

**INDUCCIÓN DE MUTACIONES EN *Helicoverpa armigera* (Hübner) A TRAVÉS
DE LA TÉCNICA DE EDICIÓN DE GENES DIPA-CRISPR**

MARIA CAMILA DIAZ RODRIGUEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

San Juan de Pasto

Mayo del 2023

**INDUCCIÓN DE MUTACIONES EN *Helicoverpa armigera* (Hübner) A TRAVÉS
DE LA TÉCNICA DE EDICIÓN DE GENES DIPA-CRISPR**

AUTORA

Maria Camila Diaz Rodriguez

Trabajo de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Director

I.A. PhD. Pedro Alexnder Velasquez Vasconez

Co-Director

I.A. PhD. Marcio de Castro Silva Filho

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

San Juan de Pasto

Mayo del 2023

Nota de Responsabilidad

“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”. Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

Laura Pantoja
Jurado Delegado

Claudia Salazar
Jurado Acompañante

Pedro Velasquez
Presidente

San Juan de Pasto, 2023

Agradecimientos

Al Doctor Pedro Velasquez I.A., Ph. D.
Director del trabajo de investigación, Universidad de Nariño
Por el tiempo dedicado a la orientación y corrección del presente estudio, hasta la culminación del mismo.

Al Doctor Marcio Silva I.A., Ph. D.
Co-Director del trabajo de investigación, ESALQ-USP.
Por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar como una de sus estudiantes.

A la Doctora Maressa de Oliveira.
Asesora, ESALQ-USP.
Por su apoyo y paciencia en el área de laboratorio, gracias a ella los resultados fueron todo un éxito.

A mis padres, Mario Javier Diaz y Monica Lucia Rodriguez.
Sin su incondicional apoyo y comprensión nada de esto hubiera sido posible, gracias por darme la confianza y los medios para emprender todos estos nuevos proyectos, espero este sea uno de nuestros tantos éxitos que nos aguardan en el camino.

Resumen

Actualmente, las investigaciones se han centrado en revelar las bases moleculares de los procesos metabólicos esenciales de *Helicoverpa armigera* con el fin de identificar posibles blancos de ingeniería genética. Recientemente surgió la técnica de edición de genes dirigida al parental o *Direct Parental* CRISPR (DIPA-CRISPR), que podría ser útil en lepidópteros. A fin de validar la técnica en *H. armigera*, fueron inyectadas 60 hembras adultas con el complejo Cas9-ARNg para inactivar el gen *Scarlet* (*St*). El ensayo se estableció en un diseño bifactorial de Bloques Completos al Azar (BCA), el primer factor correspondió a la inyección de Cas9-ARNg y Agua Milli-Q® (control) en el abdomen de las hembras, mientras que el segundo factor estuvo compuesto por los tres períodos pos-eclosión pupal (1, 2, 3 días) en que fueron realizadas las inyecciones. Un segundo experimento fue realizado inyectando cerca de 900 huevos en la primera hora post-oviposición para confirmar la eficacia del complejo Cas9-ARNg. Con la técnica convencional (inyección de huevos) fue posible obtener 275 mutantes *stst* de ojos amarillos (*St*^{-/-}*Ok*^{+/+}) y blancos (*St*^{-/-}*Ok*^{-/-}), logrando una eficiencia del 82% en relación a las larvas que lograron eclosionar. Por otro lado, la técnica DIPA-CRISPR no causó ningún efecto fenotípico evidente en las larvas de la generación cero (G0), como tampoco afectó el número de oviposiciones de las hembras inyectadas. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para establecer las condiciones óptimas que permitan manipular el genoma de lepidópteros mediante la tecnología DIPA-CRISPR.

Palabras Clave: nucleasa, polífagos, omocromos, lepidóptera, inactivación génica

Abstract

Currently, research has focused on revealing the molecular bases of *Helicoverpa armigera*'s essential metabolic processes, in order to identify potential targets for genetic engineering. The gene editing technique Direct Parental CRISPR (DIPA-CRISPR) was recently developed, which could be useful in lepidoptera. In order to validate the technique in *H. armigera*, 60 adult females were injected with the Cas9/sgRNA ribonucleoprotein complex (RNP) to inactivate the *Scarlet* gene (*St*). In the factorial experiment with two factors and with two replications in Randomized Complete Block Design (RCBD), the first factor corresponded to the injection of RNP and Milli-Q water (control) into the abdomen of females, while the second factor were the three post-hatching pupal periods (1, 2, 3 days) in which the injections were made. A second experiment was performed by injecting about 900 eggs in the first hour post-oviposition to confirm the efficacy of the Cas9/sgRNA complex. With the conventional technique (egg injection) it was possible to obtain 275 *stst* mutants of yellow (*St*^{-/-}*Ok*^{+/+}) and white eyes (*St*^{-/-}*Ok*^{-/-}), thus achieving an efficiency of 82% in relation to the larvae that managed to hatch. On the other hand, the DIPA-CRISPR technology did not cause any evident phenotypic effect in zero generation larvae (G0), nor did it affect the number of ovipositions of injected females. However, further studies are needed to establish optimal conditions for manipulating the lepidoptera genome using the DIPA-CRISPR technology.

Keywords: nuclease, polyphagous, omochromes, lepidoptera, gene inactivation.

Contenido

Introducción	12
Materiales y Métodos	13
Localización	13
Obtención de Insectos <i>Helicoverpa armigera</i>	13
Preparación de Dieta Artificial para la Alimentación de Larvas de <i>H. armigera</i>	13
Crianza de Insectos de <i>H. armigera</i>	14
Adultos	14
Huevos	16
Larvas	17
Pupas	17
Preparación de Microinyecciones	18
Preparación del Complejo Cas9-ARNg	19
Eficacia del Complejo Cas9-ARNg	22
Diseño Experimental	23
Variables Evaluadas	24
Número de Huevos por Postura	24
Viabilidad de Huevos	24
Mutantes <i>Scarlet</i>	25
Supervivencia	25
Análisis Estadístico	25
Resultados y Discusión	25
Conclusiones y Recomendaciones	38
Referencias Bibliográficas	39

Lista de Tablas

Tabla 1. Composición de la dieta artificial para la alimentación de larvas de <i>H. armigera</i> modificada por Vieira et al. (2018)	12
Tabla 2. Sitios target y ARNg utilizados para inducir mutaciones en el gen <i>St</i> de <i>H. armigera</i>	19
Tabla 3. Factores y unidades biológicas evaluados en el transcurso de la investigación	22
Tabla 4. Prueba de chi-cuadrado para la asociación estadística entre adultos de <i>H. armigera</i> de acuerdo al fenotipo ‘color de ojos’	32
Tabla 5. Análisis de varianza bajo un modelo estadístico factorial para el número de oviposiciones dependiente de los días de inyección (1, 2, 3 post-eclosión) y sustancia inyectada (Complejo Cas9-ARNg o agua destilada)	33

Lista de Figuras

Figura 1. Jaula tipo 1A usada para albergar pupas de acuerdo a su sexo	15
Figura 2. Jaula tipo 1B usada para albergar hembras post-inyección con su respectivo macho, momento previo a la oviposición	16
Figura 3. Jaulas tipo 2 usadas para incubar huevos de <i>H. armigera</i>	16
Figura 4. Jaulas tipo 3 usadas para incubar larvas de <i>H. armigera</i> hasta la formación de pupa	16
Figura 5. Región posterior de pupas de <i>H. armigera</i>	18
Figura 6. Extractor de aguja NARISHIGE modelo PC-100 usado en laboratorio para obtener microagujas a partir de capilares de vidrio de borosilicato	18
Figura 7. Microagujas a partir de capilares de vidrio de borosilicato	19
Figura 8. Representación esquemática de exones y SNPs del gen <i>St</i> de <i>H. armigera</i> 19	20
Figura 9. Análisis electroforético en gel de agarosa al 2%	20
Figura 10. Equipo de laboratorio para realizar microinyecciones	21
Figura 11. Inyección de Cas9-ARNg a hembras adultas de <i>H. armigera</i>	22
Figura 12. Tejido de jaulas 1B con posturas de <i>H. armigera</i> .	24
Figura 13. Identificación de mutantes potenciales G0	26
Figura 14. Huevos de <i>H. armigera</i> 48 h post-inyección.	28
Figura 15. Fenótipos de <i>H. armigera</i> causados por la inducción de mutaciones en el gen <i>St</i>	29
Figura 16. Fenotipo de adultos de <i>H. armigera</i> con mutaciones inducidas en los genes <i>St</i> y <i>Ok</i>	30
Figura 17. Quimeras del gusano cogollero <i>H. armigera</i> provenientes de la inducción de mutaciones para el gen <i>St</i>	31
Figura 18. Alineamiento de las dos secuencias target con la región blanco del gen <i>St</i> y la región de mayor identidad para el gen <i>Ok</i>	33

Figura 19. Producción de huevos por hembra según el número de días post-inyección	35
Figura 20. Contaminación por hongos del tejido para oviposición y dieta artificial de jaulas tipo 2 y 3	35
Figura 21. Porcentaje de viabilidad de los huevos G0 descendientes de hembras inyectadas	37
Figura 22. Malformaciones en adultos y pupas de <i>H. armígera</i>	37

Introducción

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), conocido comúnmente como el gusano cogollero o bellotero, es una de las plagas más importantes a nivel mundial. Este insecto generalista es reconocido por su alta capacidad de dispersión, reproducción y amplio número de hospederos, atacando más de 200 especies de plantas de importancia agrícola a nivel global, entre las cuales se destaca el maíz, el algodón, el tomate, el sorgo y la soya (Barrera et al., 2020).

H. armigera posee un alto potencial reproductivo y un rápido desarrollo, lo que intensifica el problema de manejo y control de esta plaga, forzando a que agricultores realicen aplicaciones de agroquímicos en dosis y calendarios inapropiados. Por este motivo, el insecto ha adquirido alto grado de tolerancia a muchos de los insecticidas, incluyendo los piretroides, carbamatos y organofosforados e incluso a cultivos transgénicos (Szwarc, 2014). Por tanto, investigadores se han puesto a la tarea de revelar los secretos moleculares de este insecto que le han permitido adquirir tales habilidades adaptativas para superar dichas condiciones de estrés. Por ejemplo, el amplio repertorio de plantas hospederas se debe a un conjunto de genes de tripsinas y quimotripsinas que actúan en la digestión de su alimento (Velasquez-Vasconez, 2022), de la misma forma que, estos mecanismos de expresión de genes están involucrados en la tolerancia de las larvas a insecticidas (Xu et al., 2018). La caracterización molecular requiere, entre otros procedimientos, una técnica eficiente de inactivación de genes que permita verificar su función en el desarrollo y adaptabilidad de los insectos.

En los últimos años, en la ingeniería de genomas de insectos se han desarrollado herramientas altamente especializadas que han permitido desentrañar las bases moleculares de determinadas especies de insectos. Sin embargo, el enfoque actual se basa en equipos costosos, tipos específicos de configuraciones experimentales, personal de laboratorio altamente calificado e inyecciones embrionarias. En estos procedimientos, el investigador dispone de un corto periodo de acción para aplicar las inyecciones (1 h post-oviposición), aumentando la probabilidad de cometer un error lastimando gravemente a los huevos, y consecuentemente, causando la muerte de las larvas (Kumar & Puttaraju, 2012).

Recientemente, Shirai et al. (2022) desarrollaron una nueva técnica de edición de genes en insectos denominada *Direct Parental* CRISPR o DIPA-CRISPR, con la cual, se logró establecer mutantes *knockouts* en cucarachas de la especie *Blattella germanica* y escarabajos *Tribolium castaneum*. En estas especies, la microinyección de huevos comúnmente usada en insectos no funciona, demostrando que la inyección de la RNP Cas9-ARNg en el hemocele de hembras adultas permite inducir mutaciones genéticas en las progenies. Esta nueva técnica ha demostrado ser simple, económica y versátil. A pesar de sus beneficios, esta nueva tecnología no

ha sido probada en lepidópteros. Por tanto, la presente investigación evaluó la técnica DIPA-CRISPR en el gusano cogollero (*H. armigera*), con el objetivo de establecer una nueva metodología de edición genómica que pueda ser usada en la transformación de genes de lepidópteros, en cualquier laboratorio que desee incursionar en el área de la ingeniería de genomas.

Materiales y Métodos

Localización

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, del Departamento de Genética de la ‘Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), campus de Piracicaba de la Universidade de São Paulo (USP)’ coordinado por el Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho.

Obtención de Insectos *Helicoverpa armigera*

Los primeros adultos y pupas de *H. armigera* fueron cedidos cordialmente por el Prof. Dr. Roberto Parra coordinador del Laboratorio de Biología de Insectos del Departamento de Entomología de la ESALQ-USP, para proceder con su reproducción en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Genética.

Preparación de Dieta Artificial para la Alimentación de Larvas de *H. armigera*

Para el mantenimiento de las larvas de *H. armigera* en el laboratorio se usó la dieta artificial de Greene et al. (1976) modificada por Vieira et al. (2018), con adaptaciones propuestas desde el Laboratorio de Entomología de la ESALQ-USP, la cual, está compuesta por proteínas, carbohidratos, anticontaminantes, vitaminas, estabilizante y agua (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de la dieta artificial para la alimentación de larvas de *H. armigera* modificada por Vieira et al. (2018).

Dieta artificial para <i>H. armigera</i>		
Componentes	Ingredientes	Cantidad
Proteína, aminoácidos esenciales, glúcidos, grasas	Frijol blanco	75,0g
	Germen de trigo	60,0g
	Proteína de soya	30,0g
	Caseína	30,0g
	Levadura	37,50g

Vitaminas, conservantes, anticontaminantes	Solución vitamínica	9,0g
	Ácido Ascórbico	3,60g
	Ácido Sórbico	1,80g
	Nipagin (metil parahidroxibenzoato)	3,0g
	Tetraciclina	113mg
	Formaldehido (40%)	3,60mL
Aglutinante	Agar	23,0g
Solvente	Agua Destilada	1200mL

Para la preparación de la dieta, el frijol se cocinó en agua destilada por aproximadamente 50 min y se licuó con 500 mL de agua destilada, para proceder a añadir el germen de trigo, la proteína de soya, la caseína y la levadura. Esta mezcla se transfirió a un recipiente donde previamente se había mezclado homogéneamente el agar con 500 mL de agua destilada a fuego medio. Después de homogeneizar la mezcla se procedió a disolver la solución vitamínica, el ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin (metil parahidroxibenzoato), tetraciclina y el formaldehido (40%) en 200 ml de agua destilada para poder ser transferidos a la mezcla con el agar. Al obtener una pasta homogénea, se vertió en vasos plásticos de 50 mL y 500 mL de capacidad (según fuera necesario) una cantidad de 16 mL y 40 mL de dieta respectivamente. Los recipientes se ubicaron en una campana de extracción hasta que se observó su polimerización. Para su conservación, fueron almacenados en un refrigerador a 4°C.

Crianza de Insectos de *H. armigera*

La crianza de los insectos se realizó en un cuarto a 23°C de temperatura promedio y 8 horas luz. Los adultos fueron alimentados con una mezcla de agua destilada y miel al 10%, mientras que las larvas fueron alimentadas con dieta artificial descrita por Vieira et al. (2018), con algunas modificaciones (Tabla 1).

Adultos

Los primeros adultos procedentes de las pupas cedidas por el Prof. Dr. Roberto Parra y sexadas bajo estereoscopio en laboratorio a partir de la identificación de una cicatriz de apertura genital ubicada en medio del segmento A8(♀) o A9(♂) del abdomen ventral, permanecieron en cámaras o jaulas de cría 1A. Estas primeras cámaras fueron tubos de PVC de 6 pulgadas y 20 cm de alto aproximadamente (Figura 1), sobre los cuales, uno de sus extremos fue cubierto con un cuadro de 22*22 cm de tela tul, asegurada con un resorte. Cada cámara se

dejó sobre un plato de aproximadamente 2 cm de profundidad, cubierto por papel absorbente para mantener las pupas protegidas, sobre el cual post-eclosión pupal de los primeros adultos se posicionó un algodón previamente humedecido con solución de agua destilada y miel al 10%. La parte interna del tubo fue recubierta con papel de impresión tamaño A4 de 21 x 29,7 cm para permitir su cambio al momento de hacer la limpieza de las jaulas.

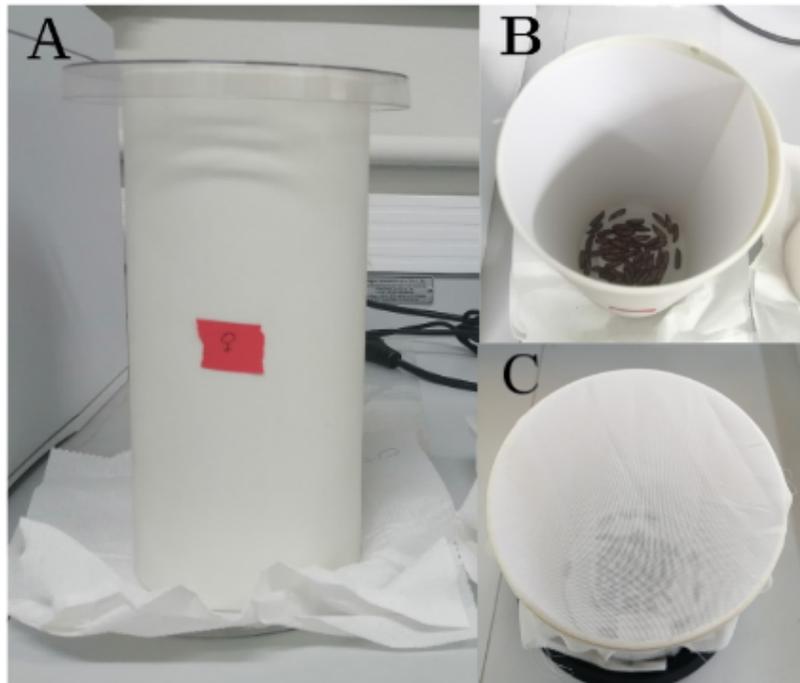


Figura 1. Jaula tipo 1A usada para albergar pupas de acuerdo a su sexo.(A) Cámara identificada con hembras con placa de petri en su parte inferior y superior, (B) cámara recubierta con hoja tipo A4 de 21 x 29,7 cm, (C) cámara con tela tul asegurada en espera de eclosión pupal.

Después de seleccionar 10 hembras adultas al azar de las jaulas 1A para cada tratamiento por repetición, se procedió con la inyección del complejo ARNg y posterior traslado individual a cámaras tipo 1B (Figura 2) con su respectivo macho. Esta jaula consistía en vasos de plástico descartable de 500 mL en cuya base se depositó un algodón humedecido con 2,5 mL de solución de agua destilada y miel al 10% y cubierto por una tela tul de 12*12 cm asegurada con un resorte. Para la limpieza de las jaulas, el papel que cubrió la pared interna del vaso, la tela y el algodón se cambió cada tres días cuando se realizó el conteo de las oviposiciones. Sin embargo, el algodón fue hidratado a diario con una jeringa de 20 mL para minimizar la manipulación de las unidades experimentales.



Figura 2. Jaula tipo 1B usada para albergar hembras post-inyección con su respectivo macho, momento previo a la oviposición.

Huevos

Las oviposiciones se colectaron de la tela tul en las jaulas 1B cada 3 días hasta la muerte de los adultos. Los cuadros de tela que presentaron más de 800 posturas fueron divididos en segmentos más pequeños. Cada uno de los segmentos fue adherido a la tapa de la cámara tipo 2 o jaula tipo 2 con cinta adhesiva (Figura 3). Esta jaula constaba de un vaso de plástico de 500 mL en cuyo interior previamente fueron depositados aproximadamente 40 mL de dieta artificial (Tabla 1).

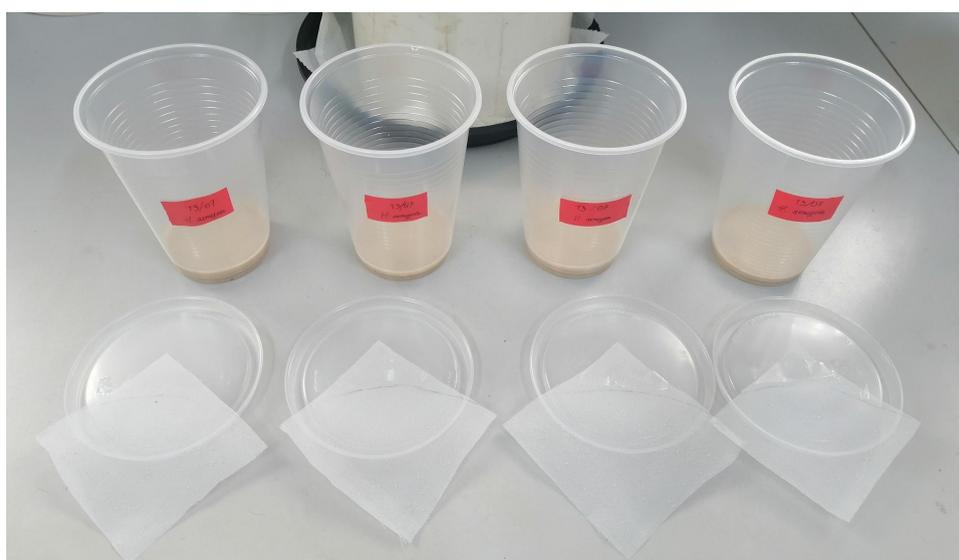


Figura 3. Jaulas tipo 2 usadas para incubar huevos de *H. armigera*.

Larvas

Después de 4-5 días de eclosión de los huevos, las larvas se trasladaron a cámaras tipo 3 (Figura 4). Estos recipientes fueron pequeños vasos individuales de 50 mL con el fin de proporcionar a cada larva el alimento necesario para su normal desarrollo y evitar la depredación o canibalismo. Cada uno de los recipientes contenía dos larvas con aproximadamente 16 mL de dieta artificial. Los vasos fueron cubiertos por una placa de acrílico transparente con el fin de evitar su escape.



Figura 4. Jaulas tipo 3 usadas para incubar larvas de *H. armigera* hasta la formación de pupa.

Pupas

Al finalizar el sexto y último instar larval (21 días aproximadamente bajo las condiciones en laboratorio) se observó la formación de las primeras pupas. En ese momento, fue posible proceder con la separación de machos y hembras bajo el estereoscopio diferenciando una cicatriz de apertura genital femenina ubicada en medio del segmento A8 del abdomen ventral, o una abertura genital masculina en el segmento ventral A9, rodeada de pequeñas protuberancias ovaladas (Figura 5).

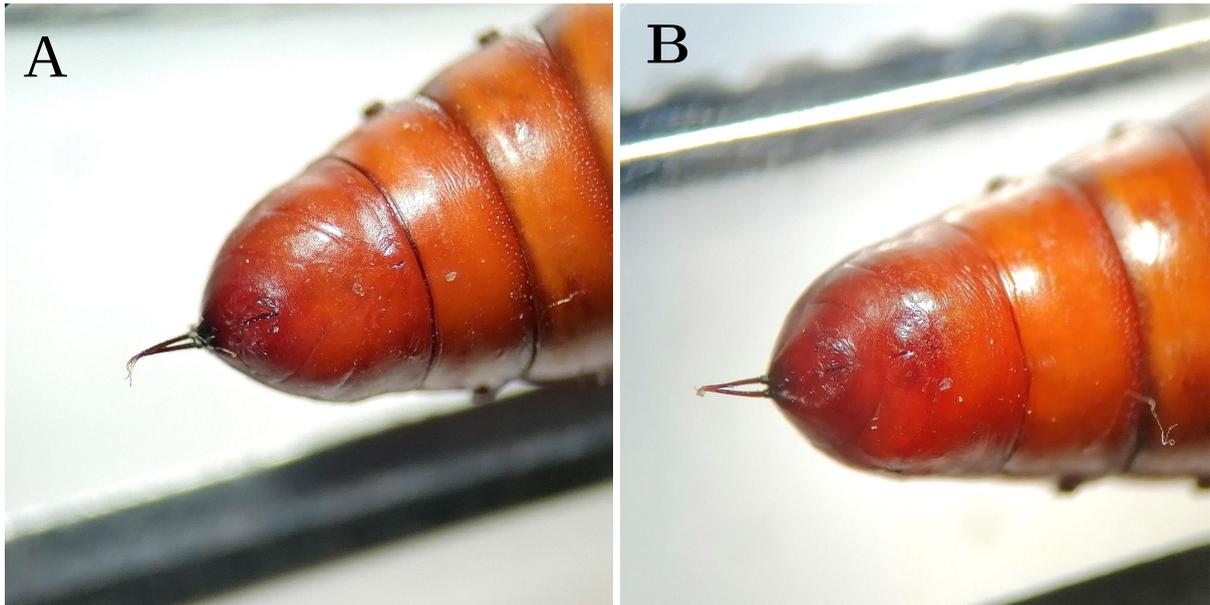


Figura 5. Región posterior de pupas de *H. armigera*. (A) Visión ventral de hembra, (B) visión ventral de macho.

Preparación de Microinyecciones

Las agujas para microinyecciones se obtuvieron en pares. Para obtener las dos agujas se posicionó un capilar de vidrio de borosilicato en un extractor de aguja NARISHIGE modelo PC-100 con un calentador de alambre Kanthal de 2,5 V, programado con 2 *steps* a 55°C y tres pesos (aprox. 150 g) (Figura 6). Para formar el bisel de la punta se optó por dos metodologías, la primera consistió en realizar un ligero corte en la punta de la aguja bajo microscopio con una pinza recta de punta fina, y la segunda en perforar látex con ella, lo cual aseguró su resistencia y calibre para no causar daño al momento de inyectar al insecto (Figura 7).



Figura 6. Extractor de aguja NARISHIGE modelo PC-100 usado en laboratorio para obtener microagujas a partir de capilares de vidrio de borosilicato.

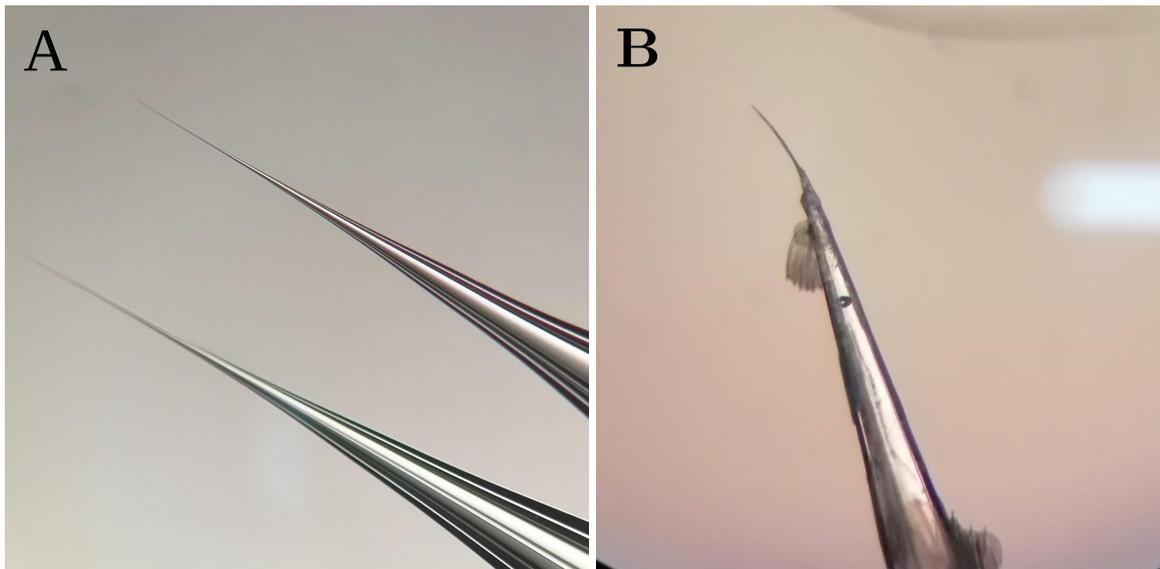


Figura 7. Microagujas a partir de capilares de vidrio de borosilicato. (A) Microagujas pre-inyección de adultos, (B) microagujas post-inyección de adultos.

Preparación del Complejo Cas9-ARNg

La preparación del complejo ribonucleoproteico se realizó siguiendo la metodología descrita por Kistler et al. (2015) y siguiendo los protocolos de manufactura para cada kit.

Se usó 100 µg de la nucleasa Cas9 V3 que tiene un péptido de localización nuclear y una etiqueta de histidina en la posición 6 de la región C-terminal (6 His). La proteína se adquirió con la empresa *Integrated Dna Technologies* (IDT) con el registro: Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3, Cat#:1081058, Lot#: 0000733075. Por otra parte, los dos ARNg fueron dirigidos al exón 5 del gen *Scarlet* (*St*) de *H. armigera* (*Ha-st-1* y *Ha-st-2*, acceso por GenBank: KU754478) para inducir mutaciones (Figura 8). Debido a los polimorfismos de tipo SNP en la región objetivo, se utilizaron dos construcciones diferentes para el ARNg partiendo de dos secuencias de ADN que fueron sintetizadas por la empresa de biotecnología Exxtend en el Estado de São Paulo (Tabla 2), cuyas secuencias son: 5'-TCACTCTCATCGGAGG CCTGGAT**GGAAGGAAGACCTTGTC****A**GGCGGGGAGAGAAAGAGACTGGCAT-3' y 5'-TCACTCTCATCGGAGGCCTGGAT**GGAAGGAAGACCTTGTC****G**GGCGGGGAG AGAAAGAGACTGGCAT-3'. Con cada secuencia se realizó una PCR, usando el primer ARNg universal 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA CGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3' para formar el template necesario para la transcripción *in vitro* a ARNg usando el kit MEGAscript™ T7 Transcription de la empresa Invitrogen™, siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARNg se confirmó usando electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 9).

Tabla 2. Sitios target y ARNg utilizados para inducir mutaciones en el gen *St* de *H. armigera*.

Gen	Targets	ARNg 5'-3'
<i>Ha-st-1</i>	GGAAGGAAGACCTTGTCAGG	GAAATTAATACGACTCACTATA GGAAGGAAGACCTTGTC AGG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>Ha-st-2</i>	GGAAGGAAGACCTTGTCGGG	GAAATTAATACGACTCACTATA GGAAGGAAGACCTTGTC GGG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

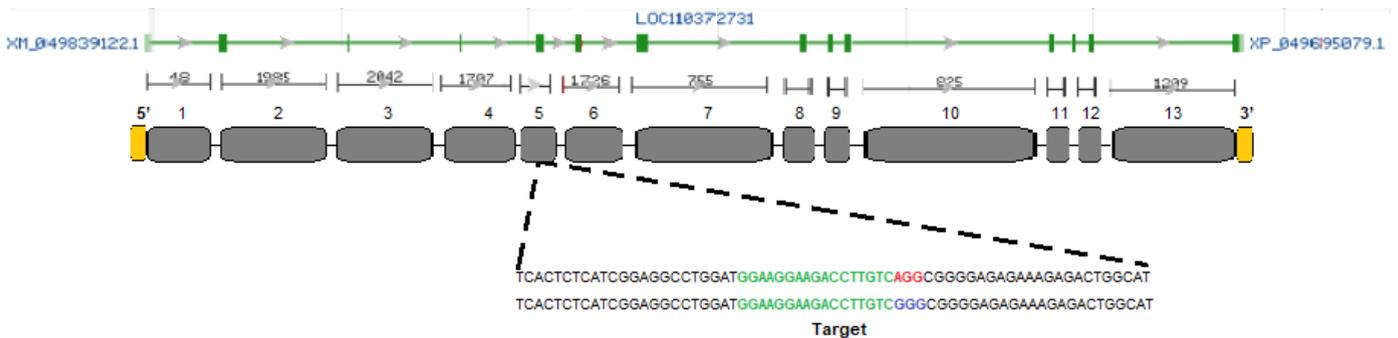


Figura 8. Representación esquemática de exones del gen *St* de *H. armigera* y SNPs en la secuencia, que se muestran en rojo (*Ha-st-1*) y azul (*Ha-st-2*). Modelo basado en Khan et al. (2017).

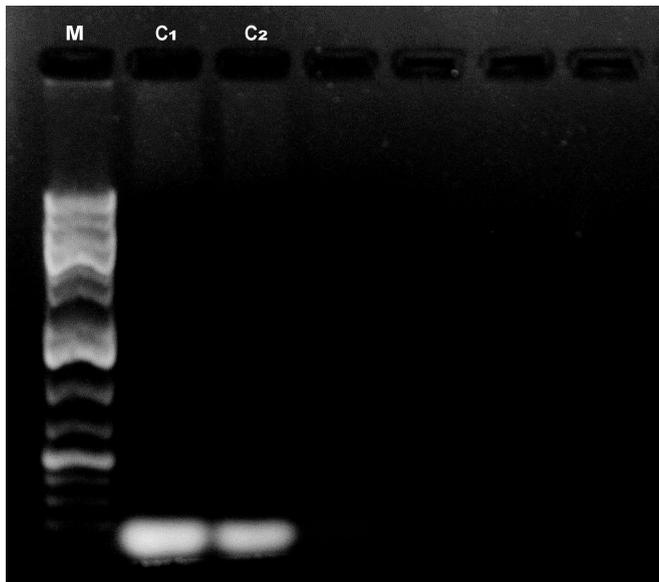


Figura 9. Análisis electroforético en gel de agarosa al 2%, que muestra los resultados de la PCR preliminar que confirma la calidad de los ARNg post-transcripción *in vitro* usados para la preparación del complejo Cas9-ARNg inyectado a hembras adultas de *H. armigera*. **M:** marcador de peso molecular. **Carril 1:** *Ha-st-1*. **Carril 2:** *Ha-st-2*.

Para inducir mutaciones en el gen *St* mediante DIPA-CRISPR se mezcló la enzima Cas9 y los dos ARNg preparados previamente, conservando la solución en

alícuotas de 2 μL a -80°C . Cada alícuota se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo de RNP (Cas9-ARNg). La inyección se realizó utilizando un micro-inyector neumático con presión de vacío modelo PV830 marca WPI (Figura 10), equipado con un micromanipulador MN-153 NARISHIGE y una aguja capilar de vidrio preparada con antelación. La presión estándar fue de 35 psi, un rango de 100 ms y 10 periodos.



Figura 10. Equipo de laboratorio para realizar microinyecciones en hembras adultas y huevos de *H. armigera*. **(A)** Micro-inyector neumático con presión de vacío modelo PV830 de la marca WPI usado en laboratorio; **(B)** micromanipulador MN-153 NARISHIGE posicionado bajo microscopio.

Los tratamientos corresponden a los días 1, 2 y 3 post-emergencia de adultos (PEA). Para cada tratamiento se inyectaron a 20 hembras en su abdomen ventral aproximadamente 0,5 μL de la solución de Cas9-ARNg que contenía aproximadamente 3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cas9 (IDT, Cat#1081058) y 1,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ARNg (una mezcla de ARNg1 y ARNg2) (Figura 11). Como tratamiento control fueron inyectadas 20 hembras en los días 1, 2 y 3 PEA con aproximadamente 0,5 μL de agua Milli-Q®.

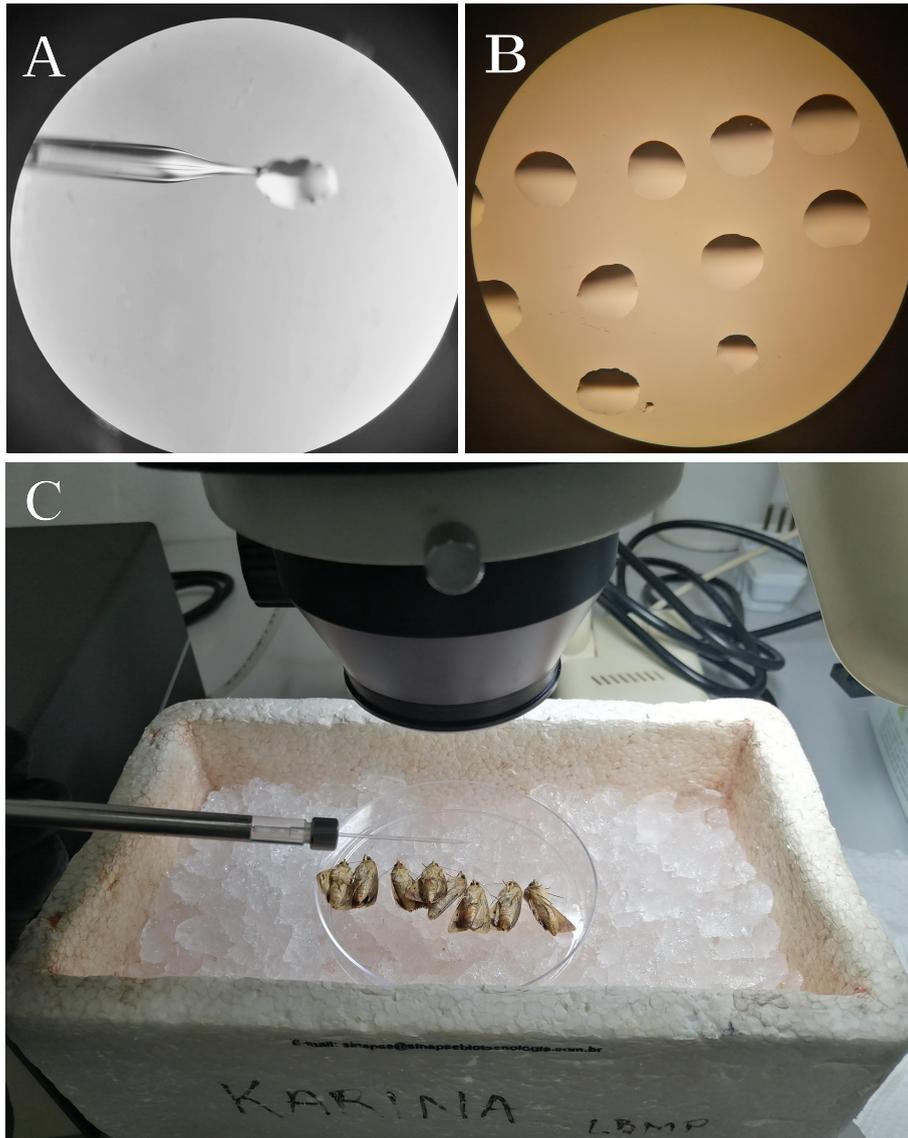


Figura 11. Inyección de Cas9-ARNg a hembras adultas de *H. armigera*. (A, B) Alícuotas de 2 µl inyectadas bajo microscopio, (C) hembras de *H. armigera* anestesiadas en hielo.

Las hembras adultas inyectadas fueron ubicadas en jaulas tipo 1B individuales con su respectivo macho a espera de la cópula y consecuentemente obtener la primera generación (G0) para cada tratamiento. Los colores de los ojos de las mariposas G0 fueron examinados durante la etapa adulta con estereoscopio. En su estado larval se observó el color de la cutícula y mosaicos que pudieron o no formarse en ellas. Se evaluó el número de oviposiciones, color y porcentaje de viabilidad.

Eficacia del Complejo Cas9-ARNg

Para confirmar la eficacia del complejo Cas9-ARNg preparado en laboratorio, se inyectaron 900 huevos de *H. armigera* en su primera hora post-oviposición. Para

obtener las microagujas se posicionó un capilar de vidrio de borosilicato en el extractor PC-100 programado con dos etapas de 55 °C y 55,8 °C respectivamente, y cuatro pesos (aprox. 250 g). Por otra parte el micro-inyector neumático PV830 fue programado con una presión de 5,2 psi, un rango de 100 ms y 5 periodos, lo que aseguró la inyección de aproximadamente 2 nL por huevo de la mezcla de los dos ARNg cuya concentración fue reducida a 150 ng/μL y 50 μL de la proteína Cas9 de la empresa PNA Bio Inc. Se obtuvo un volumen final de 28 μL (5 μL de ARNg, 12 μL de Cas9 y 11 μL de agua Milli-Q® pura) conservado en alícuotas de 2 μL a -80 °C. El complejo se almacenó en alícuotas para evitar la degradación de la proteína debido a cambios abruptos de temperatura, una vez que las inyecciones se realizaron a lo largo de una semana.

Para este segundo experimento se aislaron un total de 32 hembras y 32 machos distribuidos y emparejados uniformemente en 8 cámaras 1A. Al tercer día después de formadas las parejas, se renovó cada una de las telas que cubrían las jaulas, a partir de ese momento, cada 15 - 20 min. Los tejidos con mayor número de oviposiciones fueron seleccionados y divididos en segmentos de 45x25 mm aproximadamente, los cuales fueron adheridos a un portaobjetos con cinta dupla face e inyectados en los siguientes 40 min. Aquellos huevos que no alcanzaron a ser inyectados fueron descartados para proseguir con una nueva recolección. Los huevos que lograron ser inyectados fueron sellados en cajas petri con papel filtro esteril previamente humedecido con agua destilada, rotulado e incubados a 23 °C en promedio. Las larvas que con el paso de los días eclosionaron, fueron trasladadas con la ayuda de un pincel a cámaras tipo 2, las cuales, diariamente se observaron bajo estereoscopio en busca de presencia o ausencia de mosaicos en la cutícula. En su tercer instar cada larva fue trasladada individualmente a jaulas tipo 3 a la espera de pupas que puedan ser sexadas y finalmente se puedan obtener adultos, que podrían ser de tipo: mutantes, salvajes o quimeras.

Diseño Experimental

El experimento se llevó a cabo mediante un diseño de bloques completamente al azar con dos factores y dos repeticiones, donde el factor uno corresponde a la inyección del complejo Cas9-ARNg y agua Milli-Q® (control), y el factor dos al número de horas post-eclosión pupal a la cual se realizaron las inyecciones, incluyendo tres periodos 24, 48 y 72 h (Tabla 3).

Tabla 3. Factores y unidades biológicas evaluados en el transcurso de la investigación.

Factor 2 \ Factor 1	Cas9-ARNg	H ₂ O
Inyección en las primeras 24 h post-eclosión pupal	20 hembras inyectadas con su respectivo macho	20 hembras inyectadas con su respectivo macho

Inyección en las 25-48 h post-eclosión pupal	20 hembras inyectadas con su respectivo macho	20 hembras inyectadas con su respectivo macho
Inyección en las 49-72 h post-eclosión pupal	20 hembras inyectadas con su respectivo macho	20 hembras inyectadas con su respectivo macho

Variables Evaluadas

Número de Huevos por Postura. Junto al cambio del tejido y limpieza de las jaulas 1B, el conteo de huevos se realizó cada tres días. Para ello, cada tela se posicionó bajo un estereoscopio y se dividió en cuadrantes con la finalidad de disminuir los errores al momento de las evaluaciones (Figura 12). El conteo de los huevos se realizó con un contador numérico manual de 4 dígitos. Terminado el registro, cada tejido se trasladó a cámaras tipo 2 a la espera de la emergencia de larvas.

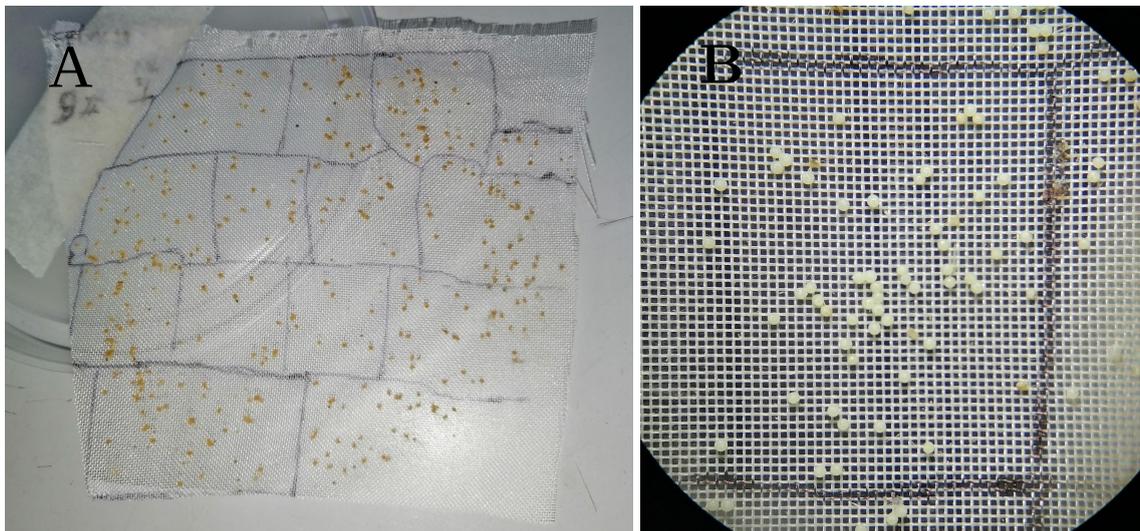


Figura 12. Tejido de jaulas 1B con posturas de *H. armigera*. (A) División en cuadrantes para conteo de oviposiciones, (B) cuadrante individual bajo estereoscopio con aumento de 4x.

Viabilidad de Huevos. Una vez registrado el número de huevos y número larvas por unidad biológica, se realizó la sumatoria total de las posturas y emergencia de larvas por tratamiento. Con estos valores se calculó la viabilidad de los huevos que las hembras de *H. armigera* ovipositaron en el transcurso del experimento, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad de huevos (\%)} = \frac{\text{Larvas que emergieron}}{\text{Total de huevos}} * 100$$

Mutantes Scarlet. Cada larva proveniente del parental inyectado con el complejo Cas9-ARNg se posicionó bajo un estereoscopio para observar sus características fenotípicas y registrar o separar cualquiera que presentara aquellas asociadas a la mutación *stst*, conforme lo descrito por Khan et al. (2017). Para asegurar la calidad de los datos, cada adulto que eclosionaba diariamente de su pupa fue llevado bajo un estereoscopio donde se observó y registró el color de sus ojos.

Supervivencia. Teniendo en cuenta el número de pupas y adultos G0 por cada tratamiento al finalizar el experimento, se obtuvo en términos de porcentaje la supervivencia de pupas provenientes de parentales inyectados con Cas9-ARNg y agua Milli-Q®.

Análisis Estadístico

Las variables cuantitativas para número de huevos por postura se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) con el fin de identificar aquellas que presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), usando el software R v4.2.0 (<https://www.r-project.org/>) y teniendo en cuenta el siguiente modelo estadístico (Ecuación 1).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = variable de respuesta en la repetición k-ésima, del día j-ésimo en que se inyectó y sustancia i-ésima inyectada,

μ = efecto de la media general,

α_i = efecto del tipo de inyección (Cas9-ARNg y agua Milli-Q®),

β_j = efecto del día de la inyección (1, 2, 3 días post-eclosión pupal),

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto compuesto de la interacción de los dos factores,

y ε_{ijk} = error experimental.

Las variables que presentaron diferencias significativas fueron sometidas a la prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0,05$).

Resultados y Discusión

En el transcurso de las evaluaciones fue posible identificar tres huevos G0 de parentales inyectados con el complejo Cas9-ARNg en el segundo día post-emergencia, los cuales presentaron las características descritas por Khan et al. (2017). Es decir, una coloración clara o blanca a lo largo de su desarrollo hasta la

eclosión (Figura 13). Este número equivale al 0,3% del total de los huevos que lograron eclosionar y el 0,017% del total de los huevos ovipositados, procedentes de hembras inyectadas entre las 25-48 h post-eclosión pupal. Estas larvas en sus primeras 48 horas presentaron una menor pigmentación al compararlas con sus hermanas, llegando a ser casi translúcidas, por lo que fueron identificadas como mutantes potenciales. Al cabo de su segundo instar, se comenzaron a formar líneas dorsales longitudinales de color amarillo o marrón claro, un rasgo común en larvas de *H. armigera* (Queiroz-Santos et al., 2018). Al llegar al sexto instar larval, se pudo observar áreas estrechas de color amarillo claro a lo largo de la región dorsal, intercaladas con áreas de color rosa claro de ancho equivalente y vetas grises, características que solo pudieron ser identificadas en estas tres larvas que pudieron haber presetado la mutación *stst*. No obstante, el cuerpo de *H. armigera* puede exhibir dos patrones de color distintos (Queiroz-Santos et al., 2018). Por este motivo, estos adultos deben ser estudiados con más detalle para obtener conclusiones más confiables. Al momento de emergencia de la pupa, los adultos presentaron un color de ojos verde, igual a aquellas larvas G0 cuyos parentales fueron inyectados con agua Milli-Q® (Figura 13). De tal manera que, bajo las condiciones del laboratorio con las concentraciones de Cas9 y ARNg evaluadas, no fue posible obtener mutantes *St*^{-/-} o quimeras *St*^{+/-} de *H. armigera* a través de la técnica de inyección directa del parental femenino (DIPA-CRISPR). Aunque lo más probable es que haya sido posible obtener mutantes, usando una mayor concentración de la RNP Cas9-ARNg, de forma proporcional al tamaño del insecto.



Figura 13. Identificación de mutantes potenciales G0. **(A)** Huevos G0 identificados como mutantes potenciales, **(B)** huevos G0 provenientes de parentales inyectados con agua Milli-Q®, **(C)** larvas G0 identificadas como mutantes potenciales en sus primeras 48 h post-eclosión, **(D)** adulto G0 identificado como mutante potencial a la izquierda y adulto salvaje a la derecha.

Para la implementación de técnicas de edición genómica, es de vital importancia conocer la vitelogénesis del insecto estudiado (Shirai et al., 2022). En *H. armigera*, los ovocitos en desarrollo suelen acumular proteínas de la yema durante la ovogénesis a través de la endocitosis mediada por receptores (Telfer, 2009; Gong et al., 2021). En esta etapa precursores grasos liberados en la hemolinfa como la vitelogenina transcrita a partir del gen *HaVgR*, juegan un papel importante en la importación de proteínas sanguíneas (Hussain et al., 2021). Estudios demuestran que los patrones de expresión del gen *HaVgR* en las hembras adultas son importantes en la metamorfosis, alcanzando un pico en su segundo día post-eclosión y disminuyendo gradualmente con el paso de los días siguientes (Zhang et al., 2016). Es por esta razón que se decidió inyectar hembras adultas en su primeras 24 h, 48 h y 72 h post-eclosión pupal, al contrario de lo ocurrido con *T. castaneum*, cuyos valores de eficiencia de edición genética (GEF) alcanzaron su punto máximo (50,8%) al cuarto y quinto día después de la emergencia, momento que coincide con el inicio de la vitelogénesis en este insecto. En *H. armigera*, la GEF fue nula bajo la concentración del complejo usado en este estudio. A pesar que en la endocitosis ocurre una captación no selectiva de material extracelular, y los ovarios puedan absorber y acumular proteínas no vitelogénicas de la hemolinfa, como en el caso de los RNPs de Cas9-ARNg, los cuales, interrumpen los genes diana en los núcleos que desarrollarán ovocitos y/o embriones fertilizados (Shirai et al., 2022). Los resultados indican que la edición genética no fue posible debido a que posiblemente las concentraciones del complejo Cas9-ARNg deben ser específicamente ajustadas a una especie objetivo para la edición eficiente de genes en lepidópteros. Además, las proteínas podrían usar ligandos de péptidos específicos de la especie que puedan fusionarse con la proteína Cas9 para asegurar la incorporación de la RNP al núcleo y consecuentemente la inducción de mutaciones en los embriones (Shirai et al., 2022). Estos ajustes deben estar correlacionados al tamaño del insecto debido a la cantidad de hemolinfa involucrada en la vitelogénesis, la baja y no nula selectividad del material extracelular y los genes diana evaluados en el experimento.

Con base en la vitelogénesis de *H. armigera* cuyo patrón de expresión del gen *HaVgR* alcanza un pico en hembras adultas de 2 días (Zhang et al., 2016), se recomienda evaluar concentraciones de Cas9 de la solución inyectable con la que la edición de genes sea viable. Para que, de esta forma, la tecnología DIPA-CRISPR logre ser eficiente y pueda ser replicada en cualquier laboratorio.

Por otro lado, la técnica convencional de inducción de mutaciones por inyección a los huevos fué un éxito. Para asegurar la calidad del complejo

Cas9-ARNg diseñado en laboratorio, se procedió a realizar inyecciones de huevos en su primera hora post-oviposición. Se realizaron 900 inyecciones a lo largo de una semana. 350 de los huevos eclosionaron, de los que se pudo obtener 286 mutantes *stst*, entre ellos 9 quimeras. Lo anterior indica una tasa de inducción de mutaciones de por lo menos 82% en relación a las larvas que lograron eclosionar, y un 32% en relación con el número total de inyecciones realizadas. Para esto, a lo largo del ciclo de vida de los insectos, diariamente se realizaron observaciones con estereoscopio en busca de características fenotípicas que caracterizan a la especie y aquellas que son propias de los mutantes.

Al cabo de dos o tres días post-inyección, los huevos inyectados con agua Milli-Q® comenzaron a tomar una coloración ligeramente más oscura, siendo fácil identificar una franja continua marrón claro. En el caso de los huevos inyectados con el complejo Cas9-ARNg, la mayoría de ellos aún presentaban su característico color blanco-crema o una franja marrón claro discontinua (Figura 14).

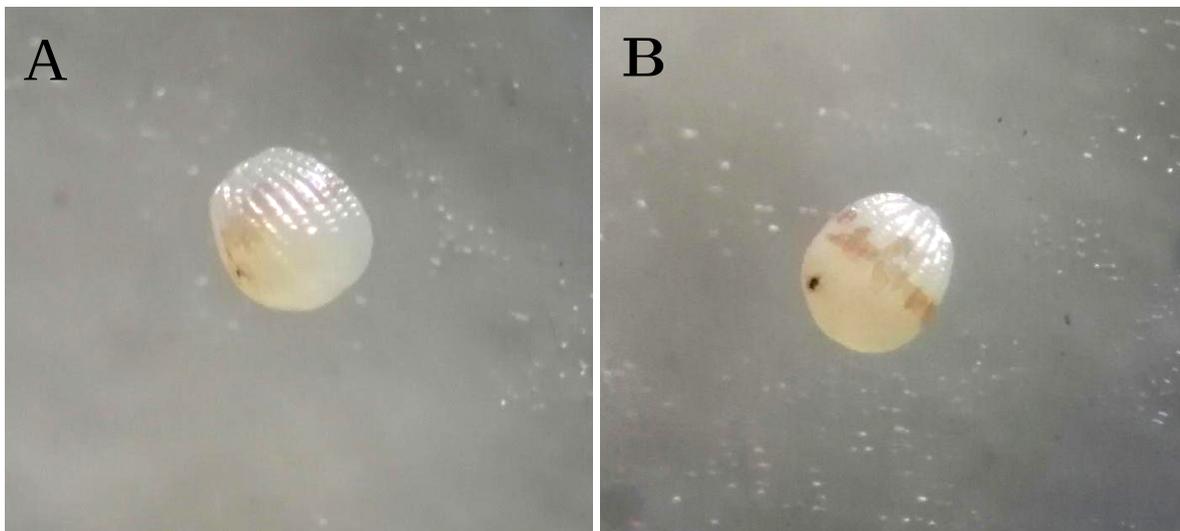


Figura 14. Huevos de *H. armigera* 48 h post-inyección. (A) Inyección con el complejo Cas9-ARNg presenta una franja marrón claro discontinua, (B) inyección con agua destilada con una franja marrón continua.

En su segundo instar larval, en la cutícula de los mutantes *stst* comenzaron a formarse pigmentos marrones adicionales en forma de mosaico que se conservaron hasta el 5 instar. Esta colocación interrumpía el recorrido longitudinal de las franjas de color amarillo oscuro que normalmente se forman en el dorso de las larvas (Figura 15). En el caso de las quimeras, esta pigmentación parda sólo se formó en la mitad del dorso derecho o izquierdo, junto a su área supra-espíracular y sub-espíracular, formando una línea longitudinal bien definida en el centro de la larva. Esta característica se mantuvo hasta el 4 o 5 instar (Figura 17).



Figura 15. Fenótipos de *H. armigera* causados por la inducción de mutaciones en el gen *St*. (A) Larva translúcida en su primer instar, (B) segundo instar larval, (C) tercer instar larval, (D) cuarto y quinto instar larval, (E, F) mutante homocigoto para *St*^{-/-}, (G, H) mutante *knockout* para los dos genes homólogos *stst* y *okok* (*St*^{-/-}*Ok*^{-/-}).

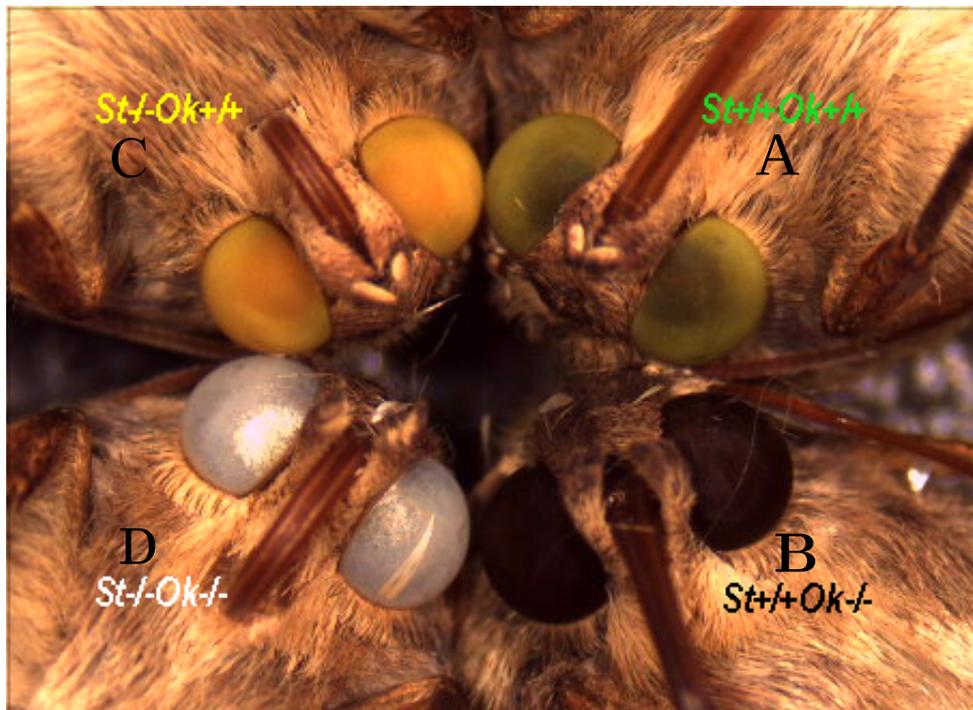


Figura 16. Fenotipo de adultos de *H. armigera* con mutaciones inducidas en los genes *St* y *Ok*. (A) Color de ojos verde tipo salvaje de *H. armigera* con genes funcionales tipo *St* y *Ok*, (B) mutante homocigoto *okok* con ojos negros (*St*^{+/+}*Ok*^{-/-}), (C) mutante homocigoto *stst* con ojos amarillos (*St*^{-/-}*Ok*^{+/+}), (D) doble mutante con ojos blancos (*St*^{-/-}*Ok*^{-/-}).



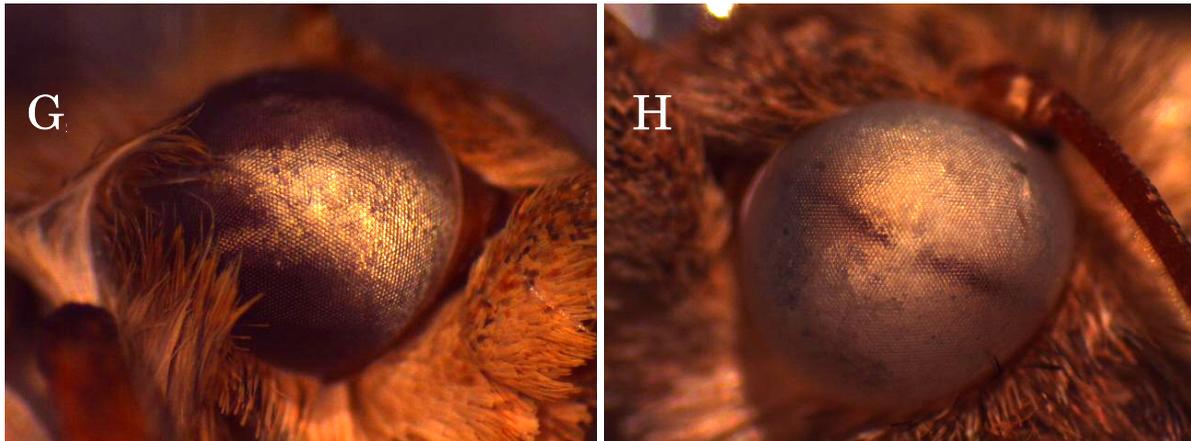


Figura 17. Quimeras del gusano cogollero *H. armigera* provenientes de la inducción de mutaciones para el gen *St*. (A) Segundo instar larval, (B) cuarto instar larval, (C,D) adultos quimeras con diferentes rangos de mutación de células oculares, (E,F) fotografías ampliadas del ojo en mosaico de los adultos con células oculares mutadas y no mutadas.

Para mutantes simples y dobles, quimeras y salvajes, la pupa obtecta presentó una coloración marrón clara inmediatamente después de empupar, y marrón oscuro después de cinco días. La diferencia se presentó en los ojos notablemente oscuros justo antes de la eclosión de las mariposas con ojos verdes (fenotipo salvaje con *St*^{+/+} y *Ok*^{+/+} funcionales) y negros (mutantes adultos que no heredaron el gen *Ok*, pero si *St*, *St*^{+/+}*Ok*^{-/-}).

Las larvas de mosaico se desarrollaron hasta la edad adulta de forma normal, presentando omatidios amarillos o blancos en ambos ojos (Figura 15). Por otra parte, las larvas G0 que fueron identificadas como quimeras, dieron lugar a adultos con franjas alternas de omatidios verdes y negros (Figura 17E), franjas con omatidios negros y blancos (Figura 17G,H), mosaicos de omatidios verdes y amarillos (Figura 17F), y adultos con heterocromia completa (Figura 17C,D). Estos diferentes rangos de mutación de células somáticas y patrón de piel en mosaico o longitudinal pueden deberse a que, en el momento de realizar la inyección ya habría ocurrido una segmentación embrionaria. Es decir que, el cigoto pudo realizar su primera división por mitosis generando dos blastómeros, de los cuales solo uno de ellos recibió el complejo RNP, ocasionando que el gen *St* deje de ser funcional en uno de los segmentos embrionarios (Panfilio & Chuva, 2022). De tal manera que, el embrión fué creciendo con células mutantes y células normales, presentando ese característico mosaico fenotípico.

A pesar de que el ARNg no se diseñó para inactivar el gen *ok*, se obtuvieron mutantes con ojos negros (*St*^{+/+}*Ok*^{-/-}) y blancos (*St*^{-/-}*ok*^{-/-}). Para comprobar la especificidad del ARNg, se realizó un alineamiento entre las secuencias target, el gen *St* y el gen *Ok* usando el software MEGA11 (Figura 18), además de una prueba de chi-cuadrado (X^2)(Tabla 4). Los resultados indican que, de los 20.746 nt que integran al gen *Ok* localizados en el cromosoma 5 de *H. armigera*, 15 nt pudieron ser alineados con las secuencias target del gen *St*, encontrando 5 polimorfismos en

dicho fragmento.

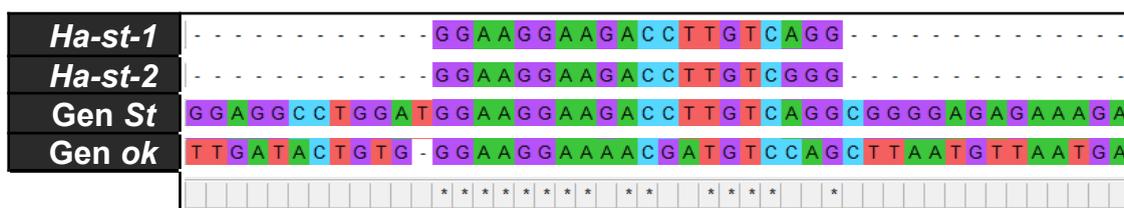


Figura 18. Alineamiento de las dos secuencias target con la región blanco del gen *St* y la región de mayor identidad para el gen *Ok* utilizando las herramientas del software MEGA, versión 11. () Motivos de secuencia diferentes, (*) motivos de secuencia similares, (-) delección de una base nucleotídica.

A pesar de presentar una alta homogeneidad con las secuencias target, desde un punto de vista estadístico, la prueba de chi-cuadrado reveló que la frecuencia de la mutación *okok* fue igual para aquellos embriones inyectados con el complejo Cas9-ARNg como con agua. De tal manera que, la probabilidad de efectos *off-target* por el complejo Cas9-ARNg sobre el gen *Ok*, no es significativa ($p < 0.05$) para el caso de este experimento. Por tanto, el gen *Ok* puede presentar una penetrancia incompleta dentro de la muestra poblacional estudiada causando que los insectos expresen o no el gen en su fenotipo.

Tabla 4. Prueba de chi-cuadrado para la asociación estadística entre adultos de *H. armigera* de acuerdo al fenotipo 'color de ojos'.

	Número de Adultos		Valores Esperados		X^2_T	X^2_C	gl	p-valor
	Ojos Verdes + Ojos Amarillos	Ojos Negros + Ojos Blancos	ok+/+	ok-/-				
	ok+/+	ok-/-	ok+/+	ok-/-				
CRISPR-Cas9	136	16	137,358	14,642	3,842	0,4602	1	0,05
H ₂ O	61	5	59,642	6,358				

Con estos resultados, la inyección de huevos obtuvo una eficiencia de edición de genes del 82% en relación al número de huevos eclosionados. De esta forma se confirmó la efectividad del complejo Cas9-ARNg diseñado en el laboratorio, lo cual, resalta la necesidad de seguir con evaluaciones que ayuden a esclarecer las concentraciones óptimas para lograr la eficiencia de edición genética con la tecnología DIPA-CRISPR en *H. armigera*. A nuestro conocimiento, es la primera evidencia de inducción de mutaciones en lepidópteros en Brasil. Por lo que, estos resultados serán útiles para avanzar en la generación de herramientas biotecnológicas que puedan auxiliar el manejo integrado de plagas.

Por otro lado, los resultados indican que el complejo de Cas9-ARNg no causó ningún efecto negativo en la producción de huevos por hembra, en ninguno de los

días evaluados (Tabla 5). En relación al número de huevos por tratamiento, los resultados indican que los efectos producidos por el tipo de sustancia inyectada (Complejo Cas9-ARNg o agua Milli-Q®) y día post-eclosión pupal en los que se inyectó (1er, 2do y 3er día), no afectaron el número de oviposiciones por hembra adulta. Estos resultados sugieren que la concentración evaluada de Cas9 y ARNg no causó toxicidad o influyó en la capacidad de oviposición de las hembras, asegurando un punto de partida para próximas evaluaciones.

Tabla 5. Análisis de varianza bajo un modelo estadístico factorial para el número de oviposiciones dependiente de los días de inyección (1, 2, 3 post-eclosión) y sustancia inyectada (Complejo Cas9-ARNg o agua destilada).

	GL	Sum Cuad	Cuad Med	Valor F	Valor P
RNP y H ₂ O (Fac1)	1	14008	14008	0,74	0,39
Días de inyección post-eclosión (Fac2)	2	8806	4403	0,23	0,79
Bloque	1	109749	109749*	5,78	0,0208
Fac1:Fac2	2	19712	9856	0,52	0,5988
Residuos	41	778134	18979		

Signif. : 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

*:Diferencias significativas ($p < 0.05$); **:Diferencias altamente significativas; Fac1: Sustancia inyectada en hembras adultas, Cas9-ARNg o agua Milli-Q®; Fac2: Días post-eclosión pupal, primeras 24 h, 48 h y 72 h; Fac1:Fac2 interacción entre factores.

El conteo de huevos se realizó cada tres días para cada tratamiento, tanto para las hembras inyectadas con Cas9-ARNg, como con agua Milli-Q®. En condiciones de laboratorio, algunos adultos llegaron a vivir hasta 23 días post-eclosión, por lo que, para fines estadísticos y eliminación de datos atípicos, se determinó evaluar el número de oviposiciones pasados 3, 6, 9 y 12 días post-inyección de la hembra, datos que revelaron diferencias significativas entre ellos.

El número de oviposiciones del tercer y sexto día fueron similares, con promedios de 189 y 300 huevos, para las hembras inyectadas con CRISPR, y 243 y 178 huevos, para las hembras inyectadas con agua, respectivamente (Figura 19). De igual forma, el tercer y sexto día después de la oviposición fueron los de mayor producción de huevos. Los resultados concuerdan con lo reportado por Zha et al. (2013) cuyo patrón diario de oviposición alcanza el punto máximo al tercer y cuarto día, comenzando a disminuir desde séptimo y octavo día post-emergencia del adulto. Esto se debe a que en los primeros días post-eclosión pupal la ingesta de sangre por los ovarios gracias a la expresión de precursores de la proteína de yema (YPPs) estimula la vitelogénesis y crecimiento del huevo (Leyria et al., 2022). Por medio de la transcripción de los receptores endocíticos, es decir, el receptor Lp (*RhoprLpR*) y receptor de Vg (*RhoprVgR*) cuya estimulación disminuye con el paso

de los días (Leyria et al., 2022).

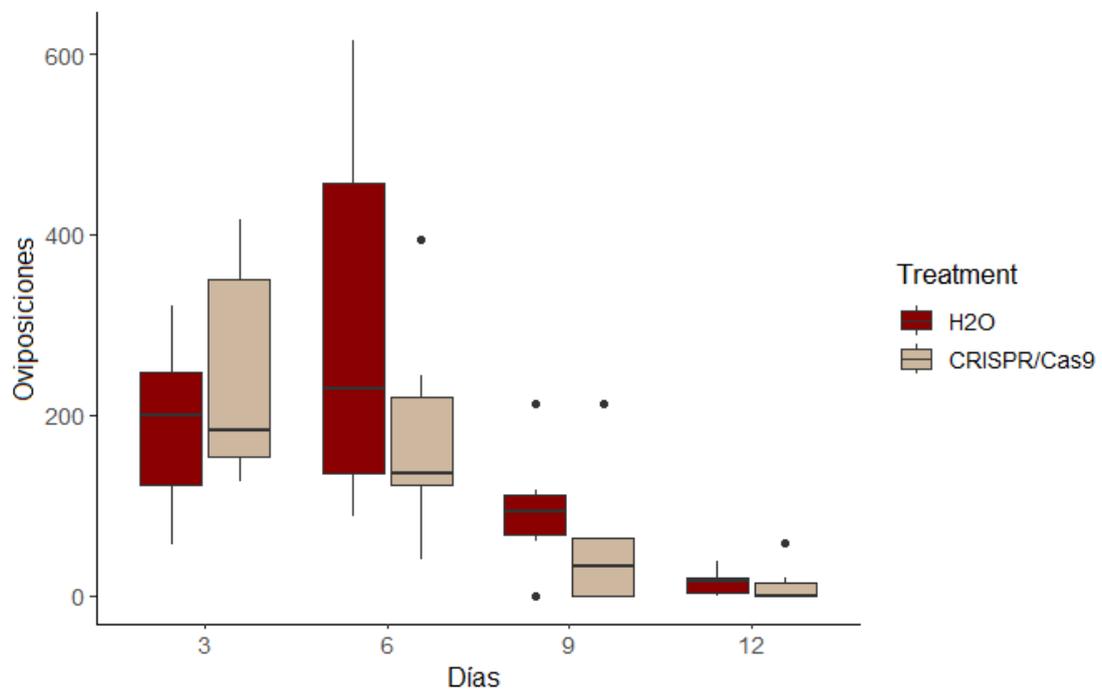


Figura 19. Producción de huevos por hembra según el número de días post-inyección del complejo Cas9-ARNg y agua Milli-Q® en hembras adultas *H. armigera*.

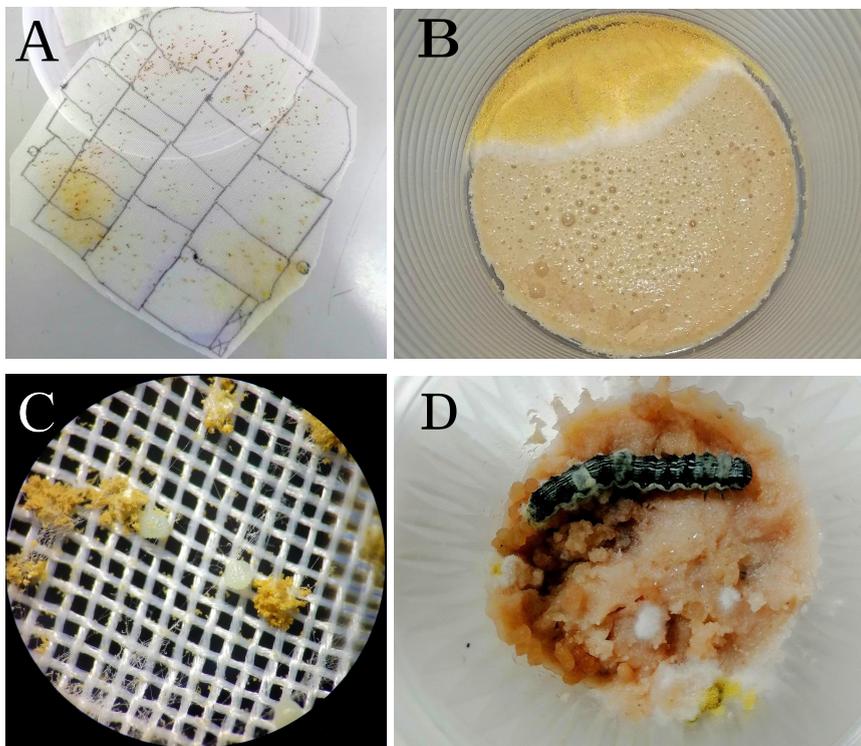


Figura 20. Contaminación por hongos del tejido para oviposición y dieta artificial de

jaulas tipo 2 y 3. **(A)** Tejido con oviposiciones, **(B)** dieta artificial de jaula tipo 2, **(C)** huevos G0 al tercer día post-oviposición, **(D)** larva G0 en su quinto instar, jaula tipo 3.

La viabilidad de los huevos de las hembras inyectadas con agua y el complejo Cas9-ARNg fue baja, pero no supuso diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El número de huevos de los cuales fue posible la emergencia de larvas en el transcurso del experimento se vio afectado debido a la contaminación de las dietas artificiales de las jaulas tipo 2 y tipo 3 por un hongo filamentoso cuyas colonias presentaban un aspecto algodonoso de color amarillo (Figura 20). Este microorganismo interfirió con el normal desarrollo de los huevos o alimentación de las larvas en su primer instar, momentos en el desarrollo de *H. armigera* cuya vulnerabilidad es significativamente mayor en comparación a sus últimos instares larvales, pupas o adultos. Lo anterior, debido a su exoesqueleto o tracto digestivo más desarrollados que pueden servir como barreras que pueden desencadenar varios mecanismos celulares y hormonales, dando como resultado una respuesta inmune (de Souza et al., 2020). De igual forma, se observó la formación de pupas tempranas, lo cual se explica como una respuesta inmunológica del insecto por acción de las enzimas, acelerando el proceso de ecdisis al reducir la producción de la hormona de la juventud y manteniendo la producción de ecdisona (Qu & Wang, 2018).

Por otro lado, en relación al número total de larvas que lograron empupar, la supervivencia fue del 75% para G0 descendiente de las hembras inyectadas con agua y 71% para la progenie G0 de las hembras inyectadas con el complejo Cas9-ARNg (Figura 21). El resto de larvas presentaron una disminución de peso y malformaciones morfológicas que provocaron la muerte del insecto antes o después del proceso de ecdisis (Figura 22). Al respecto, de Souza et al. (2020) asegura que estas anomalías se deben a una respuesta adversa del sistema de defensa del insecto, el cual, está compuesto por barreras estructurales y respuestas activas contra elementos externos que llegan al hemocel, como ocurriría en presencia de un hongo entomopatógeno.

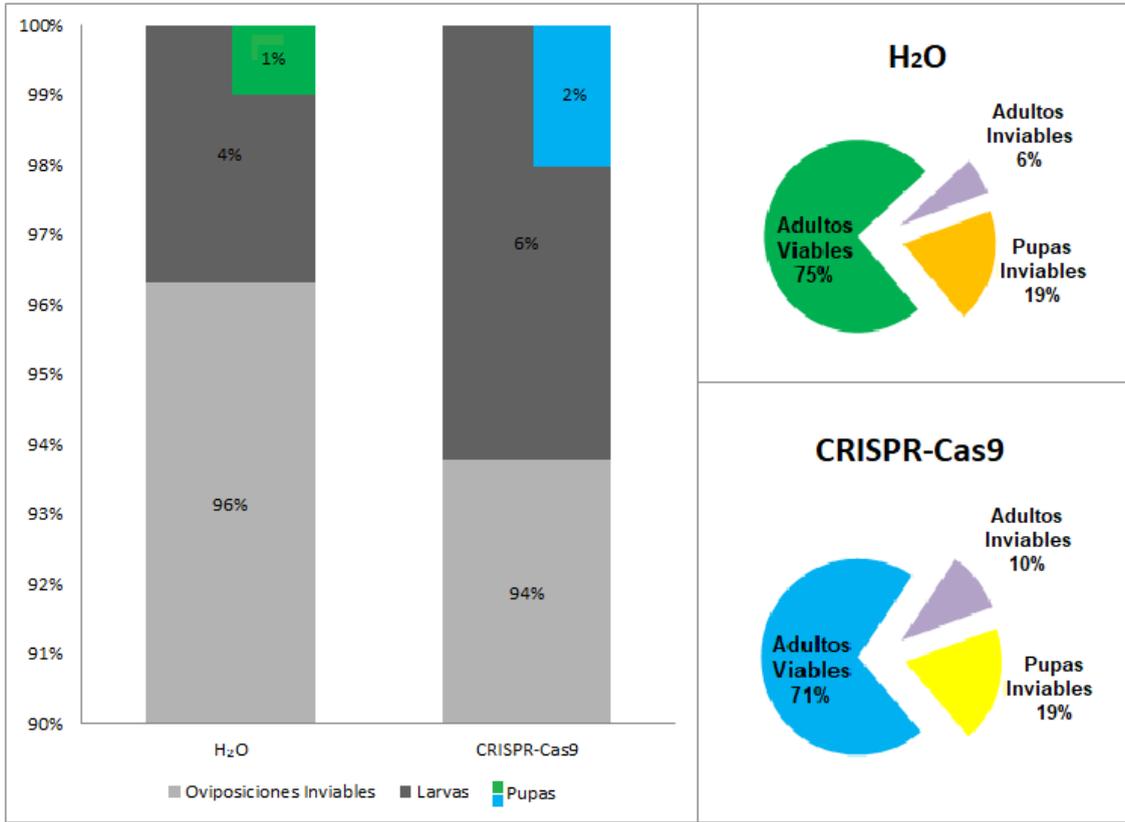


Figura 21. Porcentaje de viabilidad de los huevos G0 descendientes de hembras inyectadas con agua Milli-Q® y el complejo Cas9-ARNg, junto a la supervivencia pupal en relación al número de larvas que lograron o no realizar ecdisis.



Figura 22. Malformaciones en adultos y pupas de *H. armigera*.

Conclusiones y Recomendaciones

Bajo las condiciones del laboratorio y las concentraciones del complejo RNP Cas9-ARNg evaluadas, no fue posible confirmar mutantes *St*^{-/-} o quimeras *St*^{+/-} de *H. armigera* a través de la técnica de edición de genes DIPA-CRISPR. A pesar de ello, deberían ser evaluadas mayores concentraciones del complejo Cas9-ARNg para poder usarla en lepidópteros. La inyección del complejo Cas9-ARNg no afectó el número de oviposiciones de las hembras a lo largo de su ciclo de vida. En el caso de *H. armigera*, se recomienda inyectar hembras adultas tras su segundo día post-eclosión pupal, para que próximas evaluaciones puedan concentrar sus recursos en determinar la concentración de Cas9 y ARNg ideal para DIPA-CRISPR.

Por otro lado, el complejo Cas9-ARNg demostró ser adecuado para inducir mutaciones en el gen *St*. La técnica convencional logró una eficiencia de edición de genes del 82% de las 350 larvas que lograron eclosionar. Estos son los primeros registros de mutantes de *H. armigera* en Latinoamérica que impulsarán los estudios genéticos en este tipo de lepidópteros.

Referencias Bibliográficas

- Barrera, G., Mejía Maldonado, C., Gomez, J., & Espinel Correal, C. (2020, Octubre). Identificación y caracterización de un aislamiento colombiano de alphabaculovirus de *Helicoverpa armigera* HearNPV. *47 Congreso SOCOLEN Virtual*.
https://www.researchgate.net/publication/349158407_Identificacion_y_caracterizacion_de_un_aislamiento_colombiano_de_alphabaculovirus_de_Helicoverpa_armigera_HearNPV
- de Souza, T. D., Fernandes, F. O., Sanches, A. C., & Polanczyk, R. A. (2022, Noviembre 23). Sublethal effects of different fungal isolates on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *30*(141). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00327-9>
- Gong, C., Yao, X., Yang, Q., Wang, X., Zhang, Y., Wang, Y., & Shen, L. (2021, Mayo 01). Fitness Costs of Chlorantraniliprole Resistance Related to the SeNPV Overexpression in the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095027>
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976, Agosto). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, *69*(4), 447-448.
- Husain, M., Rasool, K. G., Tufail, M., Alwaneen, W. S., & Aldawood, A. S. (2021, Febrero 11). RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene curtails oogenesis in the almond moth *Cadra cautella*. *Journal Plos One*, *16*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245928>
- Khan, S. A., Reichelt, M., & Heckel, D. G. (2017, Enero 05). Functional analysis of the ABCs of eye color in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9-induced mutations. *Scientific Reports*, *7*(40025). <https://doi.org/10.1038/srep40025>
- Kistler, K. E., Vosshall, L. B., & Matthews, B. J. (2015, Marzo 9). A practical guide to genome-engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Reports*, *11*(1). <https://mosquitolab.zoology.ubc.ca/assets/pdf/CRISPR.pdf>
- Kumar, S. S., & Puttaraju, H. P. (2012, Diciembre). Improvised microinjection technique for mosquito vectors. *The Indian journal of medical research*, *136*(6), 971–978.
- Leyria, J., Orchard, I., & Lange, A. B. (2022, Noviembre 10). Impact of JH Signaling on Reproductive Physiology of the Classical Insect Model, *Rhodnius prolixus*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213832>
- Panfilio, K. A., & Chuva, S. M. (2022, Diciembre 05). The extended analogy of extraembryonic development in insects and amniotes. *The Royal Society*, *377*(1865). <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0268>

- Qu, S., & Wang, S. (2018, Junio). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010>
- Queiroz-Santos, L., Casagrande, M. M., & Specht, A. (2018, Febrero 15). Morphological Characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). *Neotropical Entomology*, 47, 517–542. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0581-4>
- Shirai, Y., Piulachs, M.-D., Belles, X., & Daimon, T. (2022, Mayo 23). DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing. *Cell Reports Methods*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100215>
- Szwarc, D. E. (2014, Octubre 01). *Helicoverpa armigera*, una plaga que amenaza nuestros cultivos agrícolas. *Voces y Ecos*, (32), 22-25. <https://inta.gob.ar/documentos/helicoverpa-armigera-una-plaga-que-amenaza-nuestros-cultivos-agricolas>
- Telfer, W. H. (2009, Enero 01). Egg formation in Lepidoptera. *Journal of Insect Science*, 9(1). <https://doi.org/10.1673/031.009.5001>
- Velasquez-Vasconez, P. A. (2022, Febrero 16). Adaptação de *Helicoverpa armigera* aos inibidores de peptidase de soja envolve uma alteração no padrão de expressão das serino peptidases e sugere um controle epigenético. *Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba*. 10.11606/T.11.2021.tde-14022022-143313
- Vieira, M. C. d. S., Vieira, E. C. d. S., Gomes, E. S., Silva, I. F. d., Silva, P. G., Ávila, C. J., & Oliveira, H. N. d. (2018, Diciembre). *Criação de Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae) em condições de laboratório utilizando dietas artificial e natural* (1st ed.) [Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 46]. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1101945>
- Xu, G., Zhang, J., Lyu, H., Song, Q., Feng, Q., Xiang, H., & Zheng, S. (2018, Junio 14). DNA methylation mediates BmDeaf1-regulated tissue- and stage-specific expression of BmCHSA-2b in the silkworm, *Bombyx mori*. *Epigenetics & Chromatin*, 11(32). <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0202-4>
- Zha, Y. P., Chen, J. Y., Jin, Z. B., & Wang, C. B. (2013, Noviembre 06). Effects of Ultrasound on the Fecundity and Development of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 29(1). <http://dx.doi.org/10.3954/13-05.1>
- Zhang, W., Ma, L., Xiao, H., Xie, B., Smagghe, G., Guo, Y., & Liang, G. (2016, Mayo 18). Molecular Characterization and Function Analysis of the Vitellogenin Receptor from the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae) (K. Y. Zhu, Ed.). *Journal Plos One*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155785>