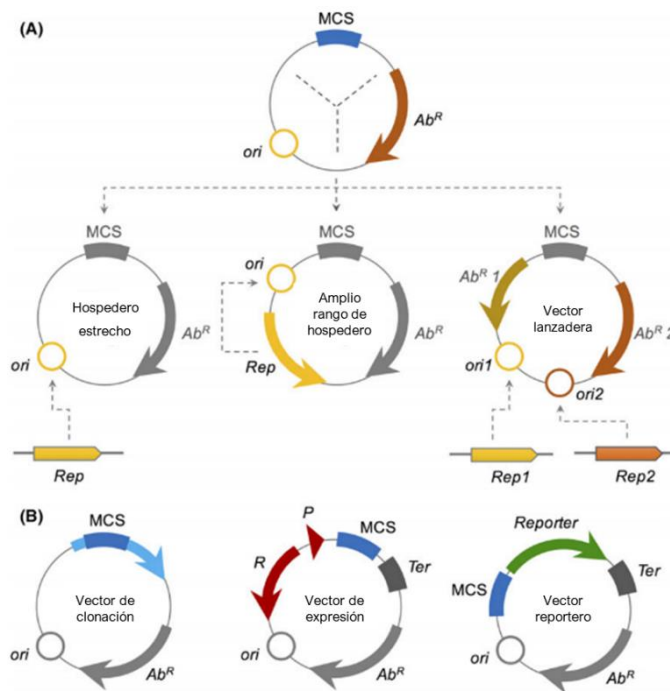


Figura 3. Arquitectura y categorías de los vectores plásmidicos más comunes. Se denota el MCS, origen de replicación;  $Ab^R$  resistencia a antibiótico; Gen para la replicación en diferentes hospederos;  $R$  regulador relacionado al promotor;  $P$  promotor;  $Ter$  secuencia terminadora de la transcripción;  $Reporter$ : gen reportero. Adaptada de Nora et al, 2019.

### 2.3 Modificaciones sobre los plásmidos

La clonación molecular se puede definir como “el aislamiento de una secuencia de ADN de cualquier especie y su introducción a un vector para su multiplicación sin que se realice alguna modificación sobre la secuencia de ADN original”. Una vez que se ha aislado un gen, el proceso descrito anteriormente permite además de generar múltiples copias del fragmento de ADN de interés, inducir su expresión, realizar análisis de la secuencia del gen, o bien realizar modificaciones *in vitro* (Ashwini et al., 2016), generalmente usando bacterias como modelos que permite un rápido procesamiento. Los protocolos de clonación para la construcción de plásmidos recombinantes son tan abundantes que es difícil elegir el más apropiado. La adición de información genética sobre los vectores plasmídicos depende de técnicas moleculares tales como la clonación Gateway, Golden Gate, la clonación independiente de secuencia y ligación (SLIC por Sequence and Ligation Independent Cloning) y la clonación clásica mediada por enzimas de restricción entre otras.

### 3. Métodos de clonación

#### 3.1 Clonación usando enzimas de restricción

La clonación molecular de cualquier fragmento de ADN usando enzimas de restricción y ligación se caracteriza por 4 pasos fundamentales (Figuras Figura 4 y Figura 5): a) fragmentación del ADN con la ayuda de enzimas endonucleasas; b) ligación de los fragmentos de ADN al vector plasmídico; c) transformación y d) selección de clonas transformantes (Ashwini *et al.*, 2016). La mayoría de vectores plasmídicos contienen un MCS que son grupos de secuencias reconocidas por enzimas de restricción casi siempre compatibles con sitios presentes en los fragmentos de ADN que se desea clonar (Sambrook y Russell, 2006b) o bien, si el fragmento de ADN a clonar es generado mediante PCR utilizando cebadores que contienen los sitios de restricción específicos, que permiten la digestión y generación de extremos romos o cohesivos compatibles con el vector plasmídico (Mullis *et al.*, 1986; Sambrook y Russell, 2006a). Cuando en una reacción de clonación se lleva a cabo la integración de un fragmento de ADN en un vector plasmídico, a través de una reacción de ligación en la que se coloca generalmente el plásmido receptor y el fragmento de ADN en una proporción 1:3 (Addgene, 2019b), posteriormente se lleva a cabo la transformación en bacterias competentes como *E. coli* DH5 $\alpha$  para la propagación y multiplicación del vector construido (Green y Sambrook, 2018), por último el aislamiento y selección de colonias que contienen la construcción deseada puede ser llevarse a cabo por la expresión de un gen que actúa como marcador de selección como *ccdB* o la  $\beta$ -galactosidasa, además de que una segunda evaluación se puede hacer mediante un diagnóstico por PCR, digestión enzimática de los plásmidos o la secuenciación de los mismos (Addgene, 2017). Existen rutas alternativas que se pueden seleccionar en diversos puntos depende la aplicación que se quiera dar (Ashwini *et al.*, 2016).

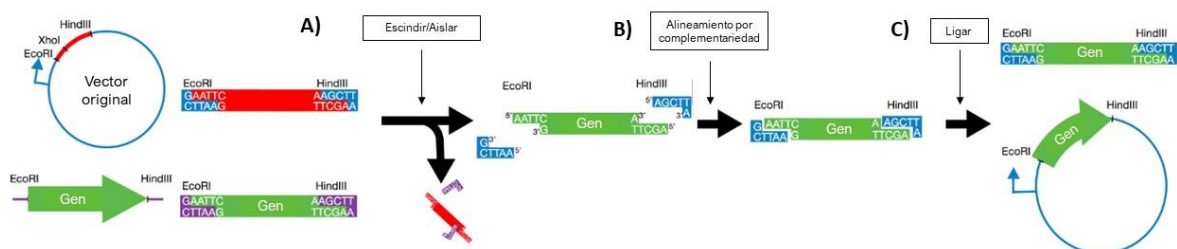


Figura 4. Clonación mediada por enzimas de restricción. A) Escisión del vector y aislamiento del fragmento del vector de interés. B) Alineamiento de sitios escindidos complementarios dentro del vector. C) Ligación. Adaptada de "Plasmids 101: A Desktop Resource", por Addgene, 2017, p. 45, Recuperado de [www.addgene.org](http://www.addgene.org)

### 3.2 Clonación T-A (Timina- Adenina)

La clonación T-A también conocida como clonación rápida o clonación T es uno de los métodos más simples y eficientes pues aprovecha los beneficios de algunas polimerasas incluida la de la bacteria *Thermus aquaticus*, Taq polimerasa (Engelke, Krikos, Bruck, y Ginsburg, 1990) las cuales agregan una molécula simple de adenina a los extremos 3' de productos de PCR; dichos productos pueden ser ligados fácilmente mediante T4 ADN ligasa en vectores linearizados llamados "Vector-T" como el pGEM®-T (Promega, 2019), que contiene extremos 3'-T (donde T corresponde a una timina) de cadena sencilla (Zhou y Gomez-Sanchez, 2000), una vez realizada la ligación, el producto de esta puede ser empleado para realizar transformación bacteriana y posteriormente seleccionar colonias bacterianas recombinantes. Las ventajas de este método de clonación es que no se requieren enzimas de restricción, haciendo innecesario el diseño de primers que los contengan; sin embargo, una de las limitaciones es que la ligación del fragmento de ADN con extremos 3'-A, no se puede direccionar (Niarchos *et al.*, 2017), no obstante, la clonación direccionada es posible gracias a la hemi-fosforilación apropiada tanto de los vectores-T como de los fragmentos de ADN a clonar (Zhou y Gomez-Sanchez, 2000)

### 3.3 Clonación G-C (Guanina - Citosina)

La clonación GC es similar a la clonación TA en dónde algunas ADN polimerasas como la *Taq*, *Tfl* y *Tfh* agregan una molécula simple de Guanina en el extremo 3' del producto de PCR (Mead, Pey, Herrnstadt, Marcil, y Smith, 1991), para posteriormente ser ligados en vectores que contengan extremos 3'C como el pGC™ Blue (Sigma Aldrich, 2019; Ashwini *et al.*, 2016; Niarchos *et al.*, 2017)

### 3.4 Clonación TOPO

La clonación basada en topoisomerasas (TOPO® TA) conocida como clonación TOPO® (Invitrogen, 2014) no necesita el uso de enzimas de restricción, ADN ligasa o algún otro procedimiento post-amplificación por PCR, está basado en la complementariedad de bases Adenina-Timina de extremos adhesivos; aunque, también es posible utilizar fragmentos con extremos romos (Addgene, 2017), la técnica utiliza la topoisomerasa I del Virus Vaccinia dada su capacidad de reconocer la secuencia 5'-(C/T)CCTT3' en ADN bicatenario y hacer un corte endonucleolítico (Stewart Shuman, 1991), la energía de esta reacción se almacena como un enlace

covalente entre la hebra 3' de ADN escindida y un residuo de tirosilo de la topoisomerasa I y actuar sobre un grupo hidroxilo 5' de una cadena de ADN diferente, uniendo las dos cadenas de ADN y liberando a la topoisomerasa (Shuman, S. 1994). Actualmente los kits de clonación TOPO® contienen vectores linearizados con residuos de desoxitimidina (T) voladizos unidos covalentemente a la topoisomerasa I como el pENTR™/D-TOPO (Thermo Scientific, 2019d) por lo que al añadir el producto de PCR con extremos voladizos 3'-A, se lleva a cabo la clonación sin utilizar ligasa, enzimas de restricción, purificación de gel de electroforesis o adición de sitios de restricción a los primers del gen de interés. Esta reacción ocurre a temperatura ambiente en 5 minutos y la eficiencia para generar colonias bacterianas candidatas a portar el vector es alta (Fontes, 2013).

### 3.5 Clonación Gateway

La Clonación Gateway® desarrollada por la empresa Invitrogen™ (Invitrogen, 2016) se basa en la recombinación sitio específica, esto ha permitido incluso acomodar fragmentos de ADN en un orden, orientación y marcos de lectura predefinidos independientemente de su secuencia (Sasaki *et al.*, 2004). El sistema Gateway aprovecha el principio de sitio-especificidad de la recombinación permitiendo la acción de integración y escisión de secuencias de ADN realizada por el fago lambda de manera canónica en el cromosoma de las bacterias que infecta (Figura 5B) (Reece-Hoyes y Walhout, 2018b). Esto requiere de dos enzimas BP clonasa y LR clonasa para catalizar la reacción BP y LR respectivamente, transportando secuencias entre plásmidos las cuales están flanqueadas por sitios de recombinación compatibles para el acoplamiento llamados “att” (Liang, *et al.*, 2013). La mezcla de enzimas BP clonasa consiste en la integrasa del fago lambda y el factor de integración que transfiere el ADN de interés flanqueado por dos sitios attB a un vector donante (pDONR) y que tiene dos sitios attP (Invitrogen, 2016; Liang *et al.*, 2013; Reece-Hoyes y Walhout, 2018b). La recombinación toma lugar por apareamiento de los sitios attB y attP y el fragmento de interés se inserta dentro del vector donante resultando un vector de entrada el cual está flanqueado por dos sitios “L” (Ashwini *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2013). La mezcla de enzimas LR clonasa consiste en la integrasa, el factor de integración al hospedero y la endonucleasa del fago lambda que catalizan la reacción LR (Landy, 1989; Liang *et al.*, 2013). El gen de interés integrado en el vector de entrada flanqueado por dos sitios attL que será transferido a un vector destino el cual

posee dos sitios R, la reacción de recombinación toma lugar de nuevo ahora entre *attL* y *attR* resultando en un vector de expresión flanqueado por los sitios *attB* (Ashwini *et al.*, 2016; Chee, *et al.*, 2015; Reece-Hoyes y Walhout, 2018b).

### 3.6 CCDB tóxico clave en la clonación eficiente

El gen *ccdB* se encuentra localizado en plásmido del factor sexual F de *E. coli* y codifica una proteína que es parte de un sistema toxina antitoxina codificado por el operón *ccd* responsable del mantenimiento del plásmido durante la división celular (Tam y Kline, 1989). *ccdB* codifica una proteína toxica para la ADN girasa con ADN bicatenario roto causando la muerte celular (Bernard, P., *et al.*, 1994), por lo que se han desarrollado plásmidos que contienen *ccdB* como un marcador seleccionable positivo de recombinantes de alta eficiencia por lo que si se clona un fragmento de ADN dentro del vector interrumpiendo el marco de lectura de *ccdB* ya sea por recombinación o restricción y ligación generará bacterias transformadas con una alta probabilidad de tener el fragmento de interés ya que en el caso contrario de no haber integración del fragmento de interés *ccdB* se expresará matando a todas las células que no hayan adquirido la construcción deseada (Bahassi, Salmon, van Melderren, Bernard, y Couturier, 1995; Bernard, 1996; Bernard *et al.*, 1994). Particularmente este caset de selección ha sido acogido por la tecnología de Gateway® aprovechando el hecho de que las células no se propagan mientras *ccdB* se esté expresando, por lo que solo los plásmidos que pierden el gen *ccdB* por recombinación pueden sobrevivir en las cepas de *E. coli* transformadas generando recombinantes exitosas de alto rendimiento (Addgene, 2017). La propagación de este tipo de vectores para su almacenamiento y reserva se debe llevar a cabo en cepas especiales de *E. coli* que toleren la expresión de la toxina *ccdB* por ejemplo *E. coli* DB3.1 que contiene una versión mutante de la ADN girasa (*gyrA462*) resistente a la toxicidad de *ccdB* (Reece-Hoyes y Walhout, 2018a).

### 3.7 Clonación Golden Gate

La clonación Golden Gate® se basa en el uso de enzimas de restricción tipo IIS las cuales escinden el ADN fuera de la secuencia de reconocimiento (NEB, 2019a). Los insertos y vectores son diseñados de tal manera que se coloca el sitio de reconocimiento tipo IIS distal al sitio de corte de modo que la endonucleasa de tipo IIS elimine la secuencia de reconocimiento dejando secuencias voladizo que no están dictadas por las endonucleasas (Engler y Marillonnet, 2014), por lo que no se

introducen secuencias cicatriz; la secuencia específica de fragmentos voladizos permite el ensamblaje múltiple y ordenado de fragmentos de ADN; el sitio de restricción es eliminado del producto ligado, por lo que la digestión y ligación se pueden llevar a cabo simultáneamente (Gearing, 2015). La precisión del ensamblaje depende de las secuencias voladizo por lo que requiere de cuatro pares de bases de unión relativamente pequeñas llamados sitios de fusión para unirse a módulos adyacentes (Figura 5, incluso estos se pueden diseñar para permitir el ensamblaje “sin cicatrices” cuando sea necesario, a diferencia de otros métodos de clonación que requieren secuencias flanqueantes o sitios de recombinación superpuestos (Ashwini *et al.*, 2016; Gearing, 2015). Las enzimas de restricción más usadas son BsaI/ BsaI-HF® v2, BsmBI, BbsI. Esp3I (NEB, 2019a). Golden Gate presenta características ventajosas para el progreso estándar de clonación y permite ensamblar de uno hasta nueve fragmentos a la vez en un plásmido receptor (Engler y Marillonnet, 2014) reduce algunos de los pasos improductivos, lentos y tediosos de clonación como la amplificación por PCR, purificación de gel de electroforesis y el diseño y ordenamiento de primers convencionales ya que la construcción se puede hacer en un solo paso, no deja cicatrices y es escalable a la inserción de múltiples secuencias (Engler y Marillonnet, 2014; Gearing, 2015).

### 3.8 Clonación independiente de secuencia y ligación SLIC

La clonación independiente de secuencia y ligación por sus siglas en inglés, es un método *in vitro* el cual sigue la ruta independiente de RecA de la recombinación homóloga (Li y Elledge, 2007). SLIC utiliza extremos cohesivos complementarios de una sola hebra generados mediante el uso de la T4 ADN polimerasa en el vector deseado y un inserto generado por PCR de al menos 12 bases (Li y Elledge, 2012). La adición de un solo dNTP en la mezcla de reacción es suficiente para detener actividad de la exonucleasa 3'-5' y la polimerasa 5'-3' en el sitio de la primera aparición de este nucleótido (Li y Elledge, 2007). El fragmento a clonar se amplifica por PCR con oligos cuyos extremos 5' contienen 20-40 pb de homología con los extremos del vector destino linearizado por digestión o amplificación por PCR (Li y Elledge, 2012). Una vez que los extremos del vector destino linearizado y el producto de PCR tienen suficientes nucleótidos salientes 5' de marca única complementarios expuestos, se agrega dCTP para detener la reacción de exonucleasa de la T4 ADN polimerasa que tiene la actividad de exonucleasa 3'-5'. El vector destino linearizado y el producto de

PCR se mezclan y se reconocen entre sí (Li y Elledge, 2007, 2012). Esta técnica se puede utilizar para cualquier gen que predice el ensamblaje del gen de interés con el vector de manera combinatoria con mayor facilidad, lo que reduce el tiempo, y costo para los investigadores (Ashwini *et al.*, 2016).

### 3.9 Clonación Gibson

El ensamble Gibson® es un método isotérmico de reacción única en el que se superponen múltiples moléculas de ADN por la acción concertada de una exonucleasa 5', una ADN polimerasa y una ADN ligasa, sobrelapando extremos adhesivos complementarios específicamente y que luego se unen covalentemente (Gibson *et al.*, 2009). El ensamble Gibson permite ensamblar múltiples fragmentos de ADN que pueden clonarse de manera sencilla dentro de un vector (Addgene, 2017). El protocolo consiste en tener fragmentos de ADN con extremos complementarios que pueden ser creados por PCR, posteriormente estos fragmentos se incuban junto a un master mix de enzimas que contiene tres diferentes enzimas: una exonucleasa que “mastica” los extremos 5' del fragmento generando extremos voladizos largos que permiten que las regiones monocatenarias se unan por homología, una polimerasa de alta fidelidad para rellenar los huecos y una ADN ligasa para sellar los huecos recocidos y rellenados (Gibson, 2017). Este ensamble puede usarse para la construcción de genes sintéticos o naturales, rutas génicas, genomas completos y que de manera popular se ha combinado con la tecnología CRISPR Cas en la integración de fragmentos codificantes de RNAs guía (sgRNA) (Wang *et al.*, 2015).

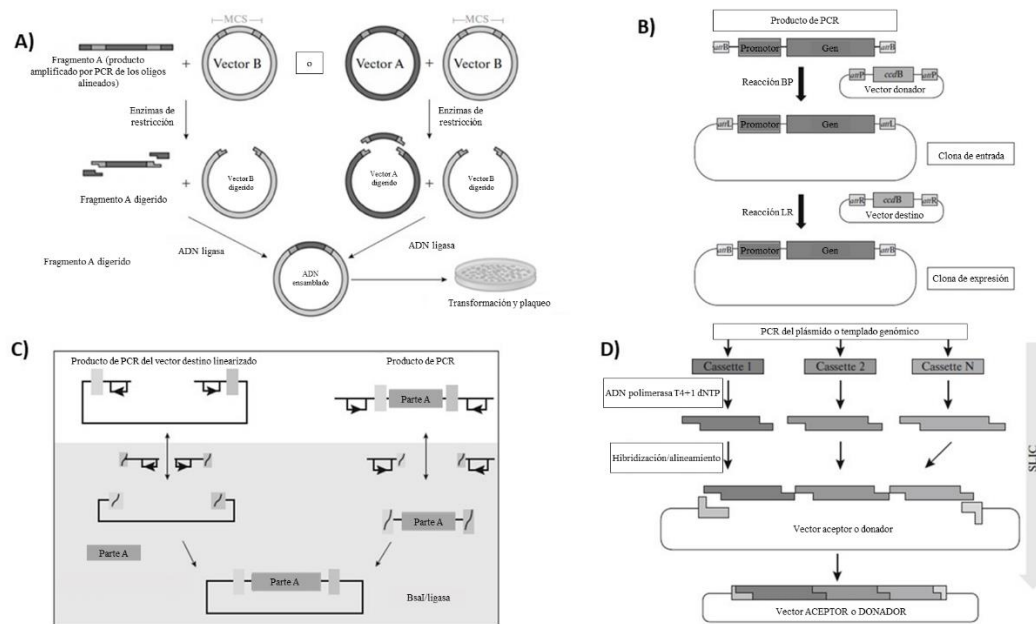


Figura 5. Principales métodos de clonación. A) Clonación clásica mediada por enzimas de restricción; B) Clonación Gateway; C) Clonación Golden Gate; D) Clonación SLIC. Adaptado de “Advances in molecular cloning”, por M. Ashwini et al, 2016, *Molecular Biology*, 50(1), p. 2-5, doi: 10.1134/S0026893316010131.

#### 4. *Agrobacterium* y el plásmido Ti

Uno de los casos más interesantes de transferencia horizontal de genes en la naturaleza es el de *A. tumefaciens* a las plantas (Quispe-Huamanquispe, Gheysen, y Kreuze, 2017), estudiada desde finales de la década de 1930's y principios de la década de los 1940's, junto a la enfermedad de la agalla de la corona, los experimentos consistían en infectar plantas con cultivos axénicos de *A. tumefaciens* (entonces conocida como *Bacterium tumefaciens*), a partir de los cuales se lograba inducir callos, sin embargo, al aislar agallas secundarias a la infección no se podían recuperar bacterias de *A. tumefaciens*. Por ejemplo, en experimentos en los que se inoculaban plantas de *Vinca rosea* con *A. tumefaciens*, poniendo en interacción por tiempos determinados y a 25<sup>0</sup> C y posteriormente se eliminaban a las bacterias con choques térmicos de 46<sup>0</sup> a 47<sup>0</sup> C (Braun, 1943), concluyeron que la presencia de la bacteria no era necesaria para el mantenimiento del fenotipo tumoral, al igual que otros experimentos (Binns, 2002).

Fue hasta 1977 cuando Mary Dell Chilton y su equipo encontraron una pequeña pieza de ADN plasmídico bacteriano, aislado a partir de tumores de la agalla de la corona en plantas de tabaco (Chilton et al., 1977), el equipo concluyó que la base genética de la inducción de tumores con *A. tumefaciens* durante sus experimentos es la

transferencia de ADN entre reinos, de bacteria a planta, este hecho refutó la teoría antigua de que el responsable de los tumores era algún tipo de hongo (Binns, 2002).

Posterior a los descubrimientos de Chilton y colaboradores, los investigadores se centraron en determinar la posible localización de la información crucial presente en *Agrobacterium* necesaria para la transformación de la planta, los experimentos sugerían fuertemente que había un elemento transferible o conjugativo como transposones o plásmidos que contenían la información para desencadenar el mecanismo de virulencia y el principio de inducción de tumores (Kerr, 1969). La primera evidencia de que el elemento transferible era un plásmido de gran tamaño fue presentada por Zaenen y *Col.* en 1974, este plásmido, llamado plásmido Ti (inductor de tumores) era el principal responsable de la inducción de tumores.

Estos hallazgos fueron un punto de inflexión a partir del cual se desarrollaron muchos y continuos descubrimientos para la agricultura, la biología vegetal y biotecnología pues se vislumbraba a una ingeniera genética natural con el potencial de transferir y entregar exitosamente material genético de forma estable o transitoria hacia las plantas. Hoy en día se ha logrado dilucidar el mecanismo por el cual *A. tumefaciens* es capaz de transferir un segmento de ADN oncogénico conocido como T-DNA contenido en el plásmido Ti al genoma de la planta, así como el proceso de infección que provoca un crecimiento neoplásico que concluye en la enfermedad de la agalla de la corona (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). El proceso de infección se da en heridas de las plantas, y requiere de la expresión de los genes presentes en los plásmidos Tide *A. tumefaciens* o Ri (root inducing) de *A. rhizogenes*, para que a través de un sistema de secreción bacteriana de tipo IV el T-DNA, sea transportado a la célula vegetal e integrada al cromosoma de la planta (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017).

En *A. tumefaciens* el plásmido Ti contiene un T-DNA flanqueado por extremos de 24 pares de bases conocidas como borde izquierdo (LB) y borde derecho (RB) y es procesado por el producto de la expresión de un conjunto de genes de virulencia o genes *Vir*, causantes de la inducción de tumores, y otro conjunto de genes que inducen la producción de varios aminoácidos y de compuestos llamados opinas, que son catabolizados para ser usados como un recurso para la bacteria (Gordon y Christie, 2014), gracias al tipo de opina se debe la clasificación de los plásmidos Ti,

los mejor caracterizados son los octopina y nopalina. Cinco tipos de elementos codifican para las siguientes funciones, 1) replicación y mantenimiento, 2) transferencia conjugativa, 3) virulencia, 4) catabolismo de opinas y 5) captación de señales exógenas de la planta hospedera y las células agrobacterianas cercanas al sitio de la infección (Zhu *et al.*, 2000). La disposición de estos elementos y del T-DNA, así como el LB y RB se muestran en la Figura 6.

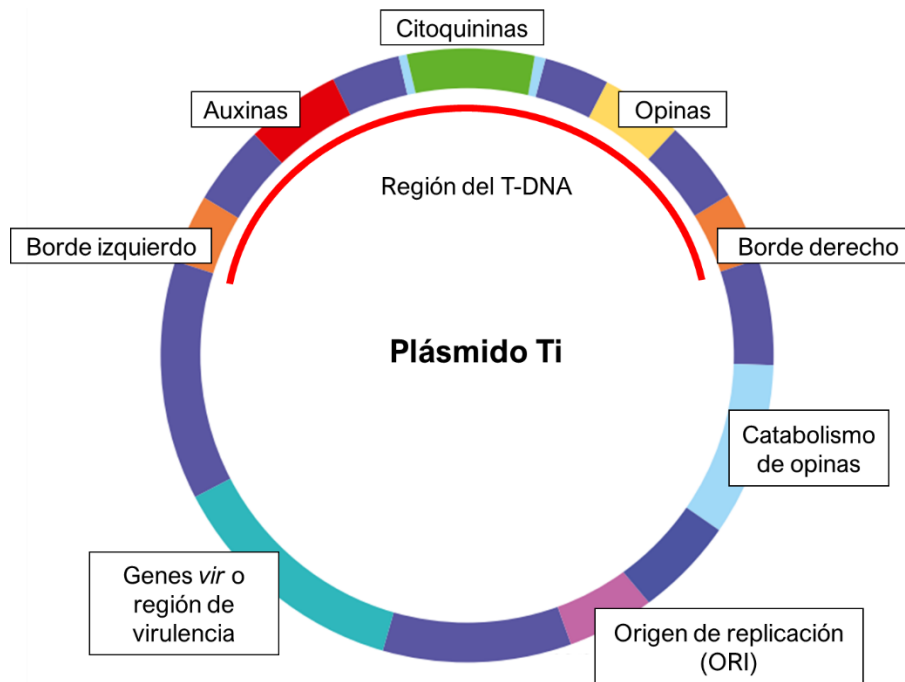


Figura 6. Estructura del plásmido Ti. Adaptado de “Setting the Context: Agriculture and Genetic Modification”, por Tzotzos, Head, y Hull, 2009, en *Genetically Modified Plants*. p. 22.

Los plásmidos Ti pertenecen a la familia de replicones repABC (Pinto, Pappas, y Winans, 2012), el mecanismo de partición y replicación de los plásmidos Ti se ha estudiado a través de los de tipo octopina (Tabata, Hooykaas, y Oka, 1989), este plásmido posee un caset compuesto por tres genes *repA* y *repB* que codifican para un sistema de partición, *repC* codifica para una proteína iniciadora de la replicación (Cevallos, Cervantes-Rivera, y Gutiérrez-Ríos, 2008; Pinto *et al.*, 2012) que se une a una secuencia llamada *OriV* (Pinto, Flores-Mireles, Costa, y Winans, 2011) localizada dentro del gen *repC* (Gordon y Christie, 2014). *repA* y *repB* son proteínas que regulan por autorepresión la transcripción del operón repABC, el complejo RepA-RepB actúa sobre la región operadora y en el sitio de partición *parS*, localizado entre *repA* y *repB*, se ha encontrado que *repA* unida a ADP participa en la autorepresión mediante la

actividad de unión a ADN de su dominio N-terminal, debido a esto, los plásmidos Ti poseen un bajo número de copias, adicionalmente existe un gen localizado entre *repB* y *repC* que codifica para un RNA contratranscrito que regula la expresión de *repC* (Chai y Winans, 2005), que además de contribuir al bajo número de copias, inhibe la replicación de plásmidos coresidentes que contengan el mismo caset repABC en un mecanismo denominado incompatibilidad (Pinto *et al.*, 2012). La percepción de señales exógenas como compuestos fenólicos liberados por los tejidos heridos de la planta da como resultado una transcripción elevada del caset repABC y un aumento en el número de copias del plásmido Ti, dichos compuestos son detectados por el sistema de dos componentes VirA-VirG, que se unen a la caja *vir* para activar la transcripción (Gordon y Christie, 2014). Uno de los compuestos más conocidos que activan la expresión de los genes *vir* es 3,5-dimetoxi acetofenona (acetosiringona) (Stachel, Messens, Van Montagu, y Zambryski, 1985). La vía de señalización comienza cuando los compuestos fenólicos interactúan con VirA, una proteína transmembranal que se encarga de censar las señales externas, luego la proteína ChvE, codificada en el cromosoma, interactúa con VirA mejorando la activación de los genes Vir mediante su unión a azúcares (Shimoda, Toyoda-Yamamoto, Aoki, y Machida, 1993). Además de este compuesto, la acidez, bajas concentraciones de fosfato, temperatura y azúcares son condiciones importantes que inducen la expresión de los genes *vir* (Hwang, Yu, y Lai, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes de virulencia resulta en un aumento en el número de copias del plásmido Ti, y con esto un incremento en la disponibilidad del T-DNA. Para que ocurra el transporte del T-DNA, VirD2 con ayuda de VirD1, con actividad de relaxasa y endonucleasa, respectivamente se une a los bordes del T-DNA y realiza un corte en un sitio único del plásmido de doble cadena superenrollado (Gordon y Christie, 2014; Hwang *et al.*, 2017; Pansegrau, Schoumacher, Hohn, y Lanka, 1993), de este proceso resultan moléculas de T-DNA con VirD2 unida covalentemente en el extremo 5' del corte en el borde derecho (Herrera-Estrella, Chen, Van Montagu, y Wang, 1988; Howard, Winsor, De Vos, y Zambryski, 1989; Ward y Barnes, 1988; Young y Nester, 1988). El sistema de secreción tipo IV de *Agrobacterium* es codificado a partir de los genes *vir* y consta de 12 proteínas, VirB1-B11 y VirD4, en conjunto forman una estructura de un pilus filamentoso (pilus-T) y un complejo transportador asociado a la membrana (Alvarez-

Martinez y Christie, 2009; Fronzes, Christie, y Waksman, 2009; Waksman y Fronzes, 2010; Wallden, Rivera-Calzada, y Waksman, 2010). A su vez, el complejo transportador se subdivide en cuatro estructuras: la proteína VirD4, una translocasa de membrana interna receptora del sistema de secreción tipo IV, un complejo de núcleo de membrana exterior (VirB7-B9-B10), y un pilus-T extracelular (VirB2-B5) (Christie, Whitaker, y González-Rivera, 2014). Se ha reportado que el complejo VirD2-T-DNA es orientado a los polos de la célula por VirC1 para que interactúe con VirD4 (Atmakuri, Cascales, Burton, Banta, y Christie, 2007), una proteína de membrana interna integral con actividad de ATPasa, que presenta al complejo VirD2-T-DNA al transportador VirB (Hwang *et al.*, 2017), luego del tráfico a través del transportador ocurre la liberación de VirD2-T-DNA y varias proteínas efectoras de virulencia (ej. VirE2, VirE3 y VirF) de las células bacterianas independientemente unas de otras y del T-DNA (Hwang *et al.*, 2017; Schrammeijer, den Dulk-Ras, Vergunts, Jácome, y Hooykaas, 2003; Vergunst *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000). *Agrobacterium* utiliza efectores para entregar al T-DNA guiado por VirD2 a la célula de la planta, uno de ellos es VirE2, que se une al VirD2-T-DNA de cadena sencilla de forma cooperativa para formar un complejo VirD2-T-DNA-VirE2 llamado complejo T (Gelvin, 2014). De esta manera el T-DNA es conducido por VirD2 y VirE2 hacia el núcleo de la célula, el paso a través de la membrana nuclear es mediada por factores del huésped, mientras que la integración al genoma de la célula vegetal requiere de la disociación del complejo VirD2-T-DNA-VirE2, el cual se lleva a cabo por la proteína VirF y el complejo de proteasoma de ubiquitina vegetal (Tzfira, Vaidya, y Citovsky, 2004; Zaltsman, Krichevsky, Kozlovsky, Yasmin, y Citovsky, 2010). Finalmente, en un proceso de recombinación no homóloga el T-DNA invade los cortes en el genoma de la planta posiblemente generadas como consecuencia de la replicación activa del ADN, las secuencias bordes de una sola cadena se disponen a través de secuencias homólogas cortas del ADN de la planta, el LB y RB son ligados en los sitios de corte en el cromosoma de la planta y la segunda hebra del T-DNA se sintetiza (Gordon y Christie, 2014; Zambryski, 2013).

El entendimiento de este mecanismo de transferencia horizontal de genes entre *Agrobacterium* y las plantas permitió el desarrollo de herramientas de manipulación genética en plantas, como los sistemas binarios, en donde *A. tumefaciens* es usada como una herramienta de ingeniería genética natural y las modificaciones que se han

realizado sobre el plásmido Ti han desarrollado toda una industria biotecnológica vegetal a su alrededor (Gordon y Christie, 2014).

Los vectores binarios surgieron por la necesidad de generar plantas transgénicas mediante el uso de *Agrobacterium*. Al principio se eliminaron los oncogenes del T-DNA silvestre (plásmido desarmado) y en su lugar se pudo integrar algún gen de interés y un marcador para la selección, de esta manera el plásmido ya no era patogénico y la habilidad de entregar el gen de interés e integrarlo al genoma quedaba intacta (Hwang *et al.*, 2017; Lee y Gelvin, 2008). Sin embargo, el plásmido resultante era de gran tamaño y como se mencionó anteriormente también poseía un bajo número de copias, lo que dificultaba su aislamiento y los procesos de clonación y transformación, estos inconvenientes fueron superados gracias a la creación de los sistemas de vectores binarios. Los sistemas de vectores binarios constan de dos plásmidos, uno de ellos es de amplio rango de hospedero y contiene al T-DNA, el segundo, también llamado plásmido ayudador o vir helper lleva a los genes vir necesarios para la transferencia del T-DNA (Figura 7) (Barton, Binns, Matzke, y Chilton, 1983).

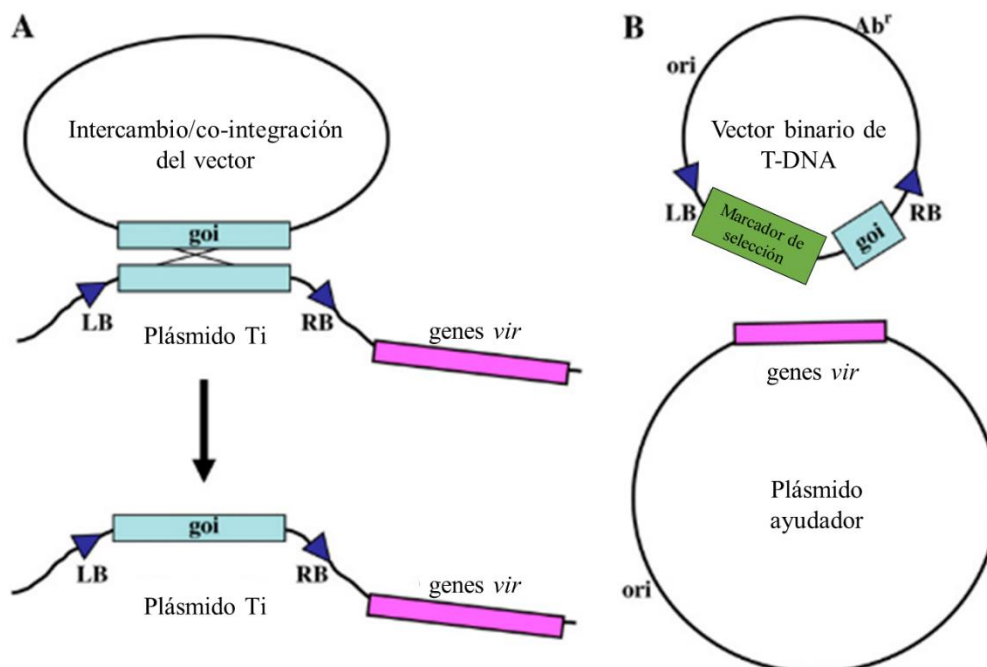


Figura 7. Diagrama esquemático de sistemas de co-integración/intercambio y sistemas de vectores binarios de T-DNA para introducir genes en plantas utilizando la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. Adaptado de Lee y Gelvin, 2008.

Actualmente los sistemas de vectores binarios han evolucionado y se han diversificado, permitiendo la producción de plantas transgénicas con mayor facilidad (Hwang *et al.*, 2017; Lee y Gelvin, 2008). Existen diferentes tipos de sistemas de vectores binarios basados en el T-DNA de *Agrobacterium* diseñados para distintos propósitos (Tabla 1), pero todos ellos tienen en común las siguientes características: 1) las secuencias de 24 pares de bases del borde derecho e izquierdo del T-DNA, 2) genes que sirven como marcadores de selección para *E. coli*, *A. tumefaciens* y plantas, 3) un sitio múltiple de clonación dentro del T-DNA con sitios de corte de diferentes enzimas de restricción para permitir la inserción de uno o más genes de interés, 4) orígenes de replicación para permitir el mantenimiento y replicación en *E. coli* y *A. tumefaciens* (Lee y Gelvin, 2008).

Para la identificación y selección de plantas transgénicas se han utilizado genes de resistencia a antibióticos y herbicidas, los antibióticos aminoglucósidos son los más comúnmente utilizados (ej. Kanamicina e higromicina), en cuanto a herbicidas se han empleado fosfinodinacina, glufosinato y formulaciones como Basta y Bialofos (Gordon y Christie, 2014).

Tabla 1. Vectores binarios de T-DNA de *Agrobacterium*. Adaptada de Lee y Gelvin, 2008.

Serie del vector	Grupo de incompatibilidad y ori del vector	Características importantes <sup>a</sup>	Compatible con Gateway	Marcador de selección para bacteria <sup>b</sup>	Marcador de selección para planta <sup>b</sup>
pBIN	IncP $\alpha$	mcs con selección azul/blanco	No	Kan	Kan
pGA	IncP $\alpha$	Sitio cos Cole1 ori	No	Kan	Kan
SEV	IncP $\alpha$	Reconstituye un borde de T-DNA que falta; no es un vector binario	No	Kan	Kan/Nos

pEND4K	IncPα	Sitios cos, mcs con selección azul/blanco	No	Kan/Tet	Kan
pBI	IncPα	Gen <i>gusA</i> sin promotor para estudios de promotores	No	Kan	Kan
pCIB10	IncPα	Gen de resistencia a antibiótico quimérico	No	Kan	Kan/Hyg quimérico
pMRK63	pRi	Vector basado en pRi (bordes de pRi)	No	Amp/Kan	Kan
pGPTV	IncPα	Gen <i>gusA</i> sin promotor para estudios de promotores	No	Kan	Kan/Hyg/Bar/Bleo/Dhfr
pCGN15 47	pRi1+ColE1	Ori ColE1 para alto número de copias en <i>E. coli</i> , mcs con selección azul/blanco	No	Gent	Kan
pART	IncPα+ColE1	Ori ColE1 para un alto número de copias en el caset de expresión de promotor/polyA en <i>E. coli</i>	No	Spec	Kan
pGKB5	pRiA4	Gen <i>gusA</i> sin promotor para	No	Kan	Kan/Bar

		estudios de promotores			
pMJD80 y pMJD81	IncP $\alpha$	$\Omega$ , líder no traducido	No	Kan	Kan
pPZP	pVS1	Pequeño, estable, mcs con selección azul/blanco	No	Spec/Chl	Kan/Gent
pBINPLUS	IncP $\alpha$	Marcador de selección cerca del ori ColE1 LB	No	Kan	Kan
pRT100 pRT- $\Omega$ /Not/Asc	IncP $\alpha$	Sitios de corte raro ( <i>NotI</i> , <i>AscI</i> )	No	Kan	Kan/Hyg/Bar/Dhfr
BIBAC	pRi	Vector binario de T-DNA diseñado para transferir fragmentos grandes de ADN	No	Kan	Hyg
pCB series	IncP $\alpha$	Mini vectores binarios pequeño esqueleto, no automovilizable	No	Kan	Bar
pGreen	IncW	Ori ColE1, mcs con selección azul/blanco	No	Kan	Kan/Hyg/Sul/Bar
pPZP-RCS2	pVS1	Múltiples sitios de corte raro para la inserción del caset. Utiliza	No	Spec	Kan/Gent

		pPZP200 como esqueleto			
GATEWAY AY vector destino	pVS1	Ori ColE1. Utiliza pPZP200 como esqueleto	Sí	Spec	Kan/Hyg/ Bar
pMDC	pVS1	Basado en pCAMBIA (excepto pMDC7, de PER8)	Sí	Kan, Spec para pMDC7	Kan/Hyg/ Bar
pRCS2	pVS1	Contiene sitios de corte raro	No	Spec	Kan/Hyg/ Bar
pRCS2-ocs	pVS1	Para clonación de varios genes	No	Spec	Kan/Hyg/ Bar
pEarleyGate	pVS1	Basado en pCAMBIA. Facilita el etiquetado de proteínas	Sí	Kan	Bar
pGWTAC pMDC99	pRiA4	Multi round Gateway para clonación de múltiples genes	Sí	Kan	Hyg
pORE	IncPα	Basado en sitios pCB301 ColE1 ori FRT. Gen de <i>gusA</i> o <i>gfp</i> sin promotor para estudios de promotores	No	Kan	Kan/Pat
pSITE	pVS1	Proteína de fusión fluorescente.	Sí	Spec	Kan

		Basada en pRCS2			
pMSP	IncPα	Super-promotor para impulsar la expresión del goi	No	Kan	Kan/Hyg/ Bar
pCAMBI A	pVS1	Múltiples vectores para clonación, expresión y etiquetado	No	Kan/Chl	Kan/Hyg/ Bar
pGD	pVS1	Derivado de pCAMBIA1301. Múltiples vectores para etiquetar proteínas con DsRed2 o GFP	No	Kan	Hyg

<sup>a</sup>cos, Extremos cohesivos del bacteriófago λ; mcs, sitio múltiple de clonación; ori, origen de replicación en plantas; Ω, potenciador traduccional del virus del mosaico del tabaco.

<sup>b</sup>Amp, Ampicilina; Bar, resistencia a la fosfinocina; Bleo, bleomicina; Chl, cloranfenicol; Dhfr, dihidrofolato reductasa; Gent, gentamicina; Hyg, higromicina; Kan, kanamicina, Nos, nopalina sintasa; Pat, resistencia a la fosfinocina; Spec, espectinomicina; Sul, sulfonilírea; Tet, tetraciclina.

Comúnmente las cepas de *Agrobacterium* y *E. coli* utilizadas en la transformación son mutantes cromosómicas con genes de resistencia a antibióticos (Tabla 2), la gran mayoría de las cepas mutantes de *Agrobacterium* son resistentes a rifampicina, lo cual permite la selección de la cepa portadora vector binario. Otra mutación que se han implementado para la selección es que las cepas de *Agrobacterium* pueden cultivarse en medios con sacarosa como fuente única de carbono. Por otro lado, *E. coli* K12, la cepa más utilizada en el laboratorio no puede utilizar sacarosa como fuente de carbono. Durante la práctica estas mutaciones se vuelven útiles, pues al llevar a cabo el apareamiento de plásmidos para la introducción del vector binario de *E. coli* a *Agrobacterium*, el cultivo en un medio mínimo que contiene rifampicina y sacarosa asegurará la eliminación de *E. coli* (Ditta, Stanfield, Corbin, y Helinski, 1980; Garfinkel

*et al.*, 1981). Se debe tener cuidado al emparejar vectores binarios con cepas específicas de *Agrobacterium*, pues muchas de estas cepas ya expresan genes de resistencia a kanamicina, carbenicilina, eritromicina o la gentamicina. Por lo tanto, no se pueden utilizar fácilmente vectores binarios con el mismo marcador de selección en estas cepas (Lee y Gelvin, 2008).

Tabla 2. Cepas de *Agrobacterium* de uso frecuente. Adaptada de Lee y Gelvin 2008.

Nombre de la cepa	Fondo cromosómico	Plásmido origen	Resistencia a antibiótico <sup>a</sup>
AGL-0	C58	pTiBo542	rif
AGL-1	C58	pTiBo542	rif, carb
C58-Z707	C58	pTiC58	kan
EHA101	C58	pTiBo542	rif, kan
EHA105	C58	pTiBo542	rif
GV3101TpMP90	C58	pTiC5	rif, gent
LBA4404	Ach5	pTiAch5	rif
NT1(pKPSF2)	C58	pTiChry5	ery

<sup>a</sup> carb, carbenicilina; ery, eritromicina; gent, gentamicina; kan, kanamicina; rif, rifampicina.

#### 4.1 Transformación mediada por *Agrobacterium*

El desarrollo de vectores para la transformación de plantas mediada por *A. tumefaciens* (ATMT por *A. tumefaciens*-mediated transformation) se basa en el uso de plásmidos con origen de replicación de amplio rango de hospedero y albergan un Caset-T flanqueado por los LB y RB necesarios para el reconocimiento de la maquinaria de *A. tumefaciens*, este caset se compone de un MCS y un marcador de selección (Figura 8). Una vez insertado en la cepa adecuada de *A. tumefaciens* que contiene el plásmido Ti el cual expresará los componentes necesarios para la movilización del caset-T, en plantas (Figura 8) pero también en otros organismos como los hongos (Nora *et al.*, 2019).

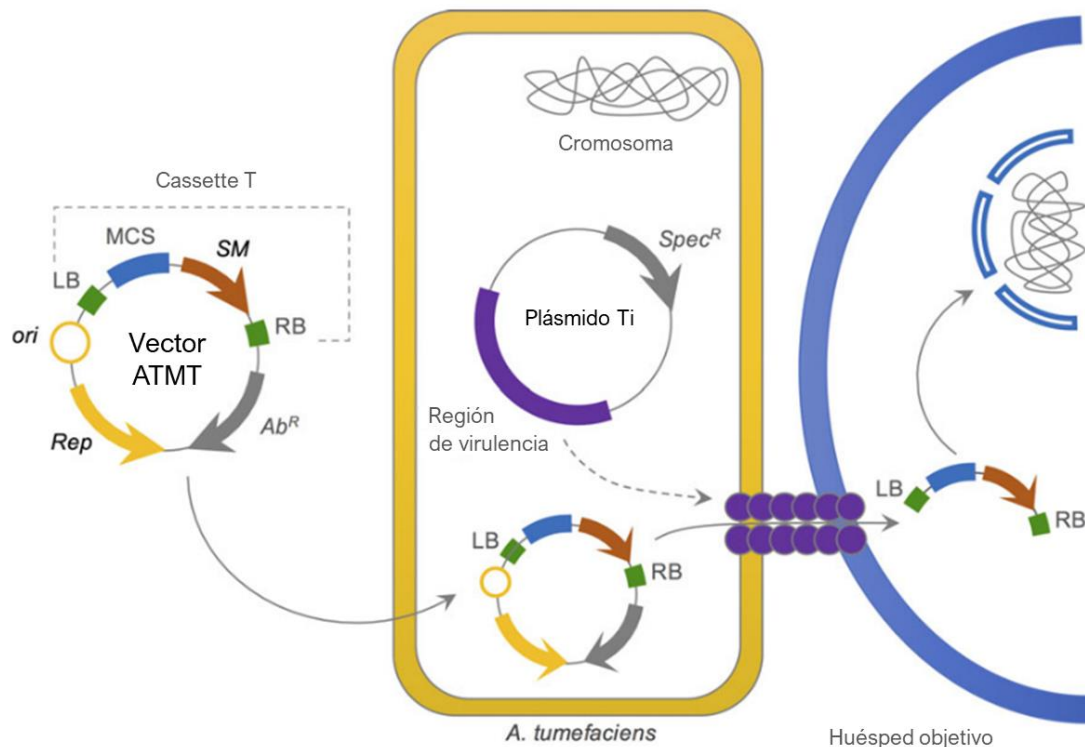


Figura 8. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Adaptada de por Nora et al, 2019.

#### Aplicaciones y casos de éxito en el uso de plásmidos

El diseño y construcción de vectores de clonación y expresión ha dado paso a la obtención de nuevos medicamentos, mejora en los rendimientos de las fermentaciones industriales y el desarrollo plantas mejoradas en la agricultura con múltiples áreas de oportunidad aplicativa en la obtención de bienes y servicios (Imanaka y Aiba, 1981). Gracias al conocimiento generado a partir de estas tecnologías se ha desarrollado la biología sintética (Nora et al., 2019) por lo que los plásmidos se han vuelto importantes en la generación de nuevos métodos y herramientas moleculares para la edición de genomas por recombinación homóloga por ejemplo con el uso del sistema CRISPR-Cas (Mabashi-Asazuma y Jarvis, 2017), construcción de bibliotecas genómicas de ADN y ADNc (Koo et al., 2017; Moore, 1987) y de plásmidos lentivirales utilizados en la terapia génica, sobreexpresión transgénica estable, silenciamiento génico persistente, inmunización, generación de animales transgénicos, inducción de células pluripotentes, modificación de células madre y seguimiento de linaje (Sakuma, Barry, y Ikeda, 2012). Los plásmidos también juegan un papel importante en la producción de proteínas recombinantes de interés como lo es la producción de algunas hormonas tales como la hormona del crecimiento

(Schulga, Mechev, Kirpichnikov, Skryabin, y Deyev, 2016) anticuerpos (de Marco, 2015) y otros péptidos importantes en la medicina como la insulina (Ladisich y Kohlmann, 1992) incluso para la producción animal con un papel importante en la reproducción, la eficiencia alimenticia y la salud. (Gifre, Arís, Bach, y Garcia-Fruitós, 2017).

Las aportaciones de la ciencia básica han permitido desarrollar una amplia gama de plásmidos disponibles, como es el caso de vectores binarios, basados en el sistema infectivo empleado por *A. tumefaciens* (Lee y Gelvin, 2008) para la transformación transitoria y estable de plantas (Krenek *et al.*, 2015; Norkunas, Harding, Dale, y Dugdale, 2018), los cuales han dado paso a una nueva revolución agrícola y alimentaria en dónde los plásmidos y otras herramientas moleculares para la introducción de ADN extraño en plantas ha permitido el desarrollo de plantas transgénicas; además el estudio y la comprensión de las modificaciones genéticas ha permitido entender el impacto que los cultivos genéticamente modificados pueden tener en el medio ambiente (Ahmad y Mukhtar, 2017). Los cultivos genéticamente modificados tienen la capacidad de producir proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) como la proteína Cry (Peng, Yu, y Song, 2019), la cual se ha vuelto en una táctica de control contra plagas de coleópteros y lepidópteros en cultivos de maíz, algodón y soja, no afectando otros insectos o animales y sustituyendo los insecticidas químicos (Romeis, Naranjo, Meissle, y Shelton, 2019) de igual manera el fitomejoramiento de cultivos oleaginosos mediante la tecnología transgénica ha dado lugar al desarrollo sostenible (Ahmad y Mukhtar, 2017) de biocombustibles, biolubricantes y aceites comestibles (Maheshwari y Kovalchuk, 2014). Ante los diferentes desafíos actuales la producción de proteínas recombinantes de interés con fines farmacéuticos también se ha desarrollado en plantas modificadas genéticamente (Medrano *et al.*, 2009), de igual manera la generación de plantas resistentes a diferentes tipos de estrés dado las condiciones ambientales adversas originadas por el cambio climático (Ahmad y Mukhtar, 2017) y la necesidad de una mayor productividad de los cultivos para satisfacer los requerimientos del crecimiento poblacional (Nature Plants, 2019).

## JUSTIFICACIÓN

La sociedad actual enfrenta grandes retos, tal es el caso de la contaminación del aire, agua y suelo, causado principalmente por las grandes industrias seguido de la

sobrepoblación y los desechos que ésta vierte al ambiente, lo cual ha inducido la erosión del suelo, falta de nutrientes, mala calidad del agua y del aire, como consecuencia, el cambio climático ha azotado en los últimos años la producción agrícola en todo el mundo, generando la aparición de plagas, insectos vectores de enfermedades afectando el rendimiento y calidad de la producción de diferentes cultivos alrededor del mundo representando una amenaza a la seguridad alimentaria.

Las plagas y enfermedades a las que son susceptibles las plantas tienen la capacidad de propagarse fácilmente y alcanzar el nivel de epidemias, por ejemplo las langostas, las orugas, las moscas de la fruta, las royas, los virus, las enfermedades del banano y de la mandioca son plagas transfronterizas destructivas que se propagan mediante el comercio, factores ambientales como el viento además de vectores (FAO, 2019b). Sin embargo, la producción agropecuaria y el tratamiento de los problemas de las plagas entre otros son la principal fuente de contaminación del agua por nitratos, fosfatos y plaguicidas, también la mayor fuente antropogénica de gases responsables del efecto invernadero como el metano y el óxido nitroso, por lo que, la agricultura afecta también su propio futuro a través de la degradación de la tierra, la pérdida de la biodiversidad, la salinización, el exceso de extracción de agua, la reducción de la diversidad genética del suelo y el incremento de compuestos tóxicos como los metales pesados, traerán consecuencias a largo plazo difíciles de cuantificar (FAO, 2019). (FAO, 2019a). En respuesta a estos problemas, la biotecnología de las plantas se vislumbra como una área de oportunidad, amigable con el ambiente y con casos recientes de éxito en México y en otros países, por mencionar algunos ejemplos se puede enfatizar el del maíz Bt en el que se ha inducido la producción de proteínas llamadas "Cry" las cuales son capaces de controlar y mitigar plagas propias del maíz como algunos lepidópteros, el gusano barrenador y el gusano cogollero, algunos coleópteros como el cucarrón de las raíces todos estos causantes de grandes pérdidas económicas; otros casos son el de maíces resistentes a herbicidas y a sequías (Silva, 2005).

Uno de los temas que ha ganado popularidad es el de la fitorremediación y aprovechamiento de las capacidades de las plantas para adsorber o almacenar contaminantes de suelo tales como los metales pesados y otros compuestos xenobióticos, por lo que se han desarrollado plantas genéticamente modificadas diseñadas para la rehabilitación de suelos mejorando su potencial. Aunque las plantas

tienen la capacidad de desintoxicar algunos contaminantes generalmente carecen de la vía catabólica para la degradación, mineralización completa de estos compuestos en comparación con los microorganismos. Por lo que la transferencia de genes involucrados en la degradación de xenobióticos de los microbios y de otros eucariotas a las plantas aumentará aún más su potencial para la remediación (Eapen, Singh, y D'Souza, 2007).

Para el desarrollo de estos y otros beneficios es necesario crear las herramientas que están detrás y que son las más importantes para que esto sea posible, por lo que los plásmidos han sido el motor de importantes avances en el campo de la biotecnología, desde la producción de insulina recombinante en cepas de *E. coli* para el tratamiento de la diabetes (Kim, Shizuya, De Jong, Birren, y Simon, 1992) hasta cultivos de maíz que contienen y expresan un gen de *B. thuringiensis* para conferir resistencia a plagas (Koziel *et al.*, 1993). Hoy se sabe que los plásmidos de *A. tumefaciens* tienen la capacidad de entregar cualquier segmento de ADN flanqueado por los bordes del T-DNA a una amplia gama de plantas hospederas, estas incluyen gimnospermas, muchas mono y dicotiledóneas de importancia agrícola pero no solo plantas sino también levaduras, muchas especies de hongos e incluso células humanas (Gordon y Christie, 2014).

El campo mexicano tiene la necesidad de generar una gran variedad de respuestas ante los diferentes retos a los que se enfrenta la sociedad actual, tales como el cambio climático, el ataque cada vez más frecuente de plagas y enfermedades emergentes que atenúan los rendimientos y calidad de las cosechas; además del rezago por erosión de los suelos, la creciente demanda alimenticia de la población y ser competentes ante las grandes regiones y países productores cada vez más tecnificados. Por lo que estos retos se han abordado desde diferentes ámbitos tales como el uso de agroquímicos, la agroecología, controles biológicos entre otros, sin embargo, uno de los campos emergentes y con un enorme potencial es el campo de la biología molecular entre los que se encuentra el mejoramiento de plantas convencionales, confiriendo resistencia a sequías, estrés por calor, frío, resistencia selectiva a plagas de insectos, mayor producción, mejor calidad y valor nutricional de frutos, todo esto mediante la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*. por lo cual es importante desarrollar una gran variedad de plásmidos para la expresión de proteínas recombinantes en plantas. El desarrollo y generación de plásmidos para

plantas es de vital importancia en la ciencia básica para la generación de conocimiento y así abordar problemáticas a corto, mediano y largo mediano plazo. Al respecto en este trabajo se aborda la modificación de un vector de clonación Gateway pEarleyGate101 (vector de destino) para la expresión de proteínas recombinantes en plantas y generar uno o más vectores de clonación clásica por enzimas de restricción ya que, aunque los vectores Gateway son muy efectivos y muy utilizados actualmente en los mejores laboratorios, son demasiado caros y no están al alcance de cualquier laboratorio debido al alto costo del kit de enzimas LR y BP clonadas que rondan los 19,000 pesos cada una mientras que un kit de enzimas de restricción puede rondar los 1,500 pesos sin contar que el vector no se puede propagar en cualquier cepa estándar de *E. coli*, por lo que es importante generar un gran abanico de opciones y vectores mucho más accesibles para cualquier laboratorio en México. En el laboratorio 401 de Cultivos Vegetales del edificio EMA6 existe el interés en generar una plataforma antiviral utilizando la plataforma CRISPR-Cas con expresión transitoria y/o estable para el control de Potyvirus y otros virus de RNA que afectan plantas de interés en Puebla, razón por la cual también es importante generar las modificaciones sobre el vector pEarleyGate 101 y también la fusión transcripcional de un gen reportero mCherry con el gen NIa del Virus del Jaspeo del Tabaco (TEV por Tobacco Etch Virus) para en estudios futuros monitorear y analizar las interacciones entre la plataforma CRISPR-Cas y virus.

## HIPOTESIS

La edición del vector destino pEarleyGate 101 generará vectores totalmente funcionales, estables y capaces de recibir de información genética, además de poder expresarla.

## OBJETIVOS

### General

Modificar el vector plasmídico pEarleyGate 101 con base en nuevos diseños para la expresión de genes de interés y reporteros en plantas.

### ESPECÍFICOS

Suprimir la región Gateway del plásmido pEarleyGate 101 que incluye el gen de muerte *ccdB* y propagar en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Cambiar el gen de resistencia al antibiótico Kanamicina por espectinomicina.

Integrar el gen reportero mCherry en los plásmidos generados manteniendo sitios únicos de restricción que permitan generar fusiones traduccionales.

Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con los plásmidos que incorporen el gen reportero para inducir por agroinfiltración su expresión transitoria en la planta modelo *Nicotiana tabacum*

Generar y ligar a los plásmidos generados la fusión transcripcional entre el gen de la proteína reportera mCherry y el gen NIa del Virus del Jaspeo del Tabaco.

## MATERIALES Y METODOS

Se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 3) para amplificar el gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry y el gen NIa del TEV (NIaTEV); el fragmento que codifica para la resistencia a espectinomicina, fue tomado del plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry a través de restricción y luego fue insertado al vector pEarleyGate 101 proporcionado por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la UNAM.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de mCherry y TEV

Gen	Sitios de restricción	Secuencia 5' a 3'	Longitud	%GC	Tm	Tamaño del amplicón
mCherry	<b><u>BamHI</u></b>	fw: <b><u>ggatcc</u></b> caatggataacatggccatc	26pb	50%	63°C	710pb
	<b><u>XbaI</u></b>	rv: <b><u>tctaga</u></b> tcatcactgtacagctcgtc	27pb	44%		
NIaTEV		fw: tgaagccgcaactgggagag	20pb	60%	64°C	1266pb
		rv: cgctctccctttgtggctctc	22pb	59%		

También se realizaron simulaciones de electroforesis *in silico* con el programa SnapGene versión 4.2.6 para predecir el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR o por digestión con enzimas de restricción de acuerdo con la orientación en la que se ligaron.

Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT).

La transcripción reversa para la síntesis de ADN complementario se realizó con el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando como sustrato 1 µg de RNA total. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador T100 BIORAD durante 60 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.

Las reacciones de amplificación de fragmentos de ADN usados para las clonaciones, así como para las validaciones de estas, se llevaron a cabo mediante el kit DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, California USA) de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante, ajustando el volumen final de la mezcla de reacción a 10  $\mu$ L. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1%.

Extracción de plásmido mediante lisis alcalina

Para la extracción de plásmidos, células *E. coli DH5 $\alpha$*  que contienen el plásmido de interés se cultivaron a 37<sup>0</sup> C y 180 rpm por toda la noche o un mínimo de 8 horas en medio LB líquido con el antibiótico de selección correspondiente. Se colectaron en un tubo de 1.5 mL por centrifugación a 8000 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante dejando aproximadamente 100  $\mu$ L de medio en el que se resuspendió la pastilla de células. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución de lisis, se mezcló por inversión e incubó por 4 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 120  $\mu$ L de solución de neutralización, se mezcló por inversión e incubó en hielo por 3 minutos, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 300  $\mu$ L), opcionalmente se agregaron 150  $\mu$ L de fenol y 150  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 10 segundos, después se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. El ADN fue precipitado tras la adición de un volumen de isopropanol frío y su incubación a -20<sup>0</sup> C por una hora, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, se realizaron dos lavados agregando 400  $\mu$ L de etanol frío al 75 %, la mezcla se agitó y centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se puso a secar a temperatura ambiente durante 15 minutos, finalmente, se resuspendió en 30  $\mu$ L agua estéril libre de nucleasas. La integridad de los plásmidos fue verificada mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1%.

Extracción de RNA total a partir de material vegetal.

Para la extracción de RNA total de tejido vegetal, se partió de 0.1 gramos de tejido de hoja, cuidando que la muestra se procesará rápidamente y manteniéndola en hielo, en el proceso de extracción se utilizó el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, una vez obtenida la pastilla de RNA total,

se resuspendió en un volumen de 20 a 50 microlitros dependiendo del tamaño de esta. La calidad e integridad del RNA total fue corroborada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y considerando las absorbancias a 260 y 280 nm.

#### Preparación de células competentes

Se prepararon preinóculos de cepas de *E. coli DH5α* y *A. tumefaciens*, para esto se tomó una asada de cultivo en placa de cada cepa, se inocularon en 3mL de medio LB líquido puro por separado en tubos estériles de 15 mL y se incubaron en agitación a 180 rpm toda la noche a 37°C para *E. coli DH5α* y a 28°C para *A. tumefaciens*. De estos cultivos se tomó un mililitro de cada uno para inocular matraces que contenían 50 mL de medio LB nuevo, los matraces se incubaron a 37°C para *E. coli DH5α* y 28°C para *A. tumefaciens* a 180 rpm a partir de 3 horas de incubación se midió densidad óptica en espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 0.6; posteriormente cada cultivo se pasó a tubos de 50 ml, se incubaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y las pastillas bacterianas fueron resuspendidas en 25 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M fría y estéril, nuevamente se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desecharon los sobrenadantes, cada pastilla fue resuspendida en 3mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1M y 14% de glicerol fría y estéril, y se generaron alícuotas de 0.2 mL en microtubos de 1.5 mL, una vez listas se guardaron en ultracongelación a -70 °C.

#### Transformación bacteriana por choque térmico

Se sacaron células competentes del ultracongelador, cada tubo fue descongelado en hielo hasta ser soluble, se añadió la concentración de plásmido requerida en cada reacción e incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente cada reacción fue sometida a choque térmico a 42 C durante 60 segundos, en seguida se pasó a hielo durante 5 minutos. Se agregó 1mL de LB líquido sin antibiótico, se homogenizó e incubó una hora a 37 C y 180 rpm. Una vez terminada la incubación cada tubo se centrifugó a 5000 rpm 2 minutos, después se decantó el sobrenadante dejando 200 - 400 µL y se resuspendió. Finalmente se sembró masivo en placa con LB sólido con antibiótico.

#### Purificación de banda en gel de electroforesis

La purificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo con el kit de extracción Zymoclean Gel DNA Recovery Kit® (Zymo Research Corp. California, USA) siguiendo el protocolo y especificaciones descritas por el fabricante.

#### Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción de ADN se llevaron a cabo con el kit de enzimas de restricción FastDigest Value Pack (Thermo Fisher Scientific, California USA) siguiendo el protocolo y especificaciones del fabricante.

#### Ligación de fragmentos de ADN en vectores purificados

Las reacciones de ligación entre los fragmentos de ADN purificados (previamente amplificados y/o restringidos) y los vectores destino se llevaron a cabo con T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific, California USA) siguiendo el protocolo y especificaciones del fabricante.

#### Agroinfiltración en hojas de *Nicotiana tabacum*

Se llevó a cabo la preparación de un preinóculo de *A. tumefaciens* transformada con el vector de interés en 6 ml de medio YEB con 100 µg/mL de rifampicina, y 50 µg/mL de espectinomicina, se incubó a 28 °C a 180 rpm toda la noche. Posterior a la incubación se tomaron 2 mL de este preinóculo para preparar un inóculo de 250 mL de YEB con 100 µg/mL de rifampicina y 50 µg/mL de espectinomicina en matraz de 1L (relación 1:3 de volumen para mantener la correcta aereación). Se midió el crecimiento bacteriano considerando la densidad óptica a 600 nm hasta alcanzar valor de 1-1.5. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se centrifugó a 6000 rpm 25 minutos a 4 °C en tubos de 50 mL desechando el sobrenadante; en seguida la pastilla bacteriana obtenida se resuspendió en 1 mL de medio de infiltración, se recuperó en tubos de 1.5 mL y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente, se infiltró con un embolo en el envés de hojas de *Nicotiana tabacum*. La agroinfiltración se llevó a cabo con jeringas de insulina sin aguja previamente cargadas con 1 mL de *A. tumefaciens*. Las platas agroinoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento vegetal (Witeg, ThermStable GC-100, Alemania) a 25 °C, 50% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

## Reactivos

*Tabla 4. Enzimas usadas en este trabajo*

Enzima	Casa comercial	Número de catálogo
RNAasa	Zimoresearch	
T4 DNA ligase	Thermo Fisher Scientific, California USA	EL0011
Dream Taq polimerasa	Thermo Fisher Scientific, California USA	EP0702
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, California USA	F530S
DNA Blunting Enzyme	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1231
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Thermo Scientific, California USA	28025-013

*Tabla 5. Enzimas de restricción usadas en este trabajo, se describe el sitio de corte*

Enzima	Casa comercial	Número de catálogo	Sitio de corte
XhoI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...C▼TCGA G...3' 3'...G AGCT▲C...5'
EcoRI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...G▼AATT C...3' 3'...C TTAA▲G...5'
XbaI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...T▼CTAG A...3' 3'...A GATC▲T...5'
KpnI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...G GTAC▼C...3' 5'...C▲CATG G...3'

NotI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...GC▼GGCC GC...3' 3'...CG CCGG▲CG...5'
Eco321	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...GAT▼ATC...3' 3'...CTA▲TAG...5'
NdeI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...CA▼TA TG...3' 3'...GT AT▲AC...5'
SmaI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...CCC▼GGG...3' 3'...GGG▲CCC...5'
BglII	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...A▼GATC T...3' 3'...T CTAG▲A...5'
BamHI	Thermo Fisher Scientific, California USA	K1991	5'...G▼GATC C...3' 3'...C CTAG▲G...5'

Tabla 6. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmidos	Resistencia a antibiótico
pEarleyGate 101	Kanamicina
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Ampicilina
pHDE-35S-Cas9-mCherry	Espectinomicina

Tabla 7. Antibióticos usados en este trabajo

Antibiótico	Solución stock	Solución de trabajo
Kanamicina	50 mg/mL	50 µg/mL
Rifampicina	50 mg/mL	100 µg/mL
Espectinomicina	100 mg/mL	100 µg/mL
Ampicilina	50 mg/mL	50 µg/mL

## CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

*E. coli* DH5 $\alpha$

*A. tumefaciens* EHA101 con vector binario pTIBO542

### RESULTADOS

Diseño *in silico* de plásmido de expresión para plantas

El diseño *in silico* de las modificaciones sobre el vector pEarleyGate101 se llevaron a cabo con el programa bioinformático SnapGene versión 4.2.6, en donde se analizó la presencia de sitios de corte por enzimas de restricción para escindir un fragmento de 2573 pb ubicado entre el nucleótido 2652 posterior al promotor CaMV35S y el nucleótido 5224 antes del terminador OCS, donde se encuentran codificadas una toxina que afecta a la ADN girasa y que actúa como agente de selección, una cloranfenicol acetiltransferasa, estos flanqueados por los sitios de recombinación para clonación Gateway attR, y la proteína amarillo fluorescente (YFP por Yellow Fluorescent Protein). El análisis mostró que la enzima XhoI, permite la escisión de un fragmento de 2448 pb desde el nucleótido 2654 al 5102 (Figura 9). Además, se analizaron los patrones electroforéticos resultantes por el proceso de digestión del plásmido.

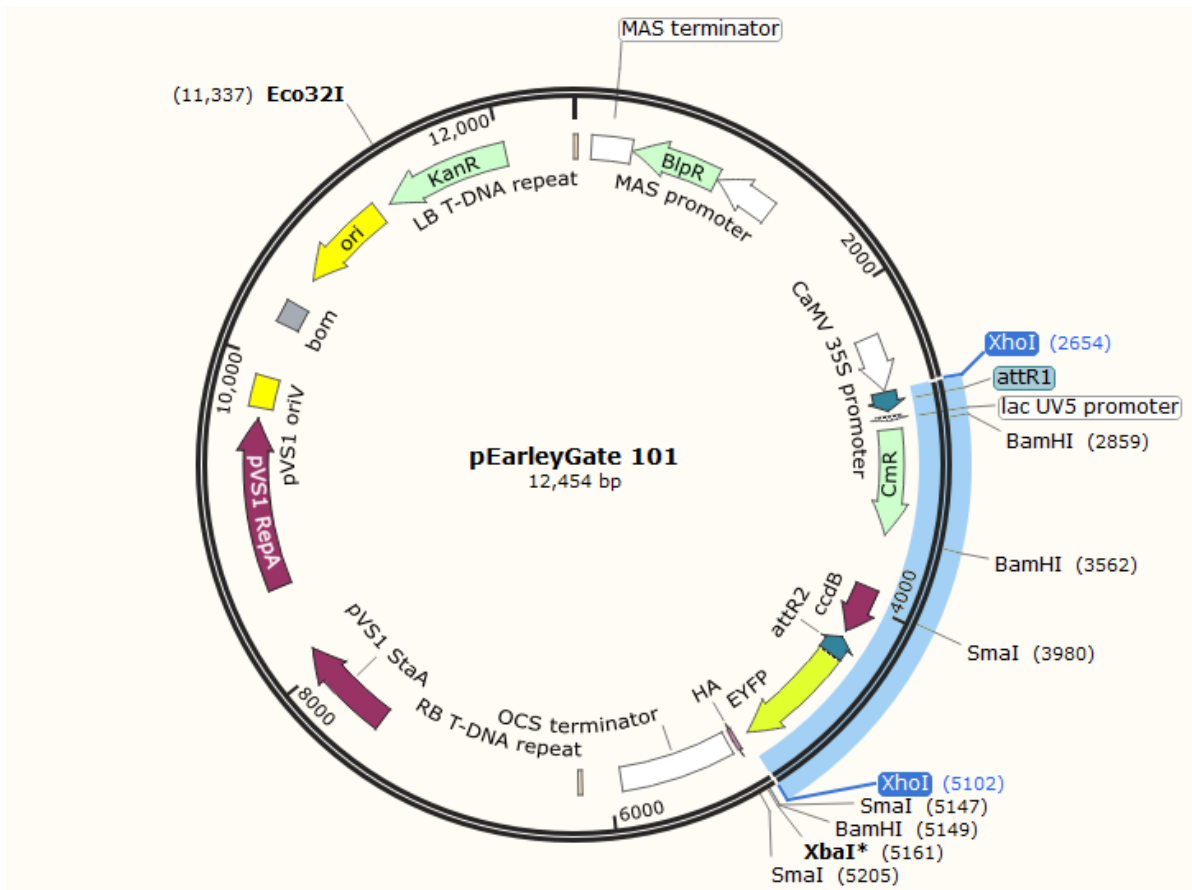


Figura 9. Representación del plásmido pEarleyGate 101. Se muestra el fragmento de 2448 pb que codifica la toxina que afecta a la ADN girasa (flecha morada con la etiqueta ccdB), el gen de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (flecha verde con la etiqueta CmR), los sitios de recombinación para clonación Gateway attR, y YFP (flecha amarilla etiquetada como EYFP), resaltados en azul los sitios para la enzima XhoI.

Dentro de las modificaciones que se planteó realizar al vector plasmídico pEarleyGate101, fueron la integración del gen de resistencia a espectinomicina interrumpiendo el gen de resistencia a kanamicina y la integración del gen reportero mCherry, posicionando a este último entre el promotor CaMV35S y el terminador OCS (Figura 10).

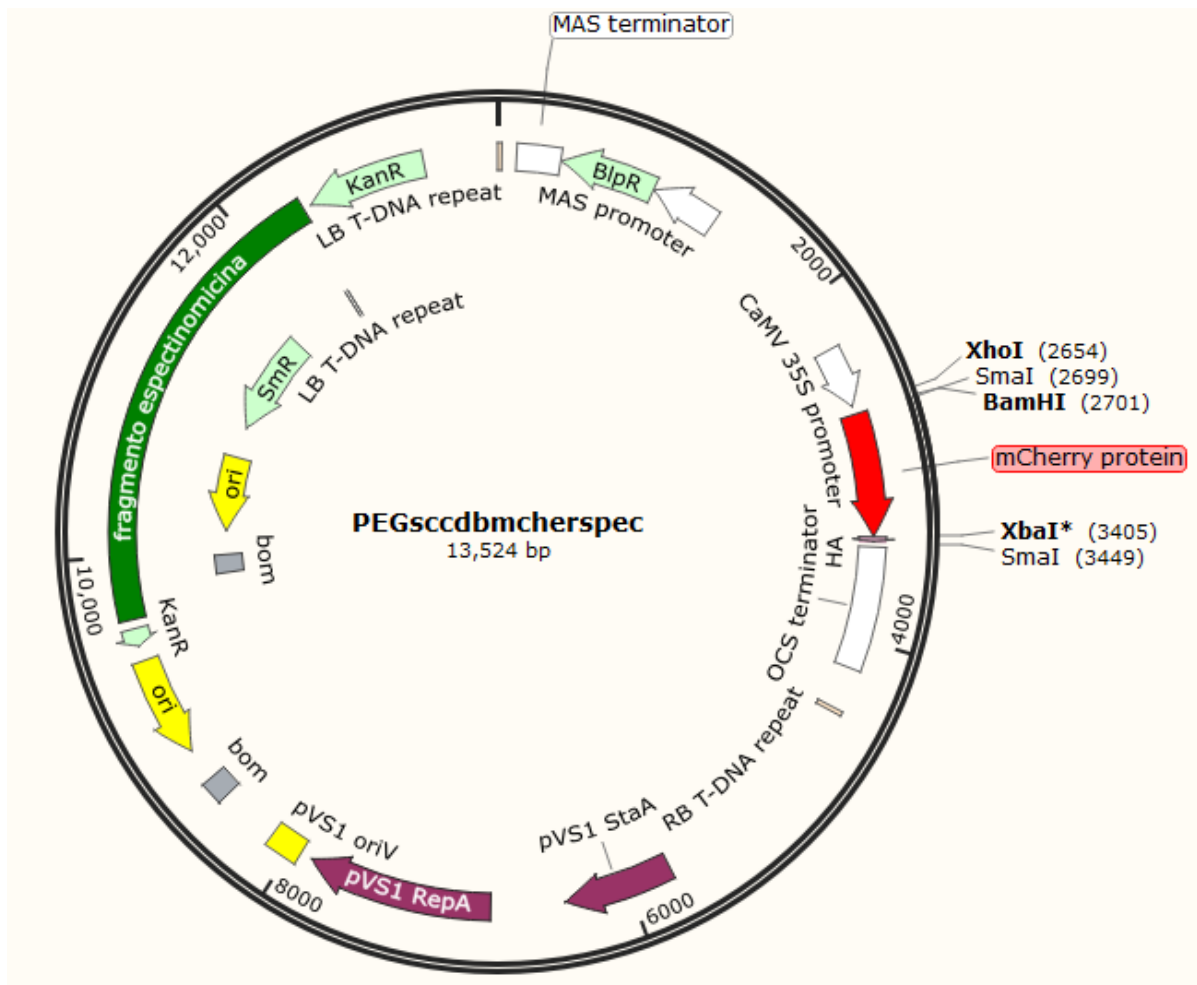
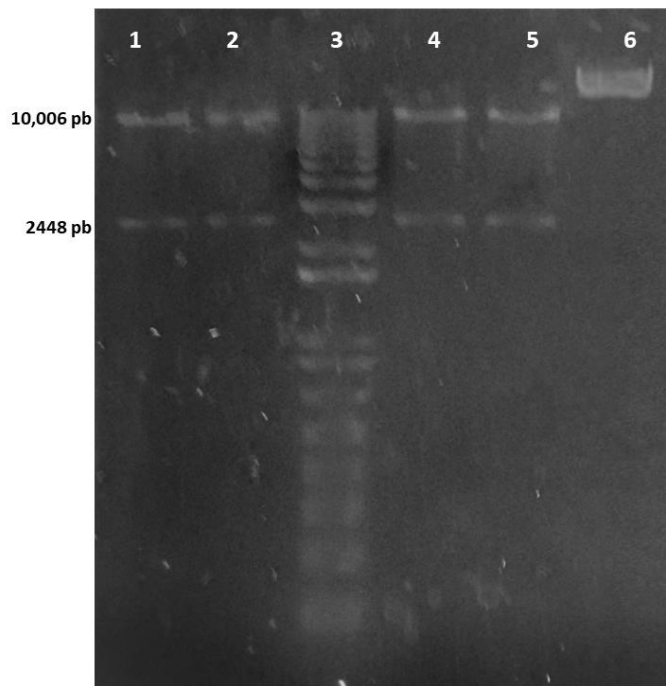


Figura 10. Eliminación de *ccdB*, cambio de resistencia a antibiótico a espectinomicina y adición de *mCherry* (pEG-s/*ccdB*-*mCherry*-spec)

### Primera modificación al plásmido pEarleyGate101

Para generar los cambios planteados en el análisis *in silico* al vector, se partió de 1 µg de plásmido pEarleyGate101 para ser digerido con la enzima XhoI esto se realizó por duplicado y se adicionó un control negativo; posterior a la inactivación de la enzima por calor, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, a 95 volts por 35 minutos, el patrón electroforético mostrado en la figura 11 permite visualizar dos fragmentos, uno de 2448 pb correspondiente al sitio de recombinación Gateway y YFP; el segundo fragmento de 10,006 pb correspondiente al plásmido linealizado (Figura 11).



*Figura 11. Digestión del plásmido pEarleyGate 101 con la enzima XhoI (carriles 1, 2, 4 y 5); las bandas superiores (10,006 pb acorde al análisis in silico) corresponden al plásmido linearizado, en la parte inferior las bandas de 2448 pb pertenecen a la escisión de los sitios att, ccdB, YFP y resistencia a cloranfenicol; carril 3 marcador de pares de bases; carril 6 control negativo, plásmido sin digerir.*

El fragmento de 10,006 pb fue extraído y purificado del gel y ligado con T4 ADN ligasa (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA); con el producto de esta reacción, se transformaron células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (Figura 12A), se realizó la selección de cinco colonias transformadas y mediante lisis alcalina se extrajeron los plásmidos, una vez obtenidos se sometieron a separación electroforética para verificarla calidad y hacer una aproximación de la concentración (Figura 12B).

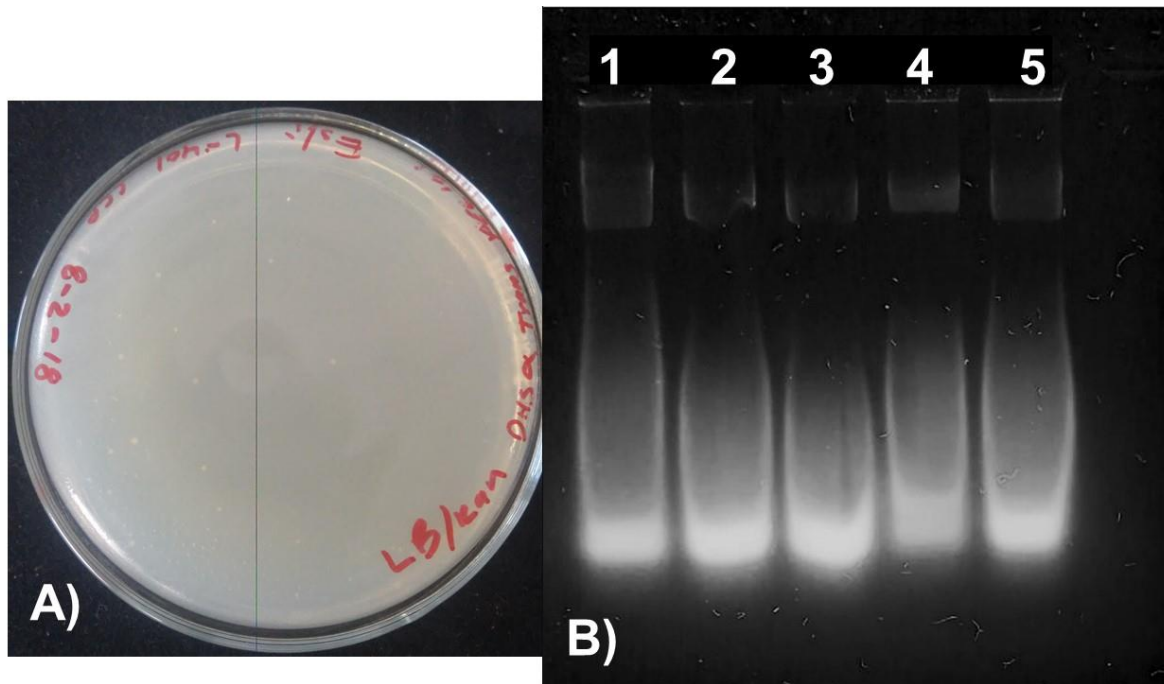


Figura 12. A) Transformación de bacterias *E.coli* DH5α con el plásmido pEarleyGate 101 modificado al que se le escindió el fragmento con el gen *ccdB* de muerte . B) Electroforesis de los plásmidos extraídos de colonias candidatas a portar el vector pEarleyGate 101 modificado (pEG-s/*ccdB*). Cinco colonias seleccionadas; carril 1: plásmido colonia 1; carril2: plásmido colonia 2; carril 3: plásmido colonia3; carril 4: plásmido colonia 4; carril 5: plásmido colonia 5.

Para corroborar que el plásmido extraído correspondiera al fragmento de 10,006 pb, se realizaron reacciones de digestión con la enzima EcoRI, el análisis *in silico* indica que la presencia de dos sitios para esta enzima generando un fragmento de 1353 pb y uno de 8653 pb (Figura 13); después de la reacción, el producto fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, a 95 volts por 50 minutos (Figura 14) esto permitió evidenciar la presencia del fragmento de 1353 pb esperado a partir de los plásmidos extraídos de las cinco colonias bacterianas seleccionadas, estas se almacenaron a -70°C en medio LB líquido con 15% de glicerol.

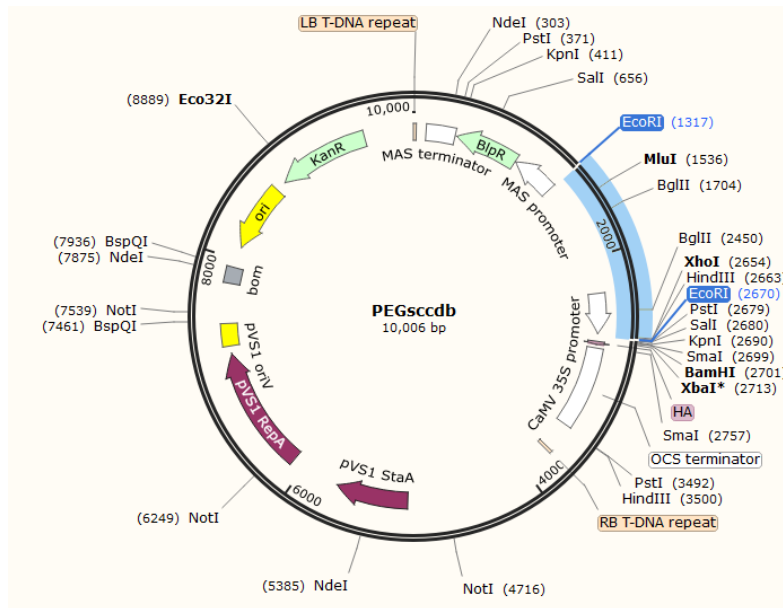


Figura 13. Esquema del plásmido pEG-s/ccdB producido *in silico*, se muestra en azul el fragmento que es escindido con la enzima EcoRI.

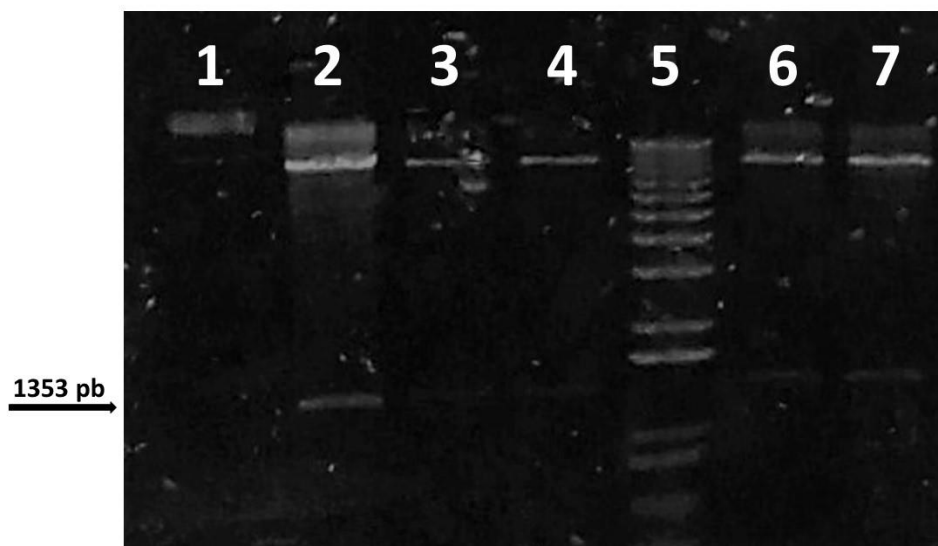


Figura 14. Digestión pEG-s/ccdB con EcoRI. Carriles 2, 3, 4, 6 y 7 digestión pEG-s/ccdB con EcoRI; la liberación del fragmento 1353 pb demuestra la presunta recircularización correcta del plásmido, además de que el fragmento escindido con XhoI ya no está en el vector, dejando entre el promotor CaMV 35S y el terminator OCS solo el sitio múltiple de clonación vacío; carril 5: referencia de pares de bases; carril 6: control negativo, plásmido sin digerir.

### Inserción del gen reportero mCherry

Con la finalidad de generar un plásmido que posea un gen reportero, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR mCherry a estos oligonucleótidos se les

adicionaron los sitios para las enzimas de restricción BamHI para el oligonucleótido forward y XbaI al oligonucleótido reverso (Tabla 3), se estandarizaron las condiciones de la PCR punto final usando un gradiente a 61, 63 y 65°C para establecer el correcto alineamiento de los oligonucleótidos; para estas reacciones se tomó como molde el vector pHDE-35S-Cas9-mCherry. Los resultados de estas PCRs mostraron la amplificación de un fragmento de 710 pb (Figura 15A).

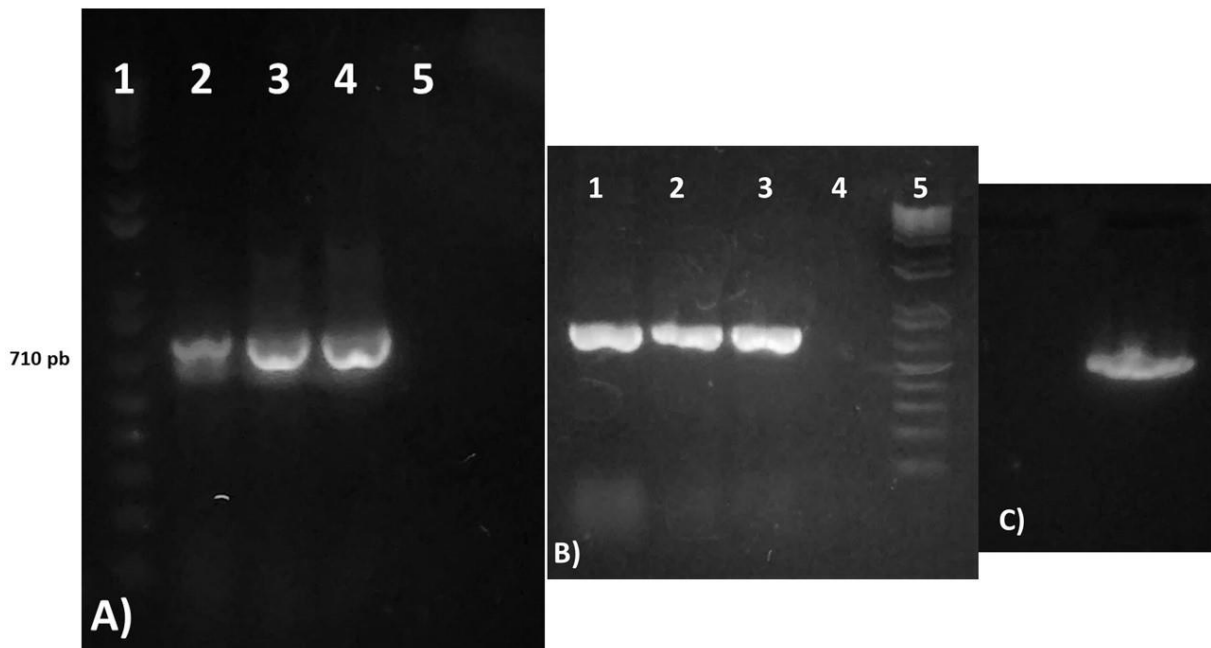


Figura 15. Aislamiento de mCherry. A) Estandarización de la PCR punto final para la amplificación de mCherry. PCR con gradiente de temperatura. Carril 1: Referencia de pares de bases; carril 2: 60°C; carril 3: 63.3°C; carril 4: 65°C; carril 5 control negativo sin templado. PCR punto final para mCherry y purificación de banda. B) Amplificación de mCherry de 710 pb por triplicado, carriles 1, 2, 3; carril 4 control negativo sin templado; carril 5: Referencia de pares de bases. C) Comprobación del rendimiento de la purificación del producto de PCR.

Una vez estandarizada la reacción empleando 63°C para el alineamiento, se realizó por triplicado PCR punto final; el producto fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0,9%, a 95 volts por 35 minutos; el fragmento esperado de 710pb se escindió y se purificó (Figura 15 B y C), dado que las enzimas BamHI y XbaI que reconocen entre el promotor CaMV 35S y el terminador OCS del plásmido para la inserción dirigida de mCherry como lo muestra el análisis *in silico* (Figura 16), se realizó una doble digestión usando del producto de PCR purificado y al plásmido (Figura 17), después de inactivar las enzimas, los productos de digestión por restricción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, posteriormente, se escindieron las bandas de los fragmentos esperados, se purificaron y se pusieron en

una reacción de ligación con T4 ADN Ligasa (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) para posteriormente realizar una transformación de células *E. coli DH5α* competentes mediante choque térmico, finalmente fueron sembradas en una placa de LB sólido con kanamicina 50µg/mL y se incubaron a 37°C toda la noche. Después de la incubación, se observó el crecimiento de colonias puntiformes candidatas a portar el plásmido (Figura 18 A); se seleccionaron y aislaron seis colonias las cuales fueron sembradas en medio LB líquido e incubadas a 37°C en agitación por 8 horas, una vez que el cultivo proliferó se realizó la extracción de plásmido por lisis alcalina el ADN plasmídico obtenido fue separado electroforéticamente en gel de agarosa (Figura 18 B); posteriormente se realizaron PCRs punto final para cada plásmido con lo que se corroboró la inserción del fragmento de 710 pb perteneciente al gen reportero mCherry (Figura 18 C). Las colonias bacterianas que dieron positivo en la PCR fueron almacenadas a -70°C en medio LB con glicerol al 15%.

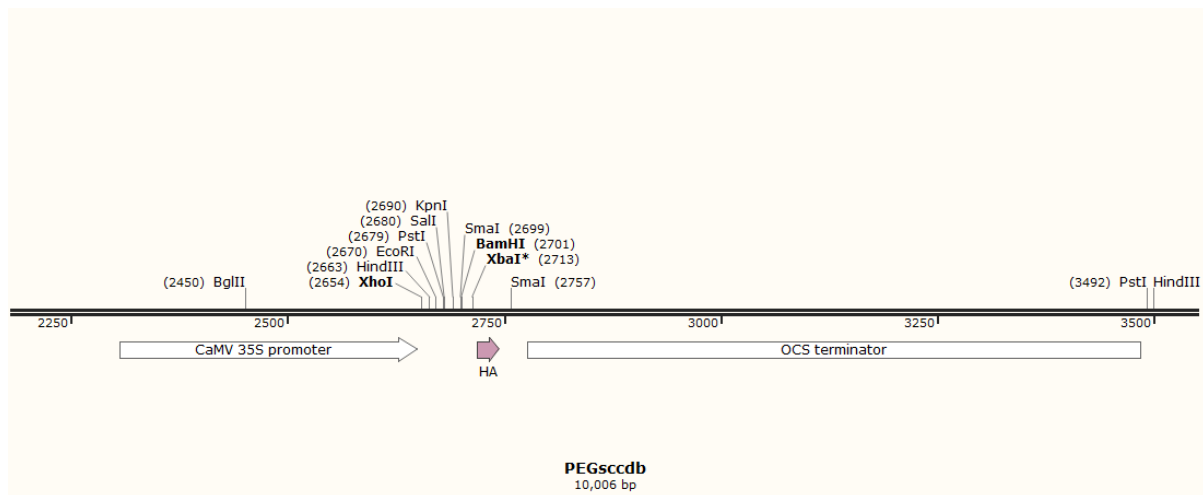


Figura 16. Sitio múltiple de clonación del vector pEG-s/ccdB in silico. Visualización in silico del sitio múltiple de clonación del vector pEG-s/ccdB, para llevar a cabo la inserción de mCherry cortando BamHI y XbaI.

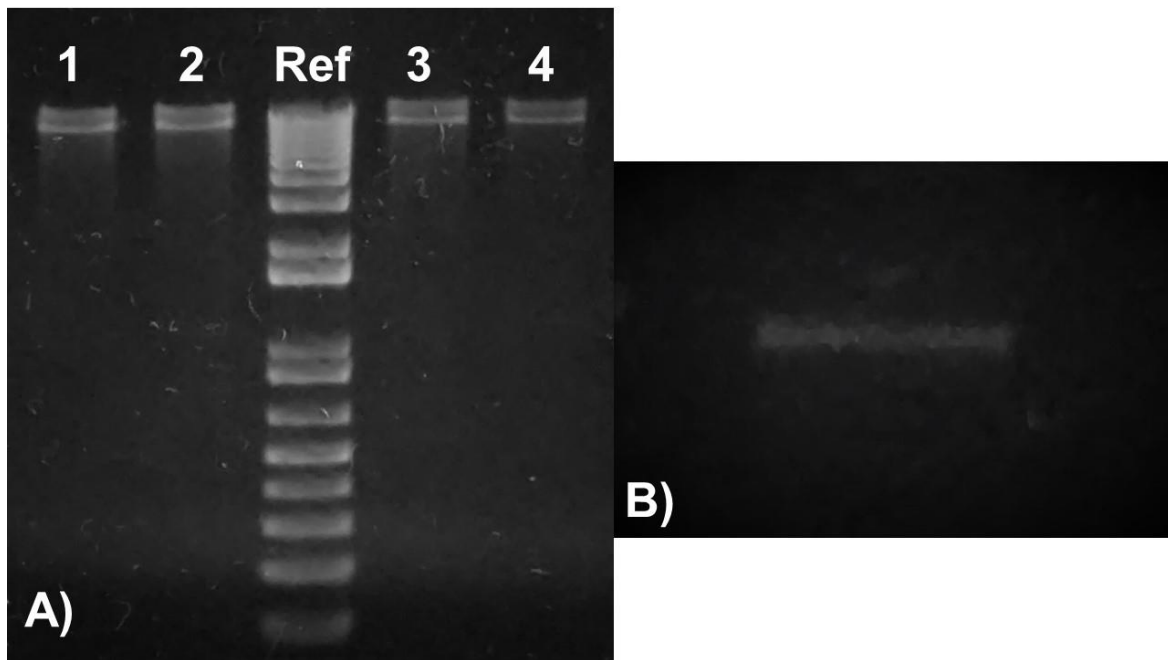


Figura 17. Linearización de pEG-s/ccdB con BamHI y XbaI y purificación de banda. A) Gel de electroforesis, doble digestión del vector pEG-s/ccdB con BamHI y XbaI para clonar mCherry direccionado (1, 2 y 3); REf: referencia de pares de bases referencia; 4: control negativo, plásmido sin digerir. B) Purificación de pEG-s/ccdB digerido y visualización de la calidad de la purificación en 2  $\mu$ L de 10  $\mu$ L recuperados.

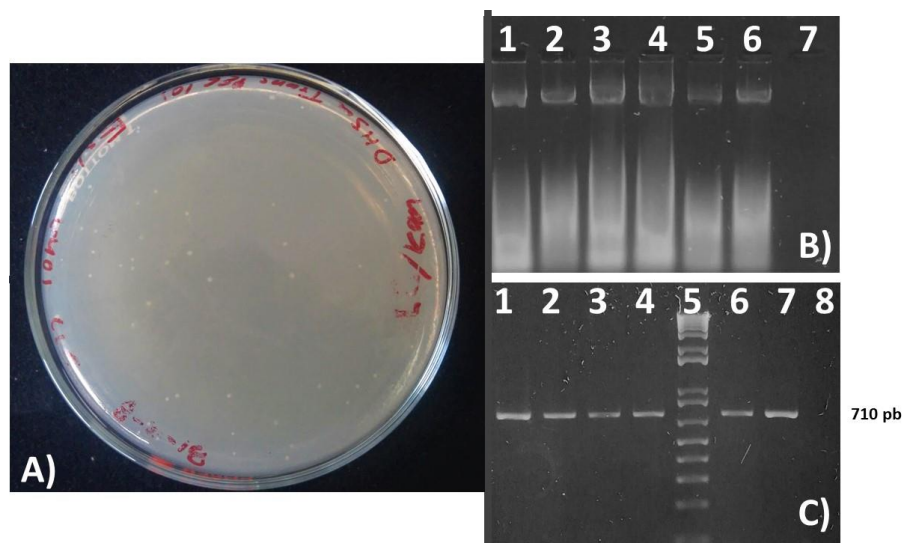


Figura 18. Transformación y selección de pEG-s/ccdB con mCherry. A) Transformación del vector pEG-s/ccdB con mCherry en *E. coli* DH5 $\alpha$ . B) extracción de Plásmidos pEG-s/ccdB-mCherry seleccionados; 1: plásmido colonia 1; 2: plásmido colonia 2; 3: plásmido colonia 3; 4: plásmido colonia 4; 5: plásmido colonia 5; 6: plásmido colonia 6; 7: control negativo agua. C) PCR puno final sobre los plásmidos (B) para corroborar la integración de mCherry (710 pb) al vector; 1: colonia 1; 2: colonia 2; 3: colonia 3; 4: colonia 4; 5: referencia de pares de bases referencia; 6: colonia 5; 7: colonia 6; 8: control negativo sin templado.

Cambio del gen de resistencia a antibiótico a espectinomicina

Con la intención de añadir a los plásmidos pEG-s/ccdB (Figura 19A) y pEG-s/ccdB modificado con mCherry (pEG-s/ccdB-mCherry) (Figura 19B) el gen de resistencia a

espectinomycin, se hizo un análisis *in silico*, el cual indicó la presencia de un sitio único de corte por la enzima Eco32I dentro del gen de Kanamicina dejando extremos romos, así mismo, se encontraron sitios de restricción para las enzimas KpnI y NotI en el vector pHDE-35S-Cas9-mCherry el corte por restricción con estas enzimas genera 6 fragmentos de 8125 pb, 2826 pb, 1532 pb, 1498 pb, 12490 pb y 172 pb, siendo el de 2826 pb el que contiene un caset de resistencia a espectinomycin (Figura 20).

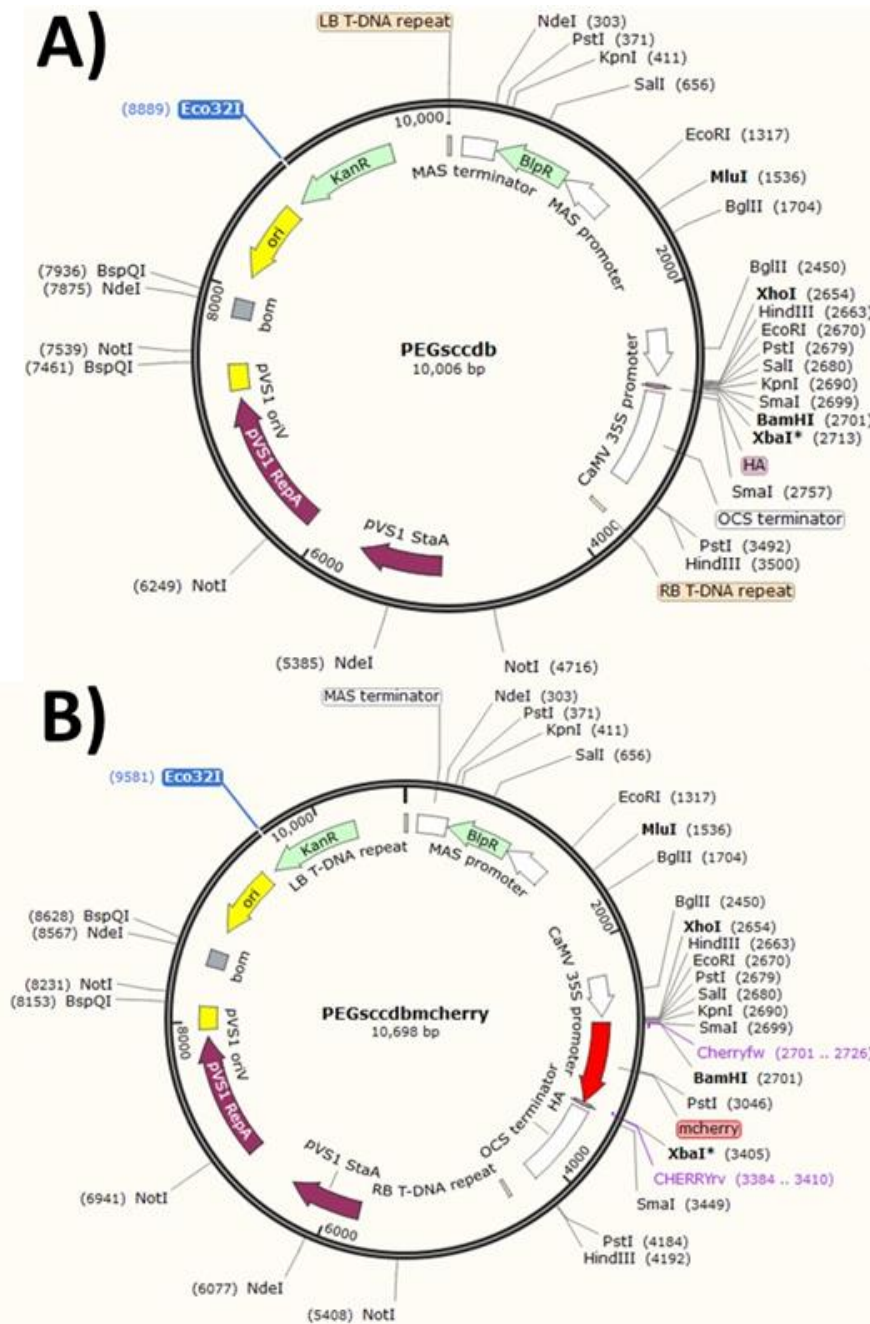


Figura 19. Diagrama de los vectores A) pEG-s/ccdB y B) pEG-s/ccdB-mCherry, se muestra resaltado en azul el sitio Eco32I dentro del gen de resistencia a Kanamicina.

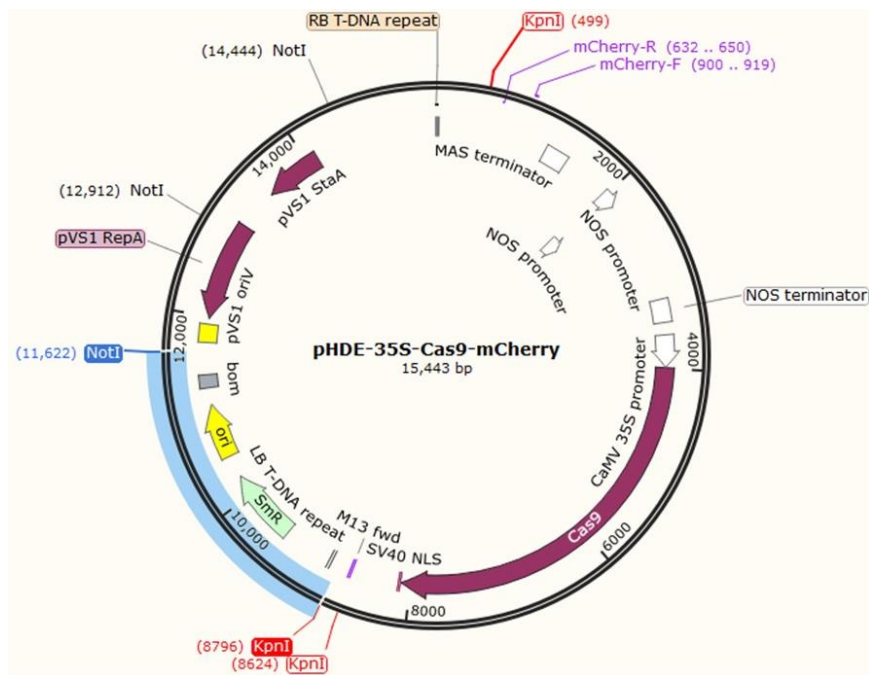


Figura 20. Plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry. Visualización *in silico* del fragmento que contiene el gen de resistencia a espectinomicina (sección resaltada en azul) flanqueado por las enzimas NotI y KpnI.

Los plásmidos pEG-s/ccdB y pEG-s/ccdB-mCherry fueron puestos en reacción de corte con la enzima Eco32I, paralelamente el plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry fue puesto en una reacción de corte con las enzimas KpnI y NotI, los productos de estas reacciones fueron sometidos a separación electroforética en geles de agarosa como se puede observar en la Figura 21A para el plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry donde se aprecia la banda correspondiente al fragmento de 2826 pb y en la Figura 21B donde se visualizan un fragmento superior a las 10 Kb correspondiente a los vectores pEG-s/ccdB y pEG-s/ccdB-mCherry linealizados, seguidamente se escindieron las bandas con los fragmentos de interés y se realizó su purificación para luego poner al fragmento de 2826 pb portador del gen de resistencia a espectinomicina en una reacción para generar extremos romos y ser añadido a reacciones de ligación con los vectores pEG-s/ccdB y pEG-s/ccdB-mCherry linealizados usando T4 ADN Ligasa.

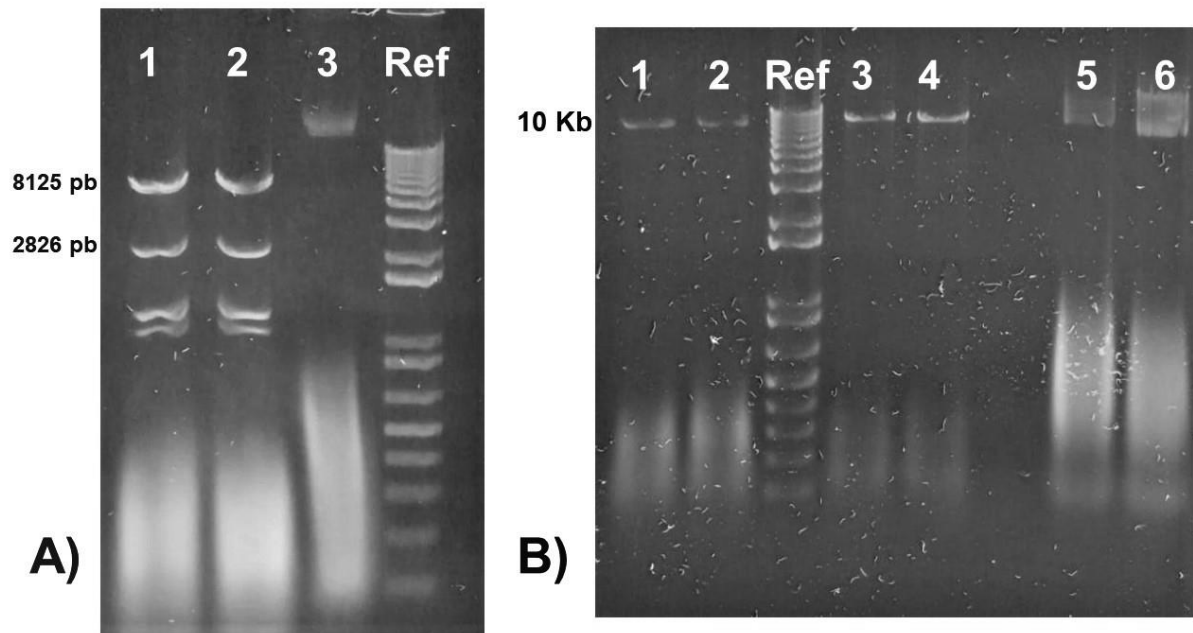


Figura 21. Digestión de pHDE-35S-Cas9-mCherry, pEG-s/ccdB, pEG-s/ccdB-mCherry y purificación de banda. A) Doble digestión del vector pHDE-35S-Cas9-mCherry con NotI y KpnI (carriles 1 y 2); carril 3: control negativo plásmido sin digerir; Ref: Referencia de pares de bases. Banda de interés 2826 pb contiene gen de resistencia a espectinomicina. B) Digestión de los vectores pEG-s/ccdB y pEG-s/ccdB-mCherry con Eco32I; 1 y 2: pEG-s/ccdB; 3 y 4 pEG-s/ccdB-mCherry; 5: control negativo sin digerir pEG-s/ccdB; 6: control negativo sin digerir y pEG-s/ccdB-mCherry; Ref: referencia de pares de bases. El barrido que aparece inferior a los 1000 pb corresponde a RNA ya que en estas reacciones no se empleó RNAsa.

Luego se realizó la transformación por choque térmico de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes con cada producto de ligación y se sembró en placa de LB sólido con 50 $\mu$ g/mL espectinomicina, se incubó a 37oC toda la noche y se observó crecimiento de colonias puntiformes candidatas a portar la construcción plasmídica generada (Figura 22).

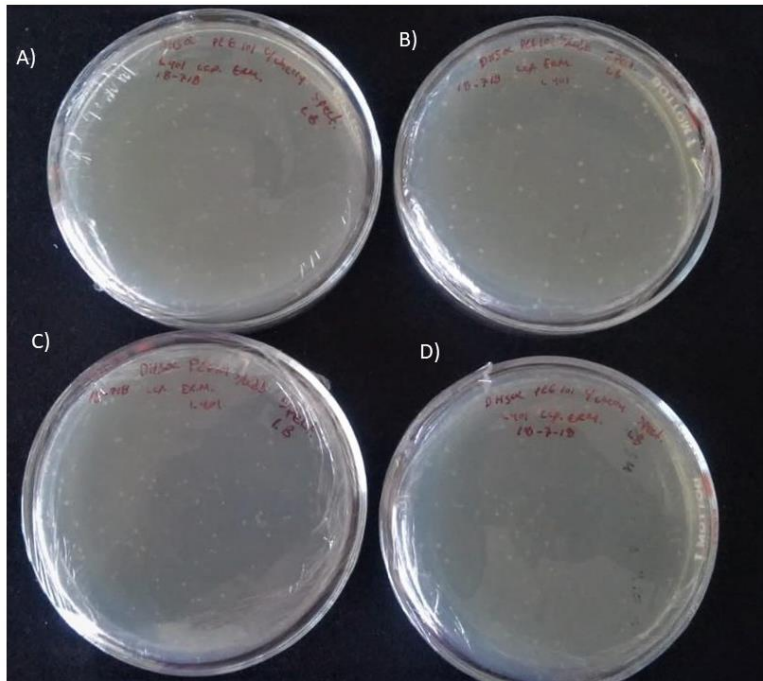


Figura 22. *pEG-s/ccdB-mCherry-spec* y *pEG-s/ccdB-spec* en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Transformación de los vectores *pEG-s/ccdB-mCherry-spec* (A, D) y *pEG-s/ccdB-spec* (B, C) por duplicado en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se seleccionaron y aislaron colonias que fueron puestas a crecer en medio LB sólido y líquido en ambos casos en presencia de espectinomicina, para realizar la extracción de plásmido por lisis alcalina, la integridad de los plásmidos fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa (Figura 23).

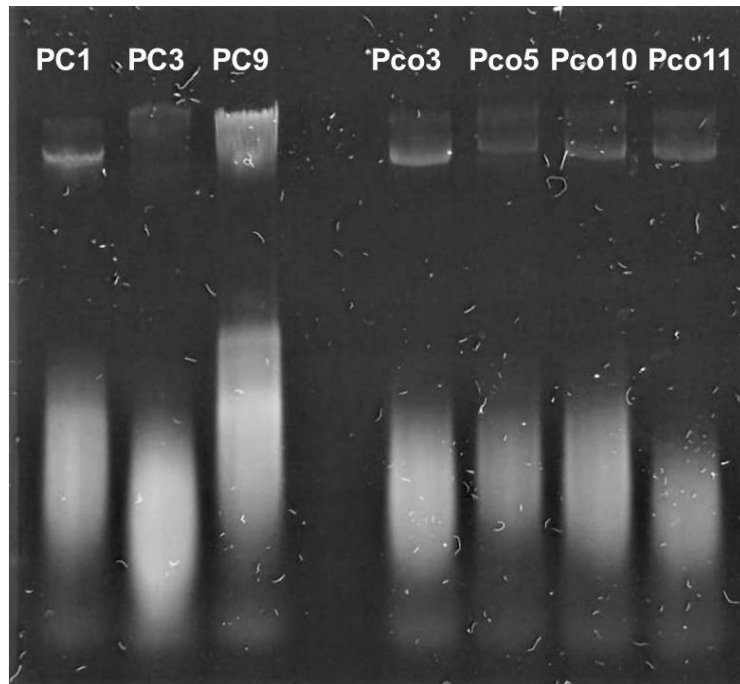


Figura 23. Plásmidos extraídos de colonias candidatas seleccionadas; pEG-s/ccdB-mCherry-spec a la derecha; PC1: plásmido colonia 1; PC3: plásmido colonia 3; PC9: plásmido colonia 9. pEG-s/ccdB-spec a la izquierda; Pco3: plásmido colonia 3; Pco5: plásmido colonia 5; Pco10: plásmido colonia 10; Pco11: plásmido colonia 11.

Para confirmar la presencia y dirección del fragmento que codifica la resistencia a espectinomicina se hizo un análisis *in silico* con el cual se determinó el uso de la enzima de restricción NdeI para generar un patrón electroforético que incluyera bandas correspondientes a fragmentos de 5774, 3914, 2490 y 1346 pb para el vector pEG-s/ccdB-mCherry-spec (Figura 24A) y 5082, 3914, 2490 y 1346 pb para el vector pEG-s/ccdB-spec (Figura 24B).

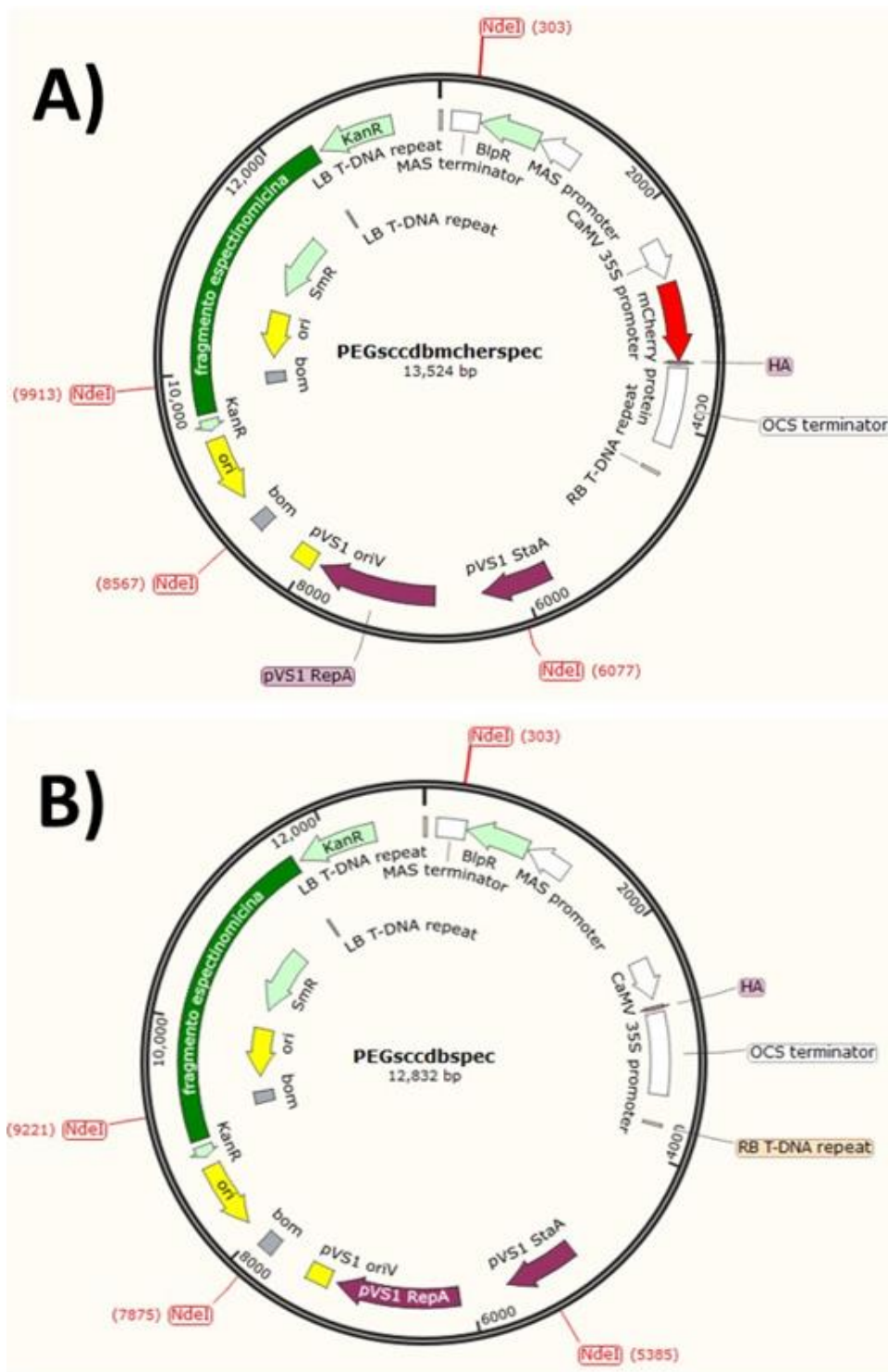
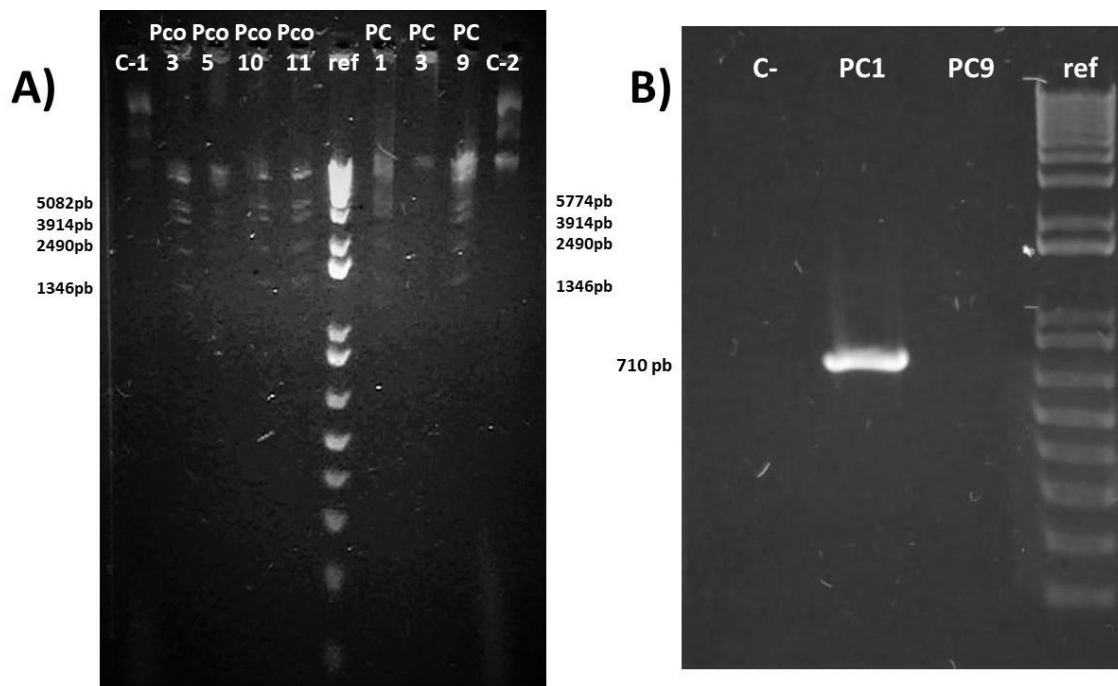


Figura 24. Esquema de los plásmidos pEG-s/ccdB-mCherry-spec y pEG-s/ccdB-spec. Se muestra la integración del fragmento de resistencia a espectinomicina (SmR) **A**) en el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry; **B**) y al plásmido pEG-s/ccdB; la inserción se llevó a cabo interrumpiendo el gen de resistencia a kanamicina (Kan R).

Una vez realizada la reacción de corte con la enzima de restricción NdeI de los siete plásmidos obtenidos, se realizó la electroforesis en gel de agarosa, el patrón observado permitió ver las bandas esperadas (Figura 25A).

Adicionalmente, con la finalidad de corroborar la estabilidad del plásmido obtenido se realizó PCR punto final para amplificar el fragmento codificante de para mCherry con los plásmidos PC1 y PC9, el patrón electroforético de estas PCRs mostró la amplificación a partir de solo el plásmido PC9 (Figura 25B). Los plásmidos pEG-s/ccdB con caset de resistencia a espectinomicina fueron nombrados como pEG-s/ccdB-spec y para pEG-s/ccdB-mCherry con caset de resistencia a espectinomicina pEG-s/ccdB-mCherry-spec (Figura 24A y B).



**Figura 25.** Digestión enzimática con NdeI de los plásmidos pEG-s/ccdB-mCherry-spec y pEG-s/ccdB-spec y PCR de los plásmidos pEG-s/ccdB-mCherry-spec. A) Digestión con NdeI confirmatoria de la inserción del fragmento codificante de resistencia a espectinomicina; C-1: control negativo pEG-s/ccdB-spec sin digerir; Pco3: pEG-s/ccdB-spec colonia 3; Pco5: pEG-s/ccdB-spec colonia 5; Pco10: pEG-s/ccdB-spec colonia 10; Pco11: pEG-s/ccdB-spec colonia 11. Ref: referencia de pares de bases. PC1: pEG-s/ccdB-mCherry-spec colonia 1; PC3: pEG-s/ccdB-mCherry-spec colonia 3; PC9: pEG-s/ccdB-mCherry-spec colonia 9; C-2: control negativo sin digerir pEG-s/ccdB-mCherry-spec. B) PCR para mCherry en pEG-s/ccdB-mCherry-spec PC1: plásmido colonia 1; PC9: plásmido colonia 9; C-: control negativo; ref: referencia de pares de bases.

Transformación en *A. tumefaciens* para agroinfiltración de *Nicotiana tabacum* y validación de la expresión de mCherry.

Finalmente, para probar que los plásmidos modificados fueran funcionales, se realizó la transformación por choque térmico de células competentes de *A. tumefaciens* con ambos plásmidos, después de sembrar en LB sólido con doble marcador de selección espectinomicina 50µg/mL y rifampicina 100µg/mL, se incubó a 28°C por 48 horas; se observó crecimiento de colonias puntiformes (Figura 26), de las cuales se seleccionaron y aislaron poniéndolas en medio LB sólido nuevo, paralelamente, para las colonias candidatas a poseer el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec se corroboró su presencia mediante colony PCR con oligonucleótidos para amplificar mCherry (Figura 27).

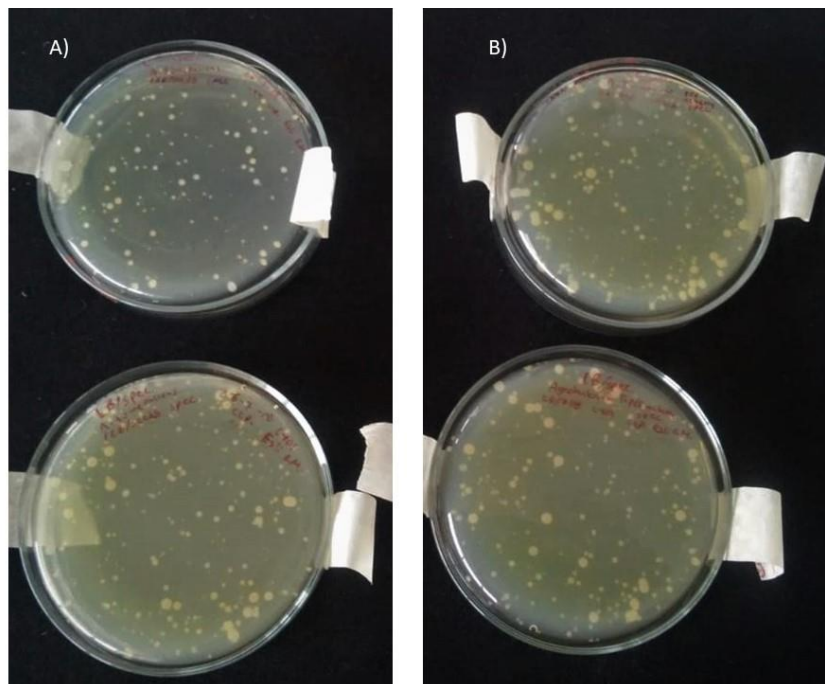


Figura 26. Transformación de *A. tumefaciens* con los plásmidos pEG-s/ccdB-spec (A) y pEG-s/ccdB-mCherry-spec (B).

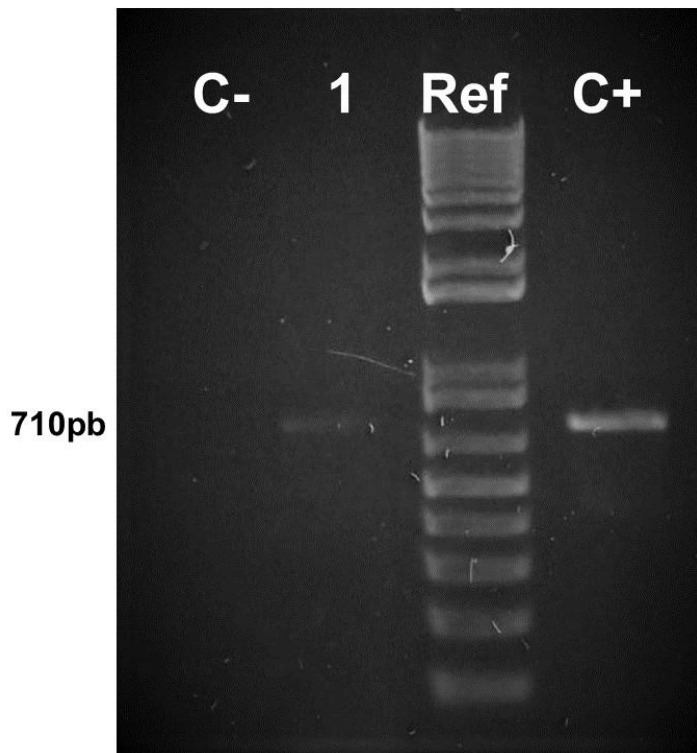
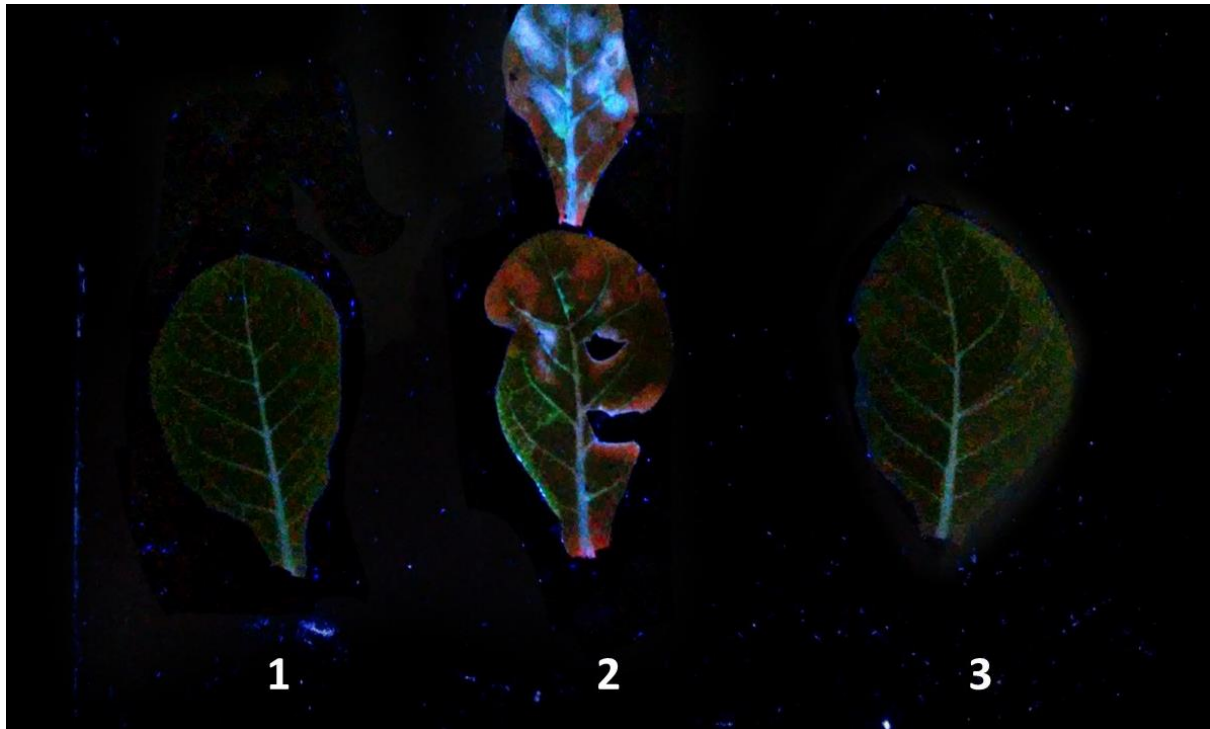


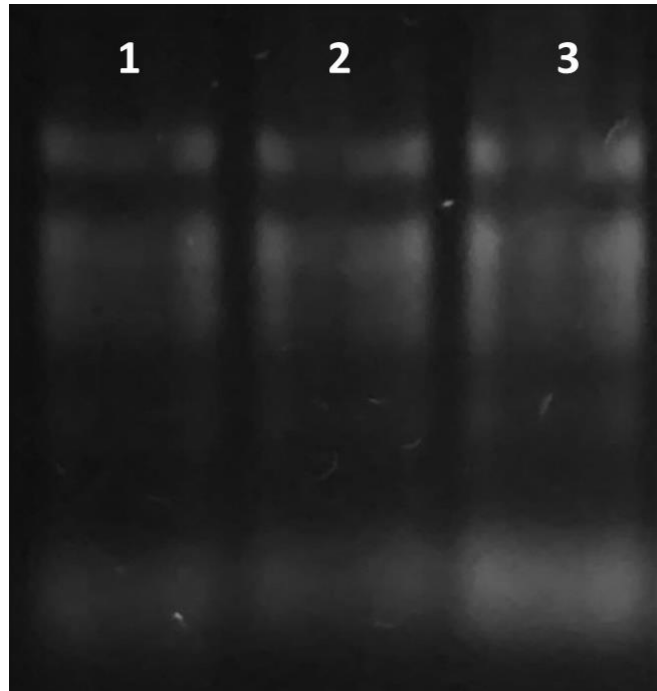
Figura 27. Colony PCR para amplificar mCherry a partir de colonias de *A. tumefaciens*. C-: control negativo sin templado; 1: colonia candidata de *Agrobacterium tumefaciens*; Ref: referencia de pares de bases; C+: control positivo pEG-s/ccdB-mCherry-spec templado.

Para la transformación de *N. tabacum* se preparó el inóculo con un cultivo fresco de *A. tumefaciens* portadora del plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec, y se agroinfiltraron plantas de *N. tabacum* de 3-4 semanas de edad sometidas a 16 horas de oscuridad previamente. Diez días después de la agroinfiltración se colectaron las hojas que habían sido agroinfiltradas así como hojas sistémicas y fueron observadas bajo luz UV (Figura 28), a pesar de que las hojas agroinfiltradas sufrieron daño mecánico al momento de ser manipuladas, se logró apreciar la emisión de fluorescencia en estas pero no en hojas sistémicas de las mismas plantas.



*Figura 28. Visualización en con luz UV de hojas de N. tabacum transformadas por agroinfiltración con el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec. 1: hoja control sin transformar; 2: hojas agroinfiltradas; 3: hoja sistémica de planta transformada.*

Con la finalidad de corroborar que el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec expresara el gen mCherry, se realizó la extracción de RNA total, a partir de hojas transformadas, hojas sistémicas y de hojas de plantas sin transformar, la calidad del RNA total se observó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 29).



*Figura 29. ARN total de hojas de N. tabacum transformadas con el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec. 1: hoja control sin transformar; 2: hojas agroinfiltradas; 3: hoja sistémica de planta transformada.*

Con el RNA total, se generaron ADNc usando oligo dT y un oligonucleótido específico para mCherry; después de realizar las PCR punto final para mCherry, se observó que al emplear los ADNc sintetizados con oligo dT no se logró visualizar amplificación; sin embargo al emplear los ADNc generados con el oligonucleótido específico para mCherry, se visualizó la amplificación del fragmento de 710 pb correspondiente a mCherry a partir del ADNc de las hojas agroinfiltradas (Figura 30), mientras que en las en las hojas sistémicas o hojas de plantas no transformadas, no se observó la amplificación.

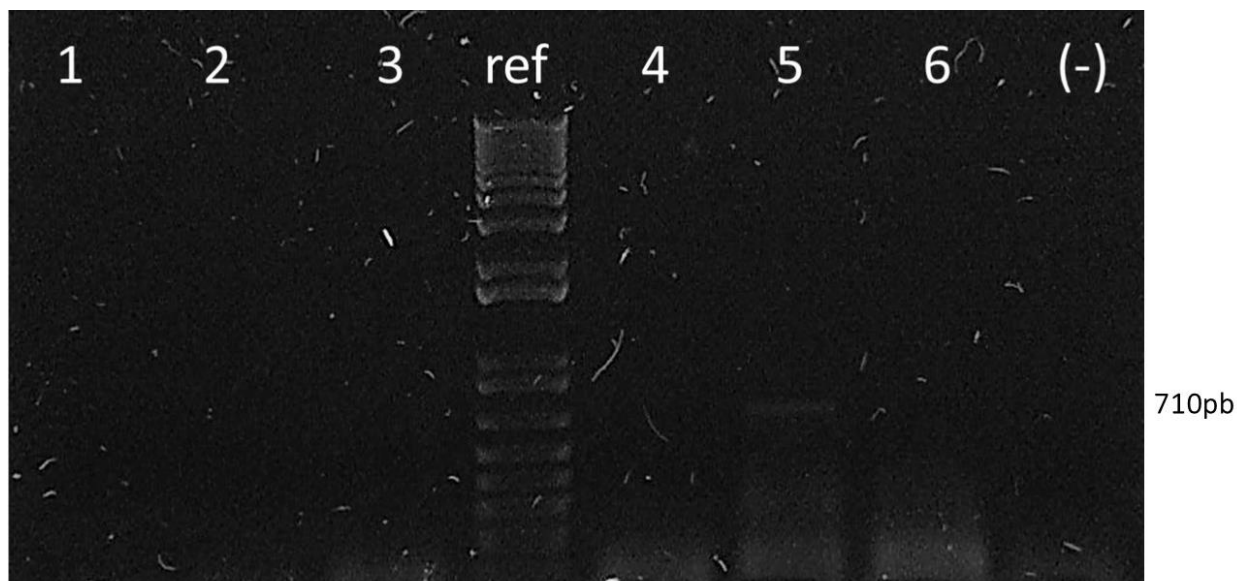
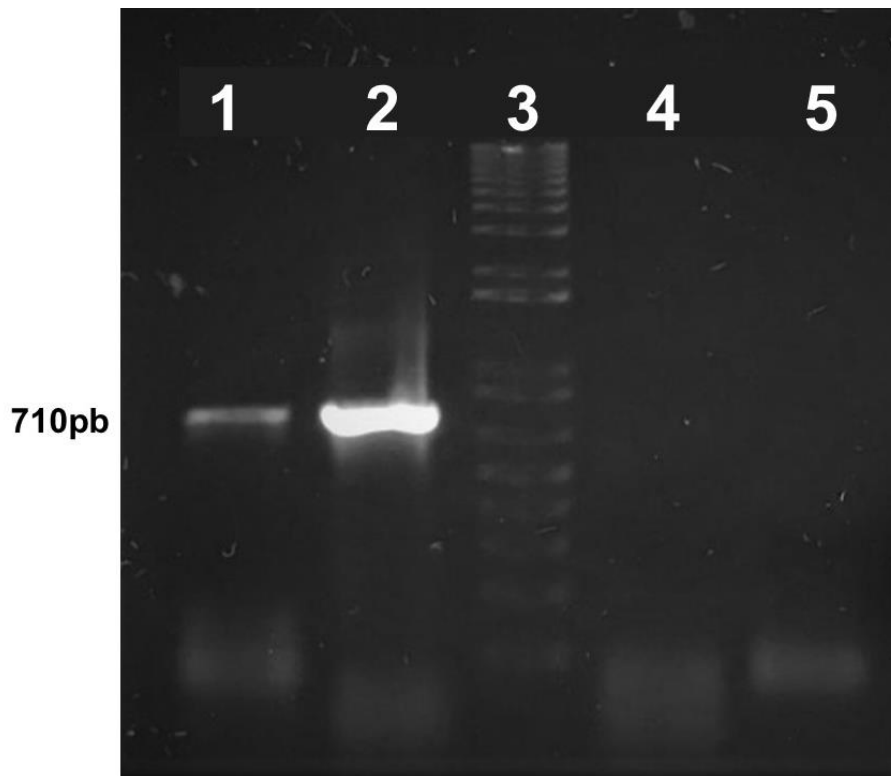


Figura 30. PCR de ADNc de ARN extraído de hojas de *N. tabacum*. 1, 2 y 3 ADNc con oligo dT; 4, 5 y 6 ADNc con oligo reverso mCherry. 1: ADNc hoja control sin transformar; 2: ADNc hojas agroinfiltradas directamente; 3: hoja nueva de planta transformada; ref: referencia de pares de bases; 4: ADNc hoja control sin transformar; 5: ADNc hojas agroinfiltradas directamente; 6: hoja nueva de planta transformada; (-): control negativo sin templado.

Para corroborar que la amplificación observada no fuera un falso positivo o una inespecificidad, se repitió la PCR usando el ADNc generado con el oligo para mCherry, aumentando la cantidad de ADNc y ciclos de amplificación, se empleó una dilución del plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec como control positivo, en una reacción se colocó RNA total como templado con la finalidad de descartar posible contaminación con plásmido y se agregó un control negativo sin templado. La electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR mostraron la amplificación del fragmento de 710 pb de mCherry en las que solo se usó el ADNc de hojas inoculadas y el control positivo correspondiente al plásmido diluido (Figura 31 carriles 1 y 2) también se descartó la posible contaminación con ADN plasmídico (Figura 31 carril 4).



*Figura 31. PCR para mCherry. 1: ADNc hojas agroinfiltradas; 2: control positivo pEG-s/ccdB-mCherry-spec como templado; 3: referencia de pares de bases; 4: control negativo ARN crudo de hojas agroinfiltradas como templado; 5: control negativo sin templado.*

Fusión transcripcional de mCherry y el gen Nla del Virus del Jaspeo del Jabaco

El gen Nla del Virus del Jaspeo del Tabaco (NlaTEV) se obtuvo a partir del plásmido pJet-TEV que previamente se había generado en el laboratorio, este plásmido se sometió a la reacción de corte con la enzima BglIII para corroborar que efectivamente el fragmento se encontraba clonado (Figura 32).

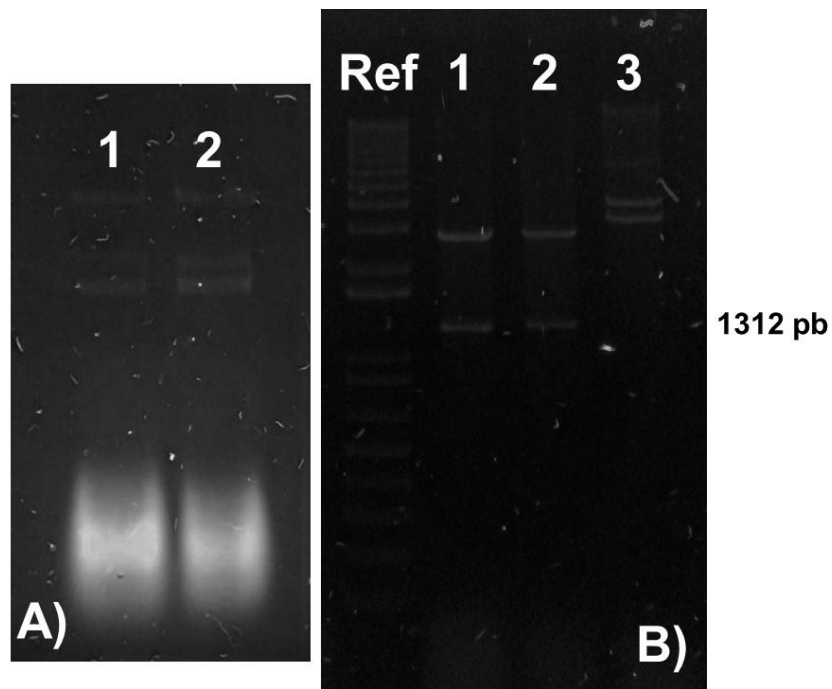
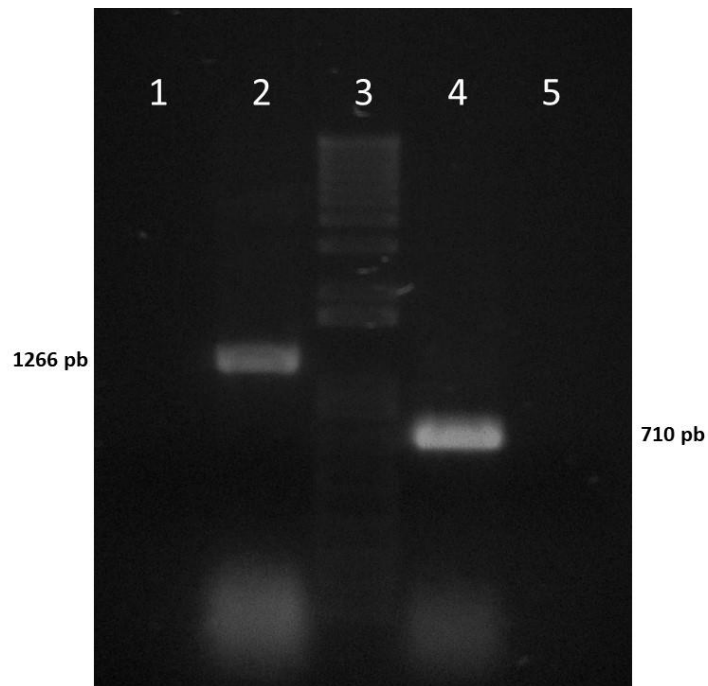


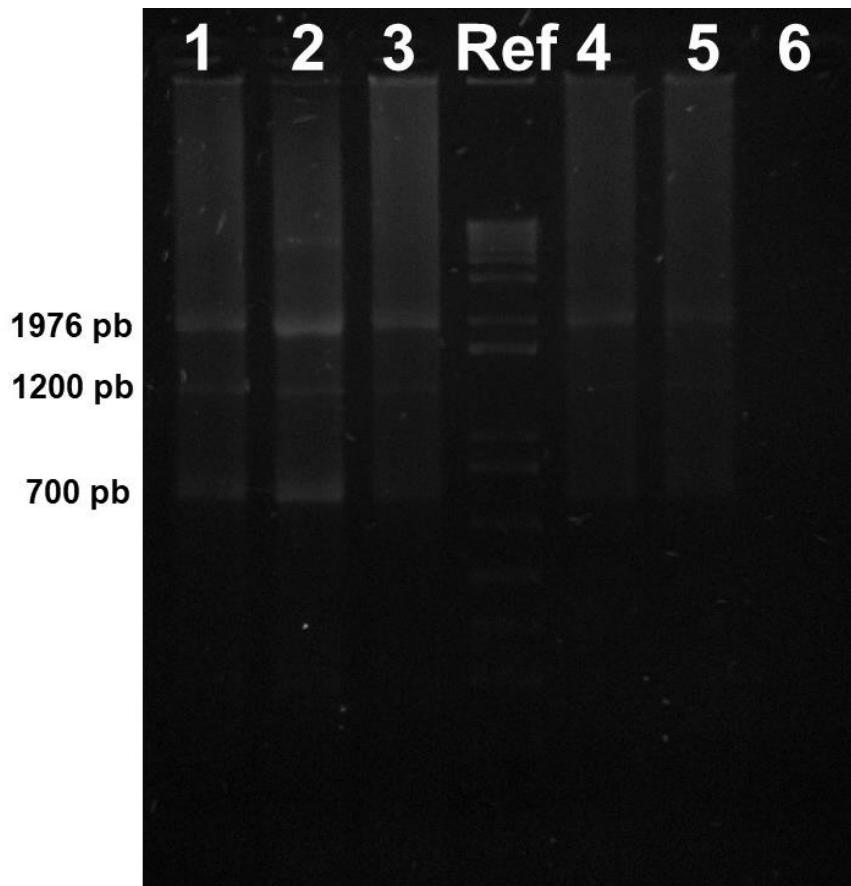
Figura 32 **A)** Plásmidos pJet-TEV 1 y 2. **B)** Digestión de los plásmidos pJet-TEV 1 y 2 con la enzima BglIII se observa un fragmento de 1312 pb; 3: control negativo plásmido pJet-TEV sin digerir; Ref: referencia de pares de bases.

Se realizaron PCRs punto final empleando oligonucleótidos específicos para NlaTEV y para mCherry, una vez terminadas las reacciones, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,9% a 95 volts por 40 minutos (Figura 33).



*Figura 33. PCR punto final para mCherry y NlaTEV. 1: control negativo sin templado para NlaTEV; 2 NlaTEV; 3: referencia de pares de bases; 4: mCherry; 5: control negativo sin templado para mCherry.*

Las bandas correspondientes a cada gen; 710 pb para mCherry y 1266 pb para NlaTEV fueron escindidas del gel y purificadas para luego ponerlas en una reacción para generar extremos romos y la ligación con T4 ADN Ligasa; posteriormente el producto de esta reacción fue tomado como templado para una PCR punto final con un gradiente térmico de 55 a 67 °C con la finalidad de promover alineamiento correcto de los oligonucleótidos forward para mCherry y reverso para NlaTEV con el fin de generar un fragmento de 1976 pb con el gen codificante para mCherry en el extremo 5' y NlaTEV en el extremo 3', sin embargo, el patrón electroforético obtenido mostró la presencia de tres bandas con tamaños de aproximadamente 700, 1300 y la de interés correspondiente a 1976 pb (Figura 34).



*Figura 34. Estandarización de la PCR para amplificar el fragmento mCherry-NlaTEV. PCR en gradiente de temperatura, tomado como templado el producto de ligación mCherry-NlaTEV; 1: 55 °C; 2: 57.3 °C; 3: 54.6 °C; 4: 64.6 °C; 5: 67 °C; 6: control negativo si templado; Ref: referencia de pares de bases.*

Con base en la estandarización de la reacción, se seleccionó la temperatura de 65°C para favorecer el alineamiento de los oligonucleótidos. Se preparó una nueva PCR punto final empleando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) que además genera extremos romos; al finalizar la reacción, el producto fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,7% a 95 volts por 35 minutos observándose la presencia de los tres fragmentos generados con anterioridad, la banda correspondiente a 1976 pb fue escindida y purificada (Figura 35).

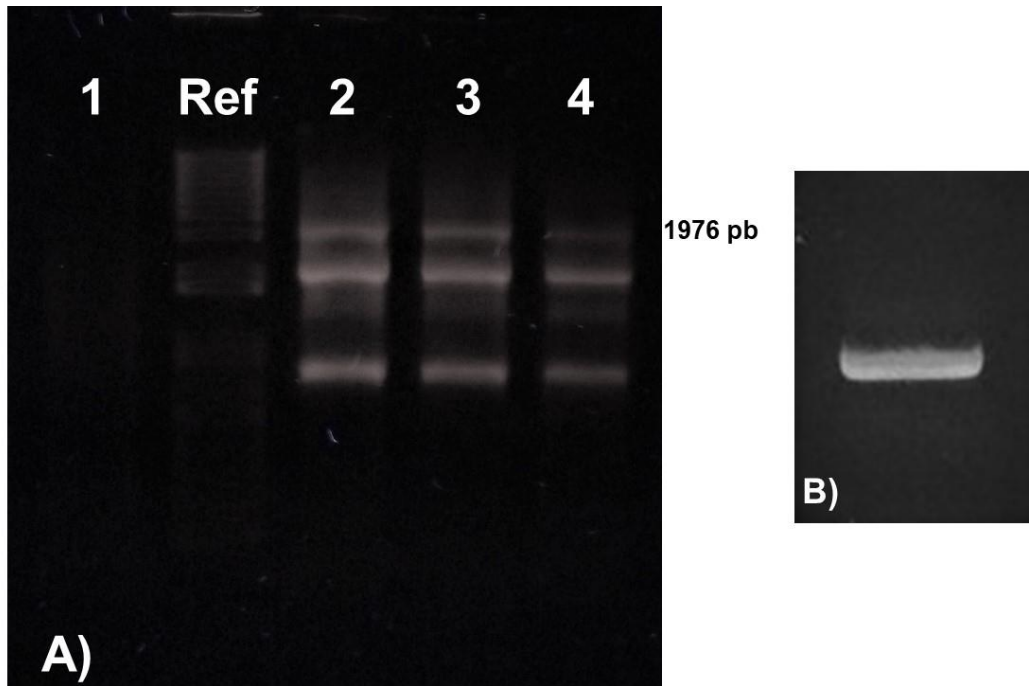


Figura 35. PCR mCherry-NlaTEV con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. **A)** PCR punto final mCherry-NlaTEV (2, 3 y 4) con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA). 1: control negativo sin templado; Ref: referencia de pares de bases. **B)** Visualización de la calidad del fragmento mCherry-NlaTEV de 1976 pb purificado, se cargaron 2  $\mu$ L de 10  $\mu$ L recuperados.

Una vez purificado el fragmento mCherry-NlaTEV se puso en una reacción de ligación al vector pJet1.2, así como al vector pEG-s/ccdB este último previamente digerido con SmaI que permite abrir al plásmido entre el promotor 35S y el terminador OCS además de generar extremos romos (Figura 16); los productos de las reacciones de ligación fueron usados para transformar por choque térmico bacterias *E. coli DH5 $\alpha$*  competentes, estas fueron sembradas en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina para pJet1.2 y Kanamicina para pEG-s/ccdB; las cajas fueron puestas en incubaron a 37 °C toda la noche y se observó el crecimiento de colonias puntiformes únicamente en la caja donde se sembraron las bacterias transformadas con la construcción plasmídica pJet-mCherry-NlaTEV (Figura 36A). a partir de esta caja se seleccionaron y aislaron tres colonias que fueron puestas en medio LB sólido y líquido con el antibiótico apropiado; una vez obtenido un cultivo en líquido, se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina; se corroboró integridad y presencia de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% a 95 volts por 30 minutos (Figura 36B).

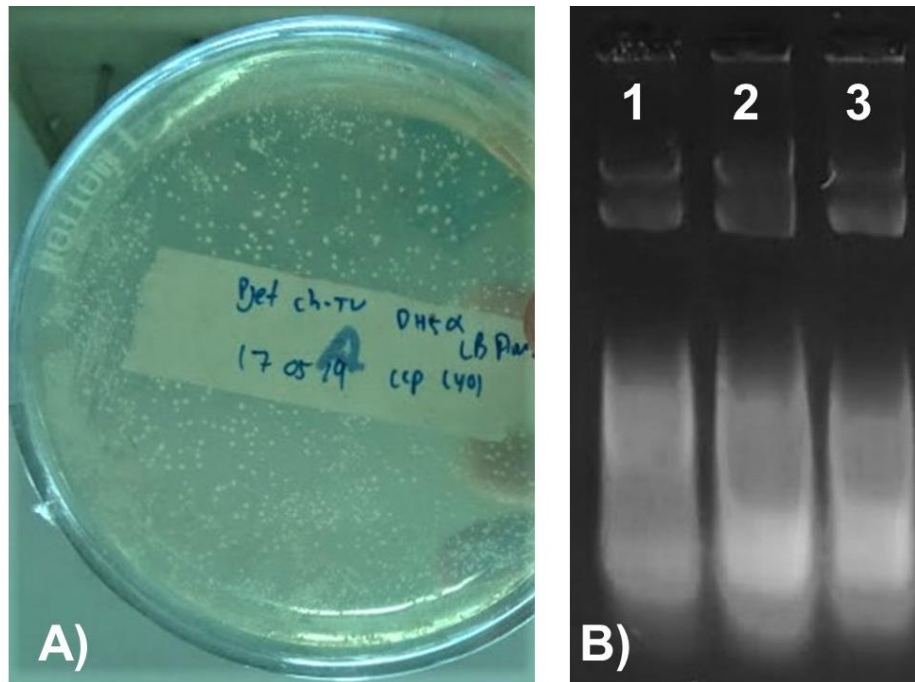


Figura 36. Transformación y plásmidos pJet-mCherry-NlaTEV. **A)** Bacterias transformantes de *E. coli* DH5α con pJet-mCherry-NlaTEV. **B)** Plásmidos pJet-mCherry-NlaTEV extraídos de colonias candidatas. 1: plásmido 1; 2: plásmido 2; 3: plásmido 3.

Una vez obtenidos los plásmidos, se realizó la digestión con enzimas de restricción, por disponibilidad se empleó la enzima BglIII en las reacciones con los plásmidos 1 y 2, como se muestra en la Figura 37 del análisis in silico, existen dos sitios de corte para la enzima BglIII que flanquean el fragmento esperado con un tamaño de 2018 pb y uno de 2928 pb correspondiente al resto del plásmido, en la reacción con el plásmido 3 se empleó la enzima BamHI, el análisis in silico evidenció un sitio de corte en el extremo 5' de mCherry y otro en la posición 4284 generando un fragmento de 1313 pb que incluye a mCherry y parte de NlaTEV y un fragmento de 3633 pb. Una vez realizadas las reacciones y realizada la electroforesis en gel de agarosa, se observó el patrón señalado en el análisis in silico (Figura 38), a pesar de que estas reacciones no indicaron la orientación en la que fue ligado el fragmento mCherry-NlaTEV, el resultado observado en la reacción con BamHI sugiere que el fragmento escindido corresponde al fragmento mCherry-NlaTEV esperado.

Considerando el resultado anterior, se preparó una PCR para corroborar la presencia del fragmento mCherry-NlaTEV en el plásmido 3, la electroforesis del producto de PCR mostró la presencia de la banda de 1976 pb esperada (Figura 39A), el producto de PCR fue puesto en una reacción de corte con la enzima BamHI como una forma

adicional de probar que la identidad del fragmento amplificado correspondiera a mCherry-NlaTEV, el patrón electroforético de esta reacción mostro un fragmento de 662 pb y otro de 1313 pb (Figura 39B).

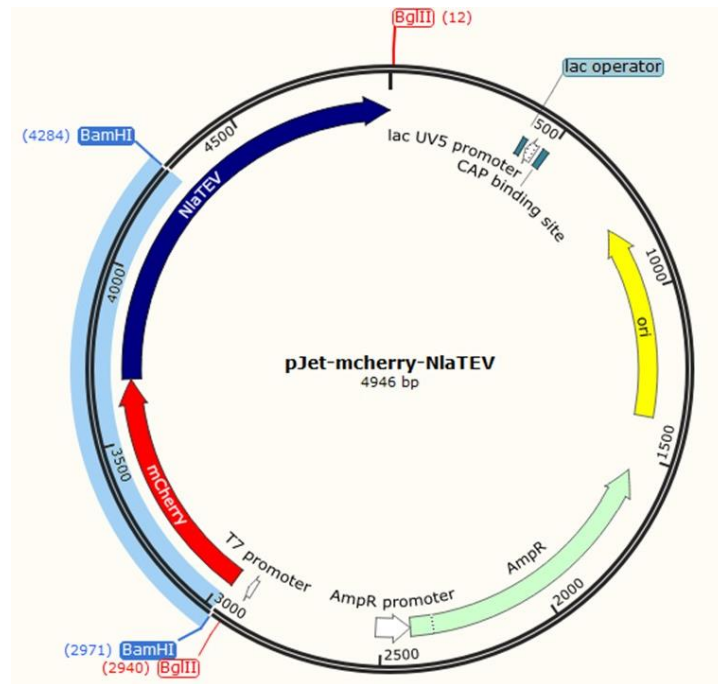


Figura 37. Visualización *in silico* del fragmento mCherry-NlaTEV ligado al vector pJet1.2. Se muestran los sitios para la enzima de restricción BamHI en azul y en rojo para BglII.

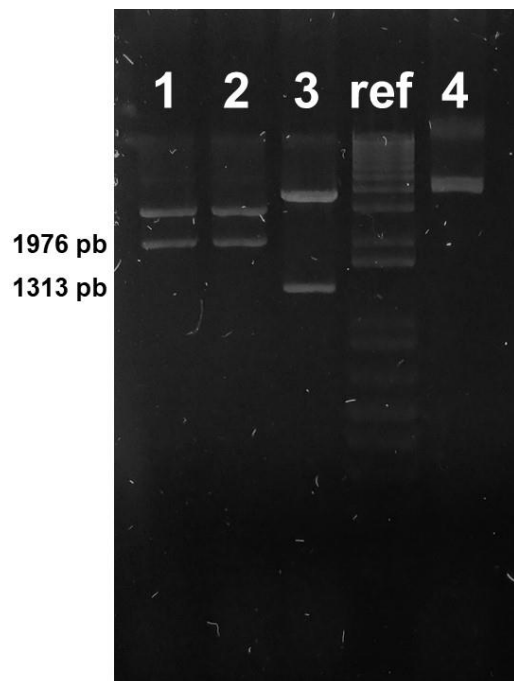


Figura 38. Digestión de pJet-mCherry-TEV con enzimas de restricción. 1: plásmido colonia 1 digerido con BglII; 2: plásmido colonia 2 digerido con BglII; 3: plásmido colonia 3 digerido con BamHI; 4: control negativo plásmido sin digerir; ref: referencia de pares de bases. Para las digestiones con BglII

se muestra un fragmento de aproximadamente 2000 pb y en el caso de la digestión con *Bam*HI un fragmento de 1313 pb.

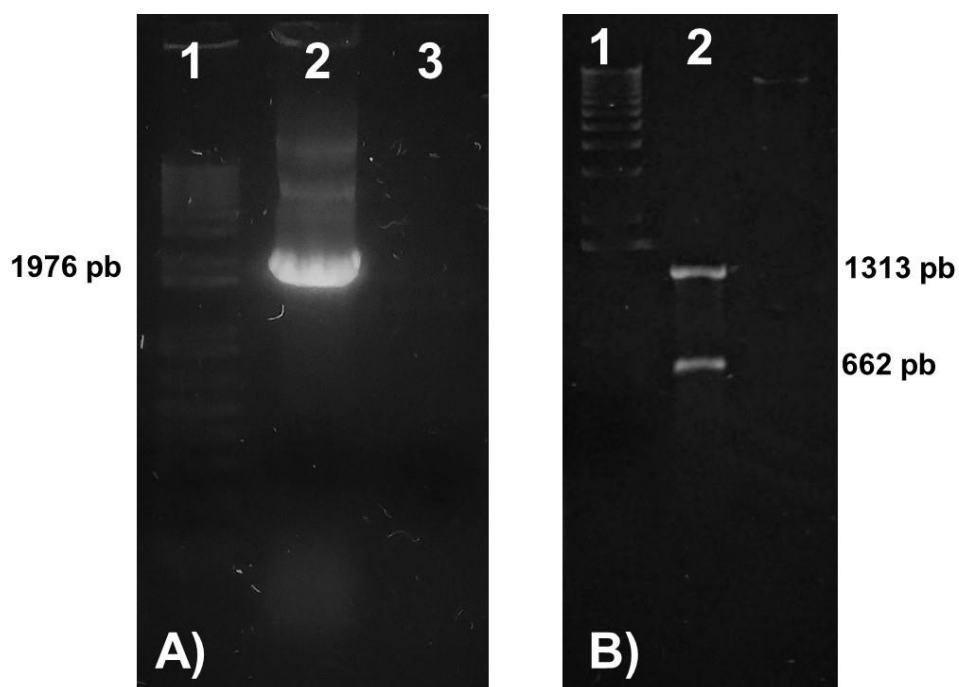


Figura 39. PCR y digestión con *Bam*HI de *mCherry-NlaTEV*. **A)** 1: referencia de pares de bases; 2: amplificación de *mCherry-NlaTEV* a partir del plásmido *pJet-mCherry-NlaTEV* 3: control negativo sin templado. **B)** 1: referencia de pares de bases; 2: Digestión por restricción del producto de la PCR *mCherry-NlaTEV*.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Eliminación *ccdB* e integración de *mCherry*

Dado que el plásmido *pEarleyGate 101* contiene el gen *ccdB* que codifica para una toxina que afecta a la ADN girasa, se requieren cepas de *E. coli* especiales para ser propagado, por ejemplo la DB3.1 (Reece-Hoyes y Walhout, 2018a), en este trabajo se planteó remover el gen *ccdB* vía el corte con enzimas de restricción como previamente se ha realizado empleando las enzimas *Bbv*CI y *Bst*XI con la finalidad de introducir el marcador de selección negativa *SacB-SacR* (Traore y Zhao, 2011). Al realizar un análisis *in silico* con diez enzimas de restricción (Tabla 5) disponibles en el laboratorio se encontraron diversos sitios para poder eliminar el gen *ccdB* sin afectar el promotor *CaMV35S*, el terminador *OCS* o comprometer la integridad del plásmido (Figura 9). Aunque la utilización de las enzimas *Bbv*CI y *Bst*XI permite generar cortes en el plásmido *pEarleyGate 101* para poder escindir el gen *ccdB* y mantener el gen reportero *EYFP* y compatibilidad con la clonación mediante enzimas de restricción y ligación así como recombinación Gateway (Ashwini *et al.*, 2016), en este trabajo se

empleó la enzima XhoI que realiza cortes en la posición 2654 y 5102 del plásmido, esto condujo a escindir además del gen *ccdB* otros elementos como el gen reportero YFP o los sitios attR1 y attR2 necesarios para la recombinación Gateway, pero dejando un pequeño sitio múltiple de clonación y una etiqueta de Histidinas entre el promotor CaMV35S y el terminador OCS, por otro lado, la enzima BstXI puede desarrollar actividad estrella (Thermo Scientific, 2012); mientras que XhoI no presenta actividad estrella sino hasta después de 16 horas de incubación (Thermo Scientific, 2013). La eliminación del gen *ccdB* y los demás fragmentos previamente descritos se corroboró cortando el plásmido generado pEG-s/*ccdB* con EcoRI, la reacción con EcoRI permitió liberar un fragmento de 1353 pb (Figura 14).

Los vectores con genes reporteros son importantes dado que permiten hacer aproximaciones *in vivo* sobre la regulación genética siendo indicadores de la actividad transcripcional dentro de las células cuando son colocados en un contexto adecuado (Schenborn y Groskreutz, 1999). Dado que el gen YFP fue eliminado tras el corte con XhoI, se intentó adicionar nuevamente tratando de ligar el fragmento codificante para dicha proteína entre el promotor CaMV35S y el terminador OCS, (datos no mostrados), alternativamente, se amplificó por PCR el gen mCherry a partir del plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry y se ligó en el sitio antes mencionado direccionando el sentido del marco de lectura abierto al cortar el plásmido y el producto de PCR con las enzimas BamHI y XbaI la inserción de mCherry en el plásmido pEG-s/*ccdB*-mCherry fue corroborada mediante PCR. La expresión de mCherry fue probada mediante la agroinfiltración de hojas de *N. tabacum*, después de diez días postagroinfiltración, las hojas agroinfiltradas y sistémicas fueron observadas en presencia de luz UV donde se logró ver la emisión de fluorescencia en las hojas agroinfiltradas (Figura 28), aunque esto debe ser confirmado con la realización de un nuevo experimento, simultáneamente se extrajo el ARN total de las hojas agroinfiltrada y sistémicas con el que se realizó un RT-PCR, el resultado indica la presencia de RNA de mCherry en las hojas agroinfiltradas (Figuras 30 y 31), lo que sugiere que el gen reportero está sujeto al proceso de transcripción.

Aunque los eventos de clonación y modificaciones realizados sobre el plásmido pEarleyGate 101 se corroboraron por PCR punto final y patrones de digestión vía enzimas de restricción los resultados pueden ser parcialmente confiables, pero no contundentes, por lo que es necesario llevar a cabo reacciones de secuenciación con

oligonucleótidos que permitan amplificar desde el promotor CaMV35S hasta el terminador OCS en cada evento de clonación, esto permitirá conocer el sentido en el que se integraron los fragmentos de ADN en el vector y la lectura nucleotídica del mismo dado que la amplificación de ADN por PCR conlleva tasas de error que van de 1 por cada 500 pb hasta 1 por cada 10 millones de pares de bases (Addgene, 2019a).

#### Cambio de resistencia a antibiótico

El marcador de selección de colonias bacterianas recombinantes *ccdB* es letal para la mayoría de cepas de *E. coli* por ejemplo para DH5 $\alpha$  (Bernard y Couturier, 1992), sin embargo, no es tóxica para *A. tumefaciens* por lo que es posible propagar plásmidos que contengan dicho gen esta bacteria (Traore y Zhao, 2011), no obstante las cepas de *A. tumefaciens* con fondo cromosómico C58 pueden presentar resistencia a diferentes antibióticos según el plásmido ayudador que contenga (Tabla 2) (Lee y Gelvin, 2008), lo anterior puede representar una limitación para el uso de pEarleyGate 101 o los plásmidos pEG-s/*ccdB* y s/*ccdB*-mCherry generados en este trabajo dado que mantienen el gen de resistencia a kanamicina, como alternativa, se cambió la resistencia de dichos vectores a espectinomicina tomando como molde el vector pHDE-35S-Cas9-mCherry cuyo caset de resistencia a espectinomicina se aisló con KpnI y NotI; la clonación de este fragmento dentro de los vectores pEG-s/*ccdB* y s/*ccdB*-mCherry se llevó a cabo mediante la digestión de los plásmidos con la enzima Eco32I y la ligación con T4 ADN Ligasa, ésta reacción interrumpió el marco de lectura del gen de resistencia a Kanamicina; la integración del nuevo gen de resistencia a espectinomicina fue exitosa considerando el crecimiento de colonias bacterianas en medio LB con el antibiótico (Figura 22) y el patrón electroforético mostrado en la Figura 25A, sin embargo, la integración del fragmento que contiene el gen de espectinomicina también contiene otros elementos tales como un borde izquierdo de T-DNA, un origen de replicación y un sitio Bom (Figura 42).

#### Prueba de la estabilidad, funcionalidad y viabilidad del vector binario generado

La estabilidad de los plásmidos pEG-s/*ccdB*, pEG-s/*ccdB*-spec, pEG-s/*ccdB*-mCherry y pEG-s/*ccdB*-mCherry-spec generados a partir de pEarley Gate 101 (Figura 40) se corroboró mediante patrones de restricción, sin embargo en experimentos en los que se utilizó a las enzimas XbaI y BamHI para corroborar la presencia de mCherry en los plásmidos pEG-s/*ccdB*-mCherry y pEG-s/*ccdB*-mCherry-spec (datos no mostrados) no se pudo liberar dicho fragmento esto atribuido a una posible metilación del sitio

XbaI (Figura 41), según el análisis *in silico* indica que cuando la secuencia XbaI con la lectura TCTAGA está precedido por GA o seguido por TC la metiltransferasa de adenina (Dam) de *E. coli* realiza la metilación de este sitio bloqueando la función de XbaI (NEB, 2019b).

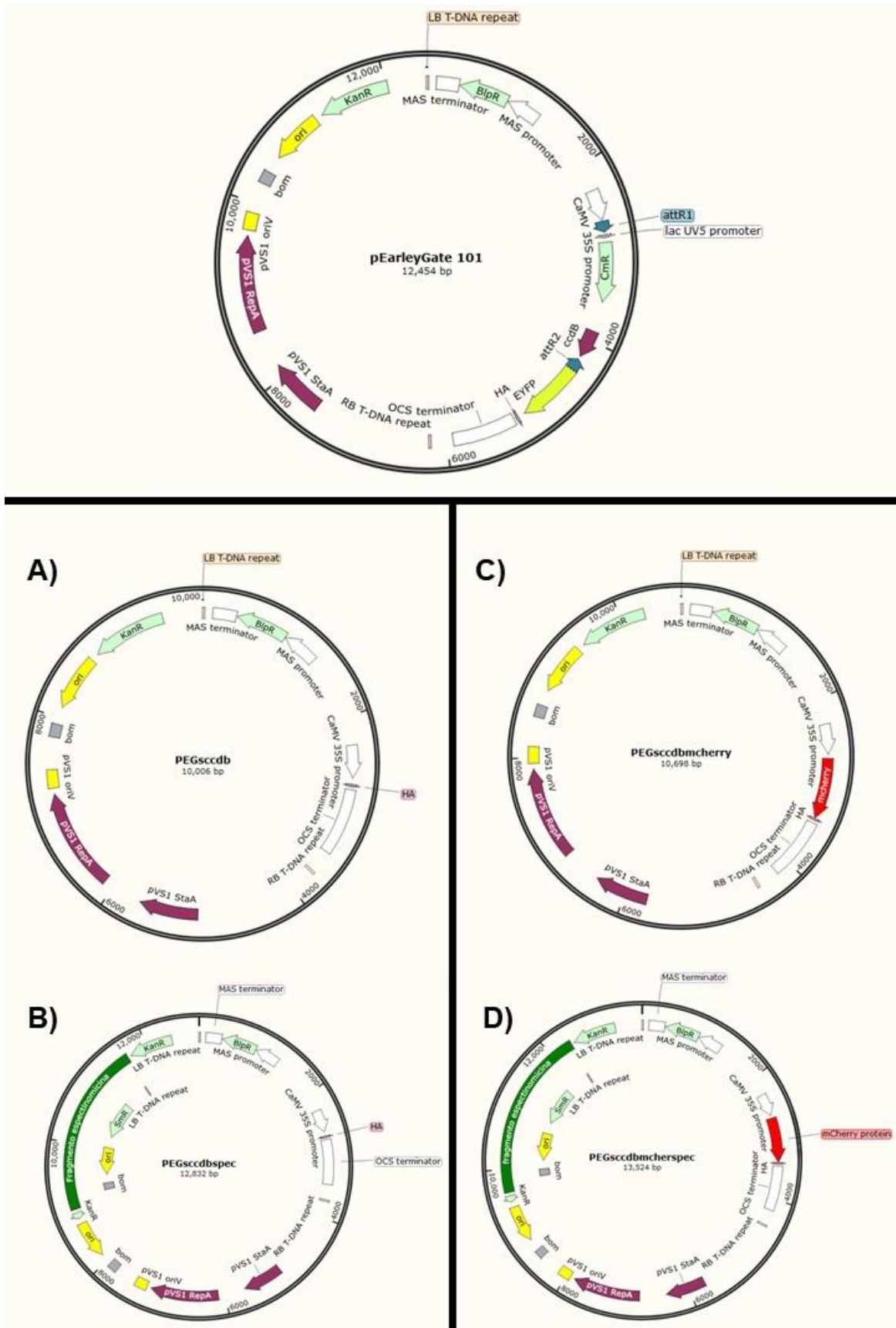


Figura 40. Esquemas generados *in silico* de los plásmidos obtenidos experimentalmente a partir de pEarleyGate 101. A) pEG-s/ccdB; B) pEG-s/ccdB-spec; C) pEG-s/ccdB-mCherry, D) pEG-s/ccdB-mCherry-spec



Figura 41. Sitio XbaI presente en el extremo 3' de mCherry posiblemente bloqueadas por metilación Dam. Se muestra el sitio XbaI precedido por GA, siendo este el contexto de reconocimiento de la metiltransferasa de adenina

Diferentes cepas de *E. coli* K12 comúnmente usadas en laboratorio tales como *E. coli* DH5 $\alpha$  presentan metilación Dam y Dcm (Addgene, 2016). Para corroborar que la metilación Dam ocurrió en alguno de los plásmidos que se generaron se puede emplear la enzima DpnI, la cual necesita metilación Dam para escindir dentro de una secuencia nucleotídica (Palmer y Marinus, 1994; Thermo Scientific, 2012). Otras técnicas permitirían comprobar la metilación en los plásmidos que se generaron tal es el caso de la espectrometría de masas (Humeny, Beck, Becker, y Jeltsch, 2003) o el ensayo molecular luz de freno para la actividad de la ADN metiltransferasa de adenina basado en la especificidad de la enzima de restricción DpnI para los sitios completamente metilados en un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y extintor (Wood *et al.*, 2007), o bien es posible desmetilar los plásmidos propagándolos en cepas deficientes en metilación Dam y Dcm (NEB, 2018; Palmer y Marinus, 1994), no obstante esto puede requerir el uso de otros materiales o equipo que pueden no estar disponibles.

Cuando las bacterias portadoras del plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec fueron subcultivadas por segunda ocasión para extraer el plásmido y ser cortado con la enzima NdeI para corroborar la presencia del fragmento codificante para la resistencia a espectinomicina como había ocurrido anteriormente (Figura 25), no se logró observar el patrón electroforético esperado (datos no mostrados), contrario a lo que ocurre en experimentos de otros investigadores en donde la estabilidad y patrones de

restricción se mantiene aún después de realizar subcultivos de las bacterias portadoras de plásmidos (Kramer, 2016; Traore y Zhao, 2011), aunque no es un hecho contundente o probado experimentalmente en este trabajo, se podría atribuir dicha inestabilidad en los plásmidos a la presencia de elementos extra en el fragmento codificante para la resistencia a espectinomicina (borde izquierdo de T-DNA, un origen de replicación y un sitio Bom), figura 42. Los vectores pEG-s/ccdB-mCherry-spec y pEG-s/ccdB-spec contienen 3 orígenes de replicación, dos ColE1 y otro del plásmido de *Pseudomonas* pVS1 como se muestra en la Figura 24, aunque es raro, se han reportado plásmidos con tres orígenes de replicación diferentes, los cuales no presentan algún tipo de inestabilidad (Pagotto y Dillon, 2001), aunque la estabilidad segregacional de un plásmido, depende de muchos factores, tales como el número de copias, mecanismo de replicación, niveles de expresión del gen recombinante, el tipo de huésped bacteriano y la carga metabólica asociada con todos estos factores (Kramer, 2016).

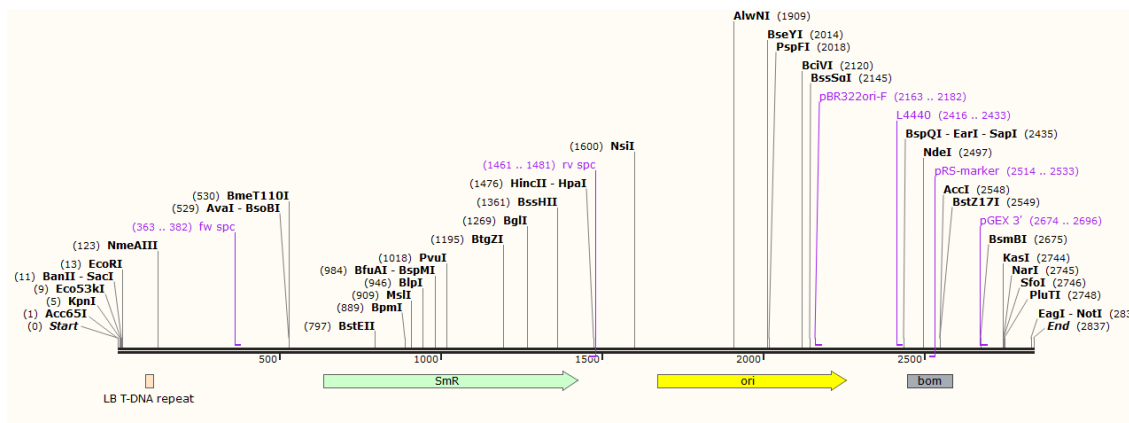


Figura 42. Fragmento de 2826 pb clonado para cambiar resistencia a espectinomicina. Incluye borde izquierdo de T-DNA, origen de replicación y un sitio Bom.

La funcionalidad del plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec fue probada al transformar células competentes de *A. tumefaciens* EHA101 (Figura 26) para posteriormente transformar por agroinfiltración plantas de *N. tabacum* (Norkunas *et al.*, 2018; Shamloul, Trusa, Mett, y Yusibov, 2014), diez días después de la agroinfiltración, se colectaron hojas transformadas, hojas sistémicas y hojas de plantas control sin transformar, al monitorear en presencia de luz UV se pudo observar fluorescencia solo en las hojas transformadas (Figura 28), esto sugiere que la clonación de mCherry se llevó a cabo en la orientación correcta respecto al promotor y terminador, por otra parte

que el promotor CaMV 35S y el terminador OCS no se vieron afectados por las modificaciones llevadas a cabo y que posiblemente la proteína reportera mCherry se logró expresar en planta. Aunque es necesario realizar una prueba que demuestre contundentemente la expresión de la proteína reportera, se logró la amplificación por RT-PCR el ADNc de mCherry (Figuras 30 y 31) solo cuando en la reacción de reverso transcripción se empleó el oligonucleótido específico (Bachman, 2013; Rio, 2014), pero no cuando se emplea oligo dT, esto sugiere que el vector obtenido puede ser funcional para la expresión de proteínas heterólogas.

Los plásmidos pEG-s/ccdB, pEG-s/ccdB-mCherry, pEG-s/ccdB-mCherry-spec y pEG-s/ccdB-spec diseñados y construidos en este trabajo permiten la clonación y expresión de fragmentos de ADN por medio del uso de enzimas de restricción y ligasas (Celie, Parret, y Perrakis, 2016) siendo una opción rápida y económica pues son fáciles de propagar y los insumos requeridos tienen un menor costo, por ejemplo un kit con 13 enzimas de restricción puede tener un precio aproximado a los 1500 MXN (Thermo Scientific, 2019c), mientras que los vectores Gateway son recomendados para construcciones plasmídicas complejas y específicas, pues permiten la integración de múltiples fragmentos de ADN simultáneamente (Reece-Hoyes y Walhout, 2018b) o bien con un orden específico (Cheo *et al.*, 2004), sin embargo, los vectores Gateway pueden tener limitaciones como el uso de cepas específicas para propagar los plásmidos (BCCM, 2018), la necesidad de al menos dos transformaciones bacterianas antes de obtener el plásmido final de expresión, los productos de recombinación pueden mantener “cicatrices” att que no cumplen función alguna para el fragmento de ADN sujeto a expresión por lo que puede agregar aminoácidos a la proteína expresada o bien cambiar marcos de lectura abiertos (Chee *et al.*, 2015), además los altos costos en los insumos por ejemplo, el kit de enzimas BP clonasa necesaria para clonar fragmentos de interés en los vectores donantes y LR clonasa indispensable para la sublimación entre el vector de entrada y el vector destino, con 20 reacciones puede alcanzar un precio cercano a los 40,000 MXN (Thermo Scientific, 2019a).

#### Fusión transcripcional mCherry-NIaTEV

Las enfermedades virales en plantas son una de las causas de pérdidas económicas importantes al reducir la calidad y rendimiento de los cultivos, de manera natural las plantas y otros organismos utilizan mecanismos como el silenciamiento génico para prevenir, restringir y eliminar infecciones virales (García-Ruiz H., *et al.* 2016). Por su

capacidad de reconocer y degradar ARN de forma específica, se ha propuesto el silenciamiento mediado por la endonucleasa Cas13a (Mohanraju *et al.*, 2016); (Gootenberg *et al.*, 2017) como una alternativa para contrarrestar las infecciones producidas por virus de ARN en plantas (Chaudhary, 2018; Khan, Amin, Hameed, y Mansoor, 2018); para probar la función y esclarecer mecanismos como los que se proponen, se requiere generar fusiones transcripcionales y/o traduccionales entre virus y genes reporteros (Dickmeis, Honickel, Fischer, y Commandeur, 2015), con la finalidad de probar la interferencia de un sistema basado en la maquinaria CRISPR-Cas13a en plantas modelo contra la infección viral (Aman *et al.*, 2018). uno de los objetivos de este trabajo fue amplificar el gen NIa de TEV para ser introducido en los plásmidos generados pEG-s/ccdB-mCherry y pEG-s/ccdB-mCherry-spec y generar la fusión transcripcional mCherry-NIaTEV, sin embargo, no se logró llevar a cabo estas construcciones plasmídicas, posiblemente a la posible inestabilidad de los plásmidos o a eventos de metilación que hayan afectado el corte de los plásmidos, alternativamente se logró amplificar por PCR el gen reportero mCherry y el gen NIaTEV (Figura 33) para generar la fusión de ambos segmentos (Figuras 34 y 35) y ligarlos al plásmido pJET1.2 (Figura 36) en donde se comprobó su presencia por medio de reacciones de digestión con las enzimas BglII y BamHI (Figura 38) y PCR punto final (Figura 39). Aunque la fusión mCherry-NIa se logró clonar en el vector pJet a través del uso de enzimas de restricción y ligasas, se ha sugerido que la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales es más eficiente a través de la Clonación Gateway o combinación con otras tales como Golden Gate (Kirchmaier, Lust, y Wittbrodt, 2013) debido a que esto permite la clonación de múltiples segmentos en paralelo, con alta especificidad de orientación y rendimiento que enzimas de restricción (Cheo *et al.*, 2004). las colonias candidatas portadoras del plásmido pJet-mCherry-NIa se almacenaron para ser usadas en eventos posteriores en los que se logre integrar el segmento mCherry-NIa a los plásmidos generados.

Los plásmidos pEarleyGate son derivados del plásmido pFGC5941 construido a partir de un plásmido pCAMBIA (Earley, K.W., *et al.*, 2006), por lo que pueden ser usados en la clonación de genes para inducir su expresión en plantas mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas o bien a través del sistema de clonación GATEWAY (Leclercq, Szabolcs, Martin, y Montoro, 2015; Yu *et al.*, 2018), los plásmidos vectores pEG-s/ccdB, pEG-s/ccdB-spec, pEG-s/ccdB-mCherry pEG-s/ccdB-mCherry-spec

generados en este trabajo, pueden ser usados para inducir la expresión de genes en plantas introduciéndolos vía enzimas de restricción y ligasas, no obstante, dadas las modificaciones que se realizaron fuera de la región T-ADN, es necesario analizar su estabilidad y eficiencia para ser usados en experimentos de expresión.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como resultado de este trabajo se logró modificar a través del corte con enzimas de restricción y reacciones de ligación al plásmido pEarleyGate101, a partir del cual se generaron los plásmidos pEG-s/ccdB, pEG-s/ccdB-spec, pEG-s/ccdB-mCherry pEG-s/ccdB-mCherry-spec, en estos se eliminó el fragmento que codifica para el gen de muerte ccdB y pudieron ser propagados en *E.coli* DH5 $\alpha$ . A partir del plásmido pEG-s/ccdB se generaron versiones que incorporaron el gen de resistencia a espectinomicina (pEG-s/ccdB-spec), o el gen reportero mCherry (pEG-s/ccdB-mCherry) o ambas modificaciones (pEG-s/ccdB-mCherry-spec). A través de la transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido pEG-s/ccdB-mCherry-spec se logró inducir vía agroinfiltración la expresión del gen reportero mCherry, al menos a nivel de ARN, por lo que es necesario corroborar la presencia de la proteína ya sea por microscopia de fluorescencia o por inmunodetección. Finalmente, se logró generar la fusión de los genes mCherry y NlaTEV, la cual fue clonada en el plásmido pJet1.2 (pJet-mCherry-Nla), esta fusión de genes será usada para ser insertada en alguno de plásmidos generados y ser usada en estudios de plataformas antivirales en planta.

## BIBLIOGRAFÍA

- Addgene. (2016). Plasmids 101: Methylation and Restriction Enzymes. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-methylation-and-restriction-enzymes>. Consultado el 27-11-2019.
- Addgene. (2017). *Plasmids 101: A Desktop Resource Plasmids 101: A Desktop Resource (3 rd Edition)*.
- Addgene. (2019a). Addgene: Plasmid Cloning by PCR (with Protocols). [https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/?fbclid=IwAR1ypN3Yd7x8Vwg\\_ANzhnxyQ632YTgceLFNMhnCNv784cjH9jp0rU47AO28](https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/?fbclid=IwAR1ypN3Yd7x8Vwg_ANzhnxyQ632YTgceLFNMhnCNv784cjH9jp0rU47AO28). Consultado el 22-11-2019.
- Addgene. (2019b). Addgene: Plasmid Cloning by Restriction Enzyme Digest (with Protocols). <https://www.addgene.org/protocols/subcloning/>. Consultado el 19-12-2019.
- Ahmad, N., y Mukhtar, Z. (2017). Genetic manipulations in crops: Challenges and opportunities. *Genomics*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.07.007>
- Alvarez-Martinez, C. E., y Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 73(4), 775–808. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-09>
- Aman, R., Ali, Z., Butt, H., Mahas, A., Aljedaani, F., Khan, M. Z., Ding, S., Mahfouz, M. (2018). RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biology*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1381-1>
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., y Sathishkumar, R. (2016). Advances in Molecular Cloning. *Molekuliarnaia Biologiia*, 50(1), 3–9. <https://doi.org/10.7868/S0026898416010134>
- Atmakuri, K., Cascales, E., Burton, O. T., Banta, L. M., y Christie, P. J. (2007). Agrobacterium ParA/MinD-like VirC1 spatially coordinates early conjugative DNA transfer reactions. *EMBO Journal*, 26(10), 2540–2551. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601696>
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). In *Methods in Enzymology*

(Vol. 530, pp. 67–74). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>

Badal McCreath, S., y Rupika, D. (2017). *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. (Elsevier, Ed.), *Pharmacognosy*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-01794-7>

Bahassi, E. M., Salmon, M. A., van Melder, L., Bernard, P., y Couturier, M. (1995). F plasmid CcdB killer protein ccdB gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Molecular Microbiology*, *15*(6), 1031–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02278.x>

Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., y Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, (February), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.004>

Barton, K. A., Binns, A. N., Matzke, A. J., y Chilton, M. D. (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell*, *32*(4), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90288-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90288-x)

BCCM. (2018). *Escherichia coli K12xB DB3.1*.

Bernard, P. (1996). Positive Selection of Recombinant DNA by CcdB. *BioTechniques*, *21*(2), 320–323. <https://doi.org/10.2144/96212pf01>

Bernard, P., y Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, *226*(3), 735–745. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90629-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90629-X)

Bernard, P., Gabarit, P., Bahassi, E. M., y Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, *148*(1), 71–74. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90235-6)

Binns, A. N. (2002). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 Years and counting. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 231–233. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02265-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02265-3)

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H.

- W., Crosa, J., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2), 95–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90000-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90000-2)
- Braun, A. C. (1943). STUDIES ON TUMOR INCEPTION IN THE CROWN-GALL DISEASE. *American Journal of Botany*, 30(9), 674–677. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1943.tb10317.x>
- Celie, P. H., Parret, A. H., y Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010>
- Cevallos, M. A., Cervantes-Rivera, R., y Gutiérrez-Ríos, R. M. (2008). The repABC plasmid family. *Plasmid*. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.001>. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.001>
- Chai, Y., y Winans, S. C. (2005). A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Molecular Microbiology*, 56(6), 1574–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04636.x>
- Chaudhary, K. (2018). CRISPR/Cas13a targeting of RNA virus in plants. *Plant Cell Reports*, 37(12), 1707–1712. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2297-2>
- Chee, C., Transgen, C., Chee, J. Y., y Chin, C. F. (2015). Open Access Commentary Gateway Cloning Technology: Advantages and Drawbacks. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.1000138>
- Cheo, D. L., Titus, S. A., Byrd, D. R. N., Hartley, J. L., Temple, G. F., y Brasch, M. A. (2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Research*, 14(10 B), 2111–2120. <https://doi.org/10.1101/gr.2512204>
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., y Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263–271.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)

- Christie, P. J., Whitaker, N., y González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.019>
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., y Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
- Danino, Y. M., Even, D., Ideses, D., y Juven-Gershon, T. (2015). The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1116–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.04.003>
- de Marco, A. (2015). Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0320-7>
- Dickmeis, C., Honickel, M. M. A., Fischer, R., y Commandeur, U. (2015). Production of Hybrid Chimeric PVX Particles Using a Combination of TMV and PVX-Based Expression Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 189. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00189>
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12 II), 7347–7351. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7347>
- Durland, R. H., Toukdarian, A., Fang, F., y Helinski, D. R. (1990). Mutations in the trfA replication gene of the broad-host-range plasmid RK2 result in elevated plasmid copy numbers. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3859–3867. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3859-3867.1990>
- Eapen, S., Singh, S., y D'Souza, S. F. (2007). Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.001>

- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. and Pikaard, C.S. (2006), Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45: 616-629. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., y Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(5584), 1183–1186. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
- Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E., y Ginsburg, D. (1990). Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 191(2), 396–400. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90238-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90238-5)
- Engler, C., y Marillonnet, S. (2014). Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology*, 1116, 119–131. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9)
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. (2018). *Luxturna, INN-voretigene neparvovec*. [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact). Consultado el 16-12-2019.
- FAO. (2019a). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.
- FAO. (2019b). Plagas y enfermedades de las plantas : FAO in Emergencias.
- Fontes, A. (2013). Cloning Technologies (pp. 253–261). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_20)
- Fronzes, R., Christie, P. J., y Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2218>
- García-Ruiz H, García-Ruiz MT, Gabriel-Peralta SM, Miravel-Gabriel CB, El-Mounadi K. Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. 2016;34(3).
- Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. F., Gordon, M. P., y Nester, E. W. (1981). Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell*, 27(1 PART 2), 143–153. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90368-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90368-8)

- Gearing, M. (2015). Plasmids 101: Golden Gate Cloning. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning>. Consultado el 25-12-2019.
- Gelvin, S. B. (2014). Traversing the cell: Agrobacterium T-DNA's journey to the host genome. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
- Gibson, D. (2017). Cloning Guide 2 Nd Edition Restriction Digestfree, Seamless Cloning, 1–44. [https://www.biocat.com/bc/files/Gibson\\_Guide\\_V2\\_101417\\_web\\_version\\_8.5\\_x\\_11\\_FINAL.pdf](https://www.biocat.com/bc/files/Gibson_Guide_V2_101417_web_version_8.5_x_11_FINAL.pdf). Consultado el 25-12-2019.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., y Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gifre, L., Arís, A., Bach, À., y Garcia-Fruitós, E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>
- Grünge, R., y Rudolf, F. (2017). Saccharomyces cerevisiae Shuttle vectors : Yeast Vectors. *Yeast*, 34(5), 205–221. <https://doi.org/10.1002/yea.v34.5>
- Gootenberg, J. S., Abudayeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Lyvni, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
- Gordon, J. E., y Christie, P. J. (2014). The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0010-2013>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2018). The hanahan method for preparation and transformation of competent Escherichia coli: High-efficiency transformation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(3), 183–190. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101188>

- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., y Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5(10). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Herrera-Estrella, A., Chen, Z. M., Van Montagu, M., y Wang, K. (1988). VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA--protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *The EMBO Journal*, 7(13), 4055–4062.
- Howard, E. A., Winsor, B. A., De Vos, G., y Zambryski, P. (1989). Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand-protein complex: Tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(11), 4017–4021. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4017>
- Humeny, A., Beck, C., Becker, C. M., y Jeltsch, A. (2003). Detection and analysis of enzymatic DNA methylation of oligonucleotide substrates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 313(1), 160–166. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00568-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00568-7)
- Hwang, H.-H., Yu, M., y Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book*, 15(15), e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Imanaka, T., y Aiba, S. (1981). A PERSPECTIVE ON THE APPLICATION OF GENETIC ENGINEERING: STABILITY OF RECOMBINANT PLASMID. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 369(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb14172.x>
- Invitrogen. (2014). *TOPO® TA Cloning® Kit Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products Catalog numbers (pCR™ 2.1-TOPO® vector) K4500*.
- Invitrogen. (2016). *Gateway cloning technology The easy-to-use choice for cloning in multiple expression systems*.
- Juers, D. H., Matthews, B. W., y Huber, R. E. (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>

- Kerr, A. (1969). Transfer of virulence between isolates of agrobacterium. *Nature*, 223(5211), 1175–1176. <https://doi.org/10.1038/2231175a0>
- Khan, M. Z., Amin, I., Hameed, A., y Mansoor, S. (2018). CRISPR–Cas13a: Prospects for Plant Virus Resistance. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.005>
- Kim, U. jin, Shizuya, H., De Jong, P. J., Birren, B., y Simon, M. I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Research*, 20(5), 1083–1085. <https://doi.org/10.1093/nar/20.5.1083>
- Knight, T. (2003). Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *MIT Artificial Intelligence Laboratory*, 1–11. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/1721.1/21168>
- Koo, B. M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A. B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., Gross, C. A. (2017). Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for Bacillus subtilis. *Cell Systems*, 4(3), 291-305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>
- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M., Evola, S. V. (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from Bacillus thuringiensis. *Bio/Technology*, 11(2), 194–200. <https://doi.org/10.1038/nbt0293-194>
- Kramer, M. G. (2016). Determination of Plasmid Segregational Stability in a Growing Bacterial Population (pp. 125–133). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3515-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3515-4_11)
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G., y Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
- Ladisich, M. R., y Kohlmann, K. L. (1992). Recombinant Human Insulin. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>

- Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, And Regulatory Aspects Of Lambda-Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 913–949. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.58.1.913>
- Leclercq, J., Szabolcs, T., Martin, F., y 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>
- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*, 32(4), 403–430. <https://doi.org/10.1152/physrev.1952.32.4.403>
- Lee, L. Y., y Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- Leveau, J. H. J., Gerards, S., De Boer, W., y Van Veen, J. A. (2004). Phylogeny-function analysis of (meta)genomic libraries: Screening for expression of ribosomal RNA genes by large-insert library fluorescent in situ hybridization (LIL-FISH). *Environmental Microbiology*, 6(9), 990–998. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00673.x>
- Li, M. Z., y Elledge, S. J. (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods*, 4(3), 251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>
- Li, M. Z., y Elledge, S. J. (2012). SLIC: A method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods in Molecular Biology*, 852, 51–59. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_5)
- Liang, X., Peng, L., Baek, C. H., y Katzen, F. (2013). Single step BP/LR combined Gateway reactions. *BioTechniques*, 55(5), 265–268. <https://doi.org/10.2144/000114101>
- Mabashi-Asazuma, H., y Jarvis, D. L. (2017). CRISPR-Cas9 vectors for genome editing and host engineering in the baculovirus–insect cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34), 9068–9073. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705836114>
- Maheshwari, P., y Kovalchuk, I. (2014). Genetic engineering of oilseed crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.001>

- Martien, J. I., y Amador-Noguez, D. (2017). Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.006>
- Mead, D. A., Pey, N. K., Herrnstadt, C., Marcil, R. A., y Smith, L. M. (1991). A Universal Method for the Direct Cloning of PCR Amplified Nucleic Acid. *Bio/Technology*, 9(7), 657–663. <https://doi.org/10.1038/nbt0791-657>
- Medrano, G., Reidy, M. J., Liu, J., Ayala, J., Dolan, M. C., y Cramer, C. L. (2009). Rapid system for evaluating bioproduction capacity of complex pharmaceutical proteins in plants. *Methods in Molecular Biology*, 483, 51–67. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-407-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-407-0_4)
- Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., Van-der-Ost, J., (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 65(3), 222–223. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-15>
- Moore, D. D. (1987). Section I: Overview of Recombinant DNA Libraries. In *Current Protocols in Molecular Biology* (pp. 1–5). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0501s00>
- Mukai, T., Lajoie, M. J., Englert, M., y Söll, D. (2017). Rewriting the Genetic Code. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 557–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093247>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Nature Plants. (2019). Plants of the future. *Nature Plants*. Palgrave Macmillan Ltd. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0506-9>
- NEB. (2018). Making unmethylated (Dam- Dcm-) DNA, NEB. [https://web.archive.org/web/20110106183728/http://www.neb.com/nebecomm/tech\\_reference/restriction\\_enzymes/making\\_unmethylated\\_dna.asp](https://web.archive.org/web/20110106183728/http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/making_unmethylated_dna.asp). Consultado el 27-11-2019.

- NEB. (2019a). Golden Gate Assembly | NEB. <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly>. Consultado el 25-12-2019.
- NEB. (2019b). Is XbaI affected by methylation? | NEB. <https://international.neb.com/faqs/0001/01/01/is-xbaI-affected-by-methylation>. Consultado el 27-11-2019.
- Niarchos, A., Siora, A., Konstantinou, E., Kalampoki, V., Lagoumintzis, G., y Poulas, K. (2017). TA-GC cloning: A new simple and versatile technique for the directional cloning of PCR products for recombinant protein expression. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186568>
- Nikoleli, G. P., Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Karapetis, S., y Varzakas, T. (2018). Novel Biosensors for the Rapid Detection of Toxicants in Foods. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 84, pp. 57–102). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.01.003>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Guazzaroni, M. E., Siddaiah, C., Gupta, V. K., y Silva-Rocha, R. (2019). Recent advances in plasmid-based tools for establishing novel microbial chassis. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107433>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., y Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., y Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>
- Pagotto, F., y Dillon, J. A. R. (2001). Multiple origins and replication proteins influence biological properties of  $\beta$ -lactamase-producing plasmids from *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5472–5481. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5472-5481.2001>
- Palmer, B. R., y Marinus, M. G. (1994). The dam and dcm strains of *Escherichia coli* — a review. *Gene*, 143(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90597-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90597-5)

- Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B., y Lanka, E. (1993). Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(24), 11538–11542. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11538>
- Peng, Q., Yu, Q., y Song, F. (2019). Expression of cry genes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9552-x>
- Pinto, U. M., Flores-Mireles, A. L., Costa, E. D., y Winans, S. C. (2011). RepC protein of the octopine-type Ti plasmid binds to the probable origin of replication within repC and functions only in cis. *Molecular Microbiology*, *81*(6), 1593–1606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07789.x>
- Pinto, U. M., Pappas, K. M., y Winans, S. C. (2012). The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nature Reviews*, *10*, 755–765. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2882>
- Promega. (2019). Sistemas de vectores fáciles pGEM®-T. <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>. Consultado el 16-12-19
- Quispe-Huamanquispe, D. G., Gheysen, G., y Kreuze, J. F. (2017). Horizontal gene transfer contributes to plant evolution: The case of agrobacterium T-DNAs. *Frontiers in Plant Science*, *8*(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02015>
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM Crops and Food*, *8*(4), 195–208. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1413522>
- Reece-Hoyes, J. S., y Walhout, A. J. M. (2018a). Propagating gateway vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(1), 47–50. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot094920>
- Reece-Hoyes, J. S., y Walhout, A. J. M. (2018b). Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>

- Rio, D. C. (2014). Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(11), pdb.prot080887. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot080887>
- Rodríguez, R. L., y Denthardt, T. (1987). *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth Publishers1 (Vol. 45). <https://doi.org/10.1002/jctb.280450309>
- Romeis, J., Naranjo, S. E., Meissle, M., y Shelton, A. M. (2019). Genetically engineered crops help support conservation biological control. *Biological Control*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.001>
- Sakuma, T., Barry, M. A., y Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: Basic to translational. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20120146>
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2006a). Cloning PCR Products by Addition of Restriction Sites to the Termini of Amplified DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot3835. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3835>
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2006b). Directional Cloning into Plasmid Vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot3919. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3919>
- Santana-Pereira, A. L. R., y Liles, M. R. (2017). Challenges and opportunities in discovery of secondary metabolites using a functional metagenomic approach. In *Functional Metagenomics: Tools and Applications* (pp. 119–138). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61510-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61510-3_7)
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T., Imamoto, F. (2004). Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.001>
- Schenborn, E., y Groskreutz, D. (1999). Reporter Gene Vectors and Assays. *Molecular Biotechnology*, 13(1), 29–44. <https://doi.org/10.1385/MB:13:1:29>
- Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vergunts, A. C., Jácome, E. J., y Hooykaas, P. J. J. (2003). Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens*

- using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: Evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg179>
- Schulga, A. A., Mechev, P. V., Kirpichnikov, M. P., Skryabin, K. G., y Deyev, S. M. (2016). Construction of the plasmid-free strain for human growth hormone production. *Biochimie*, 128–129, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.08.007>
- Scientific, T. (2012). *Product information: BstXI, #ER1022*. [www.thermoscientific.com/doubledigest](http://www.thermoscientific.com/doubledigest). Consultado el 16-12-2019.
- Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V., y Yusibov, V. (2014). Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *Journal of Visualized Experiments*, (86). <https://doi.org/10.3791/51204>
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S., y Machida, Y. (1993). Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26552–26558.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32678–32684.
- Shuman, Stewart. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10104–10108. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10104>
- Sigma Aldrich. (2019). GC Cloning y Amplification Kit (pGC™ Blue) 10G ELITE (SOLOS) sufficient for 10 reactions | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/luc407421?lang=esyregion=MX>. Consultado el 16-12-2016.
- Sikorski, R. S., y Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27.

- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarria, M., Arce-Rodriguez, A., De las Eras, A., Páez-Espino, A.D., Duarte-Rodriguez, G., Kim, J., Nikel, P.I., Platero, R., De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Silva, C. A. (2005). *Maíz Genéticamente Modificado*.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., y Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624–629. <https://doi.org/10.1038/318624a0>
- Stanley, K. K., y Luzio, J. P. (1984). Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins. *The EMBO Journal*, 3(6), 1429–1434.
- Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S., y Davis, R. W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), 1035–1039. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1035>
- Tabata, S., Hooykaas, P. J., y Oka, A. (1989). Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1665–1672. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1665-1672.1989>
- Tam, J. E., y Kline, B. C. (1989). Control of the ccd operon in plasmid F. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2353–2360. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2353-2360.1989>
- Thermo Scientific. (2019a). Clonase Enzymes - MX.
- Thermo Scientific. (2019d). pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K240020#/K240020>. Consultado el 16-12-2019.

- Thurtle-Schmidt, D. M., y Lo, T. W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>
- Tolmachov, O. (2009). Designing plasmid vectors. *Methods in Molecular Biology*, 542, 117–129. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_6)
- Traore, S. M., y Zhao, B. (2011). A novel Gateway ®-compatible binary vector allows direct selection of recombinant clones in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Methods*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-42>
- Tzfira, T., Vaidya, M., y Citovsky, V. (2002). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by agrobacterium. *Nature*. 431: 87–92 <https://doi.org/10.1038/nature02857>
- Tzotzos, G. T., Head, G. P., y Hull, R. (2009). Setting the Context: Agriculture and Genetic Modification. In *Genetically Modified Plants*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374106-6.00001-1>
- Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., Den Dulk-Ras, A., De Vlaam, C. M. T., Regensburg-Tuink, T. J. G., y Hooykaas, P. J. J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 290(5493), 979–982. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.979>
- Waksman, G., y Fronzes, R. (2010). Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.06.002>
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., y Waksman, G. (2010). Type IV secretion systems: Versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x>
- Wang, J. W., Wang, A., Li, K., Wang, B., Jin, S., Reiser, M., y Lockey, R. F. (2015). CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning. *BioTechniques*, 58(4), 161–170. <https://doi.org/10.2144/000114261>
- Ward, E. R., y Barnes, W. M. (1988). VirD2 Protein of *Agrobacterium tumefaciens* Very Tightly Linked to the 5' End of T-Strand DNA. *Science*, 242(4880), 927–930.

<https://doi.org/10.1126/science.242.4880.927>

- Wood, R. J., Maynard-Smith, M. D., Robinson, V. L., Oyston, P. C. F., Titball, R. W., y Roach, P. L. (2007). Kinetic analysis of *Yersinia pestis* DNA adenine methyltransferase activity using a hemimethylated molecular break light oligonucleotide. *PLoS ONE*, 2(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000801>
- Young, C., y Nester, E. W. (1988). Association of the virD2 protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 170(8), 3367–3374. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3367-3374.1988>
- Yu, D., Liao, L., Zhang, Y., Xu, K., Zhang, J., Liu, K., Li, X., Tan, G., Zheng, J., He, Y., Xu, C., Zhao, J., Fu, B., Xie, J., Mao, J., Li, C. (2018). Development of a Gateway-compatible pCAMBIA binary vector for RNAi-mediated gene knockdown in plants. *Plasmid*, 98, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.002>
- Zaltsman, A., Krichevsky, A., Kozlovsky, S. V., Yasmin, F., y Citovsky, V. (2010). Plant defense pathways subverted by *Agrobacterium* for genetic transformation. *Plant Signaling and Behavior*, 5(10), 1245–1248. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12947>
- Zambryski, P. (2013). Fundamental discoveries and simple recombination between circular plasmid DNAs led to widespread use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generalized vector for plant genetic engineering. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6–8), 449–452. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130190pz>
- Zhou, M. Y., y Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current Issues in Molecular Biology*. <https://doi.org/10.21775/cimb.002.001>
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., y Winans, S. C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.3885-3895.2000>
- Zymo Research Corp. (2020). ZYMO RESEARCH CORP. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Catalog Nos. D4001T, D4001, D4002, D4007 y D4008.