

MODIFICACIÓN GENÉTICA DEL GRANULOVIRUS DE *Trichoplusia ni* CON CRISPR/Cas9

[GENETIC MODIFICATION OF THE GRANULOVIRUS OF *Trichoplusia ni* WITH CRISPR/Cas9]

Oscar Jesús Ortiz-Arrazola^{1§}, María Cristina del Rincón-Castro², José Eleazar Barboza-Corona², Jorge E. Ibarra-Rendón³

¹Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. Departamento de Innovación Agrícola Sustentable. Abasolo, México. ²Universidad de Guanajuato. Departamento de Alimentos. Irapuato, México. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV. Unidad Irapuato.

§Autor para correspondencia: (oscar.oa@abasolo.tecmn.mx).

RESUMEN

La mayoría de las proteínas heterólogas expresadas en sistema de baculovirus son obtenidas por recombinación homóloga de co-transfección en líneas celulares de insectos, sin embargo, estas son limitadas. El sistema CRISPR/Cas9 ha demostrado alta eficiencia en la edición de secuencias específicas sin la utilización de líneas celulares de insectos. En la presente investigación se ha editado el genoma de *Trichoplusia ni Granulovirus* (TnGV) con el sistema CRISPR/Cas9 y biobalística PIG en larvas de *T. ni*. Para ello se diseñaron 1. Un vector de reparación homóloga (pTnGV101) con las regiones *orf5* y *orf7*, y 2. Los gRNA que flanquean la *p10* del TnGV. Con la transformación con biobalística PIG se obtuvo un 40% de larvas de *T. ni* infectadas y 38% de esta población expresó la EGFP. Estos resultados demuestran que el sistema CRISPR/Cas9 y la biobalística PIG en conjunto, pueden ser utilizados con éxito para la modificación genética de baculovirus *in vivo*.

Palabras clave: Baculovirus, edición, genoma.

ABSTRACT

Most heterologous proteins expressed in baculovirus system are obtained by homologous recombination of co-transfection into insect cell lines, however, these are limited. The CRISPR/Cas9 system has shown high efficiency in editing specific sequences without the use of insect cell lines. In the present investigation, the genome of *Trichoplusia ni Granulovirus* (TnGV) has been edited with the CRISPR / Cas9 system and PIG biobalistics in *T. ni* larvae. For this, 1. A homologous repair vector (pTnGV101) with the *orf5* and *orf7* regions, and 2. The gRNAs that flank the *p10* of TnGV were designed. With the transformation with PIG biobalistics, 40% of *T. ni* infected larvae were obtained and 38% of this population expressed EGFP. These results demonstrate that the CRISPR / Cas9 system and PIG biobalistics together can be used successfully for the genetic modification of baculovirus *in vivo*.

Index words: Baculovirus, editing, genome.

INTRODUCCIÓN

Los baculovirus constituyen un importante grupo de entomopatógenos que son utilizados para el control biológico de insectos plaga (Szewczyk *et al.*, 2006). Los baculovirus también han sido reconocidos como sistemas de expresión de proteínas heterólogas (Airenne *et al.*, 2013; Kost *et al.*, 2005). Se han desarrollado cepas recombinantes, insertando genes dentro del genoma de algunos baculovirus con el objetivo de aumentar su virulencia y disminuir sus tiempos de mortalidad. Algunos ejemplos de lo anterior son las inserciones de neurotoxinas de escorpión (Carbonell *et al.*, 1988; Stewart *et al.*, 1991), y de los genes *cry*

de *Bacillus thuringiensis* (Martens *et al.*, 1990; Merryweather *et al.*, 1990).

Los baculovirus recombinantes se han desarrollado en el grupo de los *Alfabaculovirus* sobre todo en *Autographa californica* múltiple nucleopoliedrovirus (AcMNPV) y en *Bombix mori* nucleopoliedrovirus (BmSNPV) (Kost *et al.*, 2005; Motohashi *et al.*, 2005; Martínez-Solís y Herrero, 2019). Por lo general, los baculovirus modificados han sido obtenidos por recombinación homóloga de co-transfección en líneas celulares usando el DNA viral y un vector de transferencia; o el sistema de Bácsidos para el intercambio genético. (Luckow *et al.*, 1993; Hajós *et al.*, 1998).

Por su parte, el sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado con éxito para la delección e inserción de genes tanto en líneas celulares como en organismos (Esvelt y Church, 2013; Lin *et al.*, 2016). Este método se basa en la combinación de una endonucleasa de DNA y una única molécula de RNA guía (sgRNA) que dirige la nucleasa a una diana complementaria en el DNA donde induce roturas bicatenarias que se reparan mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR) que utiliza como guía una plantilla de DNA homóloga (Ran *et al.*, 2013).

En conjunto con las técnicas de modificación genética anteriormente descritas, el sistema de liberación de partículas balísticas o pistola de genes (Klein *et al.*, 1988); emplea micropartículas de tungsteno u oro que son recubiertas de DNA. Existe dos estrategias de bombardeo de partículas: el llamado sistema Bio Rad PDS 1000 / He (sistema seco) y la pistola de flujo de partículas (PIG) (sistema húmedo) (Finer *et al.*, 1992). El PIG utiliza una capa de partículas recubiertas de DNA sobre una membrana, que se somete a un repentino disparo de helio. Dicha membrana impacta sobre una rejilla metálica y las partículas, a gran velocidad, penetran en los tejidos del organismo blanco (Thomas *et al.*, 2001; Gunadi *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue editar el genoma de TnGV con el sistema CRISPR/Cas9 bajo la técnica de bombardeo, PIG. Se desarrolló un vector de reparación que, al ser evaluado, muestra el potencial que tienen el sistema CRISPR/Cas9 para generar virus recombinantes que no cuentan con líneas celulares de insectos para su modificación genética como los granulovirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se utilizaron larvas de *Trichoplusia ni* alimentadas con dieta semi artificial modificada (Guy *et al.*, 1985) y mantenidas en condiciones de insectario 28 °C ± 2 °C, 60-70% HR, fotoperiodos 14:10 luz/oscuridad.

Cepas y vectores

La cepa de baculovirus usada en este trabajo fue *Trichoplusia ni Granulovirus* (TnGV). El vector de transferencia pAcUW31 (CLONTECH Laboratories Inc. Palo Alto, CA) fue usado como templado para el plásmido de reparación. El plásmido pU6-BbSI (Donado por Izuho Hatada, Addgene plasmid # 128433) fue utilizado para la clonación de los gRNA. El vector pHSP70-Cas9 (donado por L. B. Vosshall, Addgene #45945) (Gratz *et al.*, 2013) que contiene la proteína Cas9 bajo el promotor de inducción de temperatura HSP70 de *D. melanogaster* fue utilizado como endonucleasa. Todos los plásmidos fueron amplificados en la cepa *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Construcción del vector de reparación

Para la construcción del vector de reparación se utilizó como molde pAcUW31, se sustituyeron las regiones homólogas ORF1ef2/orf603 y orf1629 por las regiones orf5 y orf7 del baculovirus TnGV silvestre. Estas regiones fueron amplificadas con los oligonucleótidos D- ORF5 5'

CCGctcgagCAAGGTAGCCTCGTCTATTTGAC 3' y R-ORF5 5' ATAAGAATgatatcATGGATTGGTTTGAAATCATTTTCG 3' para un fragmento de 855 pb; y con D-ORF7 5'ATAAGAATgatatcAAACGCTCAGGATCAAACG 3' y R-ORF7 5'CCGctcgagTTCTTCATCTTCAATATTATGTC3' para un fragmento de 803 pb. Una vez construido el plásmido de reparación al que se denominó pTnGV101, se insertó el gen reportero *egfp* bajo el promotor *p10*.

Diseño y clonación de los RNA guía

Los sgRNA fueron diseñados en la plataforma CHOP-CHOP (Labun *et al.*, 2019) y sintetizados por la casa comercial T4 OLIGO. El diseño de los sgRNA se basó en el gen *p10* de TnGV. Para el ensamble de los sgRNA se utilizó 1 µl de cada uno incubando a 95 °C por 5 min y posteriormente clonados en el vector pU6-BbSI. El vector modificado resultante se denominó pU6-BbSI-gRNA. Para corroborar la clonación de los sgRNA en el vector pU6-BbSI se amplificó el sitio de clonación entre T7 y T3 (700 - 850pb) del vector pU6-BbSI-gRNA, con los iniciadores T7 5' TAATACGACTCACTATAGGG y T3 5' GCAATTAACCCTCACTAAAGG. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en Macrogen Inc.

Extracción de DNA viral

Los viriones purificados de TnGV fueron resuspendidos en 400 µl buffer de proteinasa K (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.005 M, SDS 0.5%) y se incubaron a 60 °C por 15 min. Posteriormente se agregó 100 µl de proteinasa K (200 µg/ml) y se incubó a 37 °C por 2 h. La extracción de DNA se realizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25: 24:1) seguido de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se fraccionó centrifugando a 10,000 g por 5 min. Las muestras fueron dializadas toda la noche usando buffer Tris/EDTA. Finalmente, el DNA fue almacenado a -20 °C hasta su uso en la co-transfección por PIG.

Preparación de las partículas de oro para bombardeo con PIG

Se utilizaron partículas de oro de ~ 1 µm (BioRad, Hercules, EE. UU.). Las partículas se prepararon a una concentración de 60 mg ml⁻¹ como lo describieron Cabrera-Ponce *et al.* (1997). Las presiones de disparo empleadas fueron de 160 y 175 psi. Por cada presión de disparo se utilizaron tres tratamientos con diferentes concentraciones de DNA de los vectores pTnGV101, pU6-BbSI-RNA, pHSP70/Cas9 y de la cepa silvestre TnGV (6 tratamientos en total), resuspendidos en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 7,9) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferentes concentraciones de DNA utilizadas en el bombardeo PIG.

No. Tratamiento/ Presión de disparo	No. de larvas utilizadas	Concentración de DNA TnGV	Concentración de DNA pTnGV101 vector de reparación	Concentración de DNA pU6-BbSI-RNA	Concentración de DNA de pHSP70/Cas9
Control	20	0	0	0	0
1, 175psi	20	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
2, 175 psi	20	2 µg	3 µg	3 µg	3 µg
3, 175 psi	20	2 µg	5 µg	5 µg	5 µg
4, 160psi	20	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
5, 160 psi	20	2 µg	3 µg	3 µg	3 µg
6, 160 psi	20	2 µg	5 µg	5 µg	5 µg

A cada tratamiento se le agregó 50 µl de la suspensión de partículas, 50 µl de CaCl₂ (2,5 M) y 20 µl de espermidina (0,1 M; base libre). Las suspensiones se sonicaron brevemente, se centrifugaron durante 10 min a 12.000 g y el sedimento se lavó con 400 µl de etanol absoluto. Las partículas se centrifugaron con las condiciones ya mencionadas y se resuspendieron en 60 µl de etanol absoluto. 10 µl de esta suspensión de partículas recubiertas con los cuatro diferentes DNA se utilizaron en cada evento de bombardeo.

Condiciones de bombardeo PIG

Se utilizaron larvas de tercer instar de *T. ni*. Los insectos se colocaron en placas de Petri de 35 mm a 40 cm de la unidad de filtrado. Posteriormente fueron sometidas a disparos de He con una presión de disparo de 160 y 175 psi, en condiciones de cámara de vacío de 15,75 in Hg, respectivamente. Los individuos que sobrevivieron al bombardeo se colocaron en dieta artificial. La expresión de Cas9 (vector pHS70/Cas9) fue inducida después del bombardeo con un choque térmico de 37 °C durante una hora (Gratz *et al.*, 2013). Después de siete días, las larvas bombardeadas fueron analizadas como se describe en los siguientes apartados.

Análisis de TnGV recombinante por PCR

La extracción del DNA de TnGv recombinante se realizó como lo descrito anteriormente. Para detectar el gen reportero *egfp* se utilizaron los iniciadores de las regiones homólogas D- ORF5 5' CCGctcgagCAAGGTAGCCTCGTCTATTTGAC 3' y R-ORF7 5'CCGctcgagTTCTTCATCTTC AATATTATGTC3' utilizando el Kit de sistema de reactivos para PCR (Invitrogen, Life Technologies Inc.). La mezcla de reacción se preparó con 100 ng de DNA de TnGV recombinante, 200 M de dNTP's, MgCl₂ 3 mM, 100 ng de cada cebador, Taq DNA polimerasa (Invitrogen) de 2,5 U y tampón de reacción hasta un volumen total de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 1 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 42 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, finalizando la amplificación a 72 °C durante 7 min. El fragmento amplificado de 743 pb se visualizó mediante electroforesis en agarosa al 1%.

Dot Blot de EGFP del TnGV recombinante

Los individuos de *T. ni* tratados por bombardeo fueron colectados y analizados. Cada larva se suspendió en 10 µL de PBS, se congelaron en N₂ líquido y se homogeneizaron. La suspensión se mantuvo en hielo. Posteriormente se transfirieron a una membrana Nylon Biodyne TM (Gaithersburg, EE. UU.). Se utilizó extracto bacteriano de EGFP sobre expresada como control positivo y larvas de *T. ni* sin infectar como control negativo. La membrana con los homogeneizados y controles se sometió a vacío durante 1 h para asegurar la unión de proteínas a la membrana. La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5%, preparada en tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM y EDTA 5 mM, pH 7) en agitación lenta durante 1 h. Después se incubó con un anticuerpo policlonal anti-GFP (1: 2500) durante la noche a 4 °C. La membrana se lavó cinco veces en tampón PBS suplementado con 0.1% Tween 20. Nuevamente se incubó la membrana durante la noche con el anticuerpo secundario, Anti- IgG (de conejo conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, EE. UU.) (1: 2500). Se lavó cinco veces en Tampón PBS. Se detectó actividad de HRP con el Immobilion™ Western Kit (Millipore, Damstadt, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los sistemas de expresión de baculovirus han tenido un profundo impacto en la producción de proteínas recombinantes en líneas celulares de insectos (Hajós *et al.*, 1998; Kost y Condreay, 1999; Luckow *et al.*, 1993). Sin embargo, no siempre se tienen disponibles líneas celulares que sean permisibles a infecciones por baculovirus, lo que limita la obtención de cepas recombinantes. En este trabajo se ha demostrado el

potencial de utilizar el sistema CRISPR/Cas9 para la edición del genoma de los baculovirus.

Como resultado de lo anterior, el vector de reparación resultante de la sustitución de las regiones ORF $lef2/orf603$ y $orf1629$ de pAcUW31 por las regiones $orf5$ y $orf7$ de TnGV fue denominado como pTnGV101. La inserción adecuada de $orf5$ y $orf7$ fue corroborada con la extracción de DNA, obteniéndose una banda correspondiente de 8000 pb (Figura 1), y por secuenciación del plásmido recombinante (datos no mostrados).

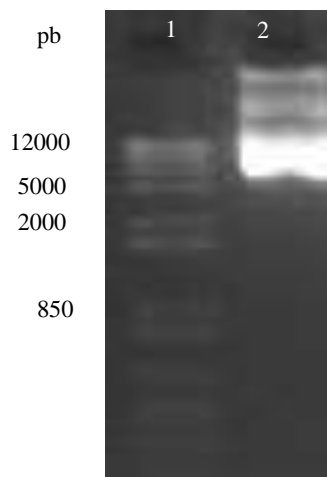


Figura 1. DNA del vector de reparación pTnGV101. Línea 1: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); línea 2: banda de 8000 pb.

Diseño y clonación de los RNA guía en pU6-BbSI

El sistema CRISPR/Cas9 recientemente se ha utilizado para la modificación genética en algunos virus de genomas grandes (Ebina *et al.*, 2013; King y Munger, 2019). Una parte fundamental en el sistema CRISPR/Cas9 es el diseño de los sgrRNA (Suenaga *et al.*, 2014). Debido a ello se han desarrollado diferentes plataformas que permiten diseñar *in silico* los sgrRNA. En esta investigación, se ha utilizado la plataforma CHOP-CHOP.

Los gRNA (23pb) fueron diseñados y sintetizados a partir del gen $p10$ de TnGV; las secuencias diseñadas se enlistan en el cuadro 2. Ambos gRNA se clonaron con éxito en el sitio BbSI del plásmido pU6-BbSI, que expresa la proteína Cas9. La inserción adecuada de los gRNA en el sitio de clonación de pU6-BbSI fue corroborada por PCR, obteniéndose un amplicón de 700-850 pb (Figura 2), y por secuenciación del plásmido modificado pU6-BbSI-RNA (datos no mostrados).

Cuadro 2. sgrRNA diseñados en la plataforma CHOP-CHOP.

Ranking	Secuencia cRNA (5' - 3')	Localización genómico ^a	Cadena	Contenido de GC (%)	Off targets
1	AGCGGCCAACCTGCCCGACGTGG	175	-	74	0
2 *	GCTCGACGCGCAAGCCGCAGCGG	214	-	78	0

^aLocalización: desde la secuencia adyacente al motivo del protoespaciador (PAM) hasta el ATG inicial del gen $p10$; + secuencia de ADN codificante.

* Secuencia de cARN utilizada en este estudio.

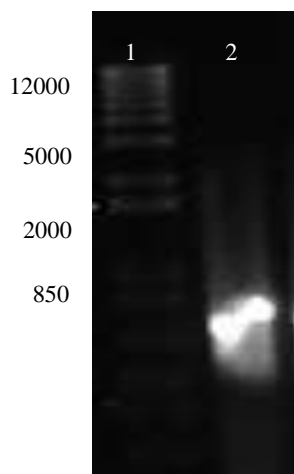


Figura 2. Amplificación del sitio de clonación pU6-BbSI-RNA con los gRNA. Línea 1: marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); carril 2: amplicón de 850 pb.

Al probar el gRNA *in vivo* se mantuvo la eficiencia predicha por el programa. Además del sgRNA, existen otras estrategias como el sgRNA dual o multiplex que en estudios previos se han demostrado que aumentan la eficiencia en la edición de genomas (Chen *et al.*, 2014).

Co-transfección por PIG en larvas de *T. ni*

Para la modificación del genoma de TnGV se utilizó además la técnica de biobalística. Esta fue diseñada para la transformación de plantas, aunque puede adaptarse para diferentes tipos de organismos entre ellos los insectos (Sanford *et al.*, 1995). En este trabajo se utilizó el método PIG con el que se obtuvo una eficiencia en transformación del 40 y 35%, para dos distintas condiciones de presión en la modificación del genoma del baculovirus TnGV.

Se logró la infección de larvas de *T. ni* por bombardeo con el sistema PIG usándose partículas de oro (60 mg ml^{-1}). Con el tratamiento 3 (Tabla 2), 175 psi de presión de disparo, 2 μg de DNA de TnGV y 5 μg del DNA de pTnGV101, pU6-BbSI-RNA y pHS70/Cas9, respectivamente; se infectó el 40% de las larvas de *T. ni* bombardeadas (Cuadro 3). Al tratamiento 3, le siguieron los tratamientos 1 y 2 (175 psi de presión de disparo), 4, 6 y 5 (160 psi de presión de disparo); con porcentajes de infección de 38, 30, 10, 10 y 5%; respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de larvas infectadas en los diferentes tratamientos de PIG.

No. Tratamiento/ Presión de disparo	Larvas utilizadas (No)	Larvas muertas	Larvas infectadas	Infección (%)
Control	20	0	0	0
1. 175psi	20	2	7	38
2. 175 psi	20	3	6	30
3. 175 psi	20	2	8	40
4. 160psi	20	1	2	10
5. 160 psi	20	2	1	5
6. 160 psi	20	2	2	10

Siete días posteriores al bombardeo de las larvas de *T. ni*, los individuos sobrevivientes mostraron la infección característica causada por TnGV, mientras que las larvas control se mantuvieron vivas (Figura 3A y B).

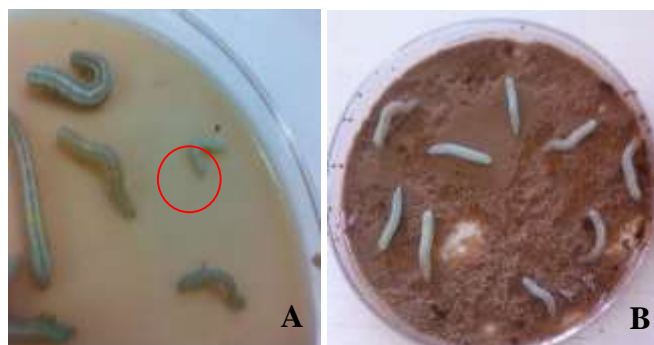


Figura 3. Co-transfección de larvas *T. ni* con TnGV recombinante. A. Larva de *T. ni* infectada con TnGV recombinante (círculo rojo). B. Larvas de *T. ni* sin infectar (control negativo).

Datos similares a los obtenidos en esta investigación han sido reportados previamente por Obregón-Barboza *et al.* (2007). Sus experimentos constaron en probar diferentes condiciones de presión de disparo y tipo de microproyectiles (oro y tungsteno) pero, a diferencia de esta investigación, utilizaron el sistema PDS-1000/He teniendo datos favorables para su aplicación en baculovirus.

Detección de la proteína EGFP

Las larvas de *T. ni* infectadas por PIG fueron procesadas para la detección de la proteína EGFP mediante Dot Blot, estimando su expresión en el 38% de los individuos infectados con los primeros tres tratamientos (175 psi); y de 10% de los individuos infectados en los tratamientos 4, 5 y 6 (160 psi). Para corroborar estos resultados, se extrajo DNA de cada larva infectada con expresión positiva de EGFP. Posteriormente se seleccionó una muestra por cada condición de presión (dos muestras) y se realizó la amplificación de la región *orf5* y *orf7*, con los oligonucleótidos reportados previamente. Los productos esperados de 700 a 800 pb (Figura 4). Los amplicones obtenidos se secuenciaron para corroborar la modificación genética en TnGV (datos no mostrados).

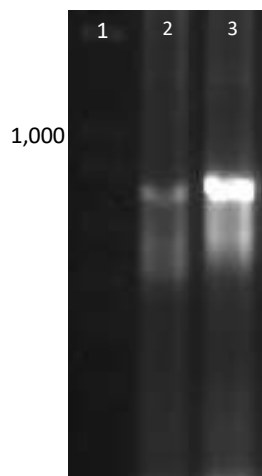


Figura 4. Amplificación de *egfp* integrado al genoma del TnGV. Línea 1: marcador 1Kb Plus Ladder

(Invitrogen); línea 2: amplicón de *egfp*, 160 psi; línea 3: amplicón de *egfp*, 175 psi.

La expresión de la proteína EGFP fue muy útil para detectar larvas de *T. ni* co-transfectadas. Utilizando la técnica de PCR y Dot Blot, se analizaron individualmente los organismos infectados y se comprobó la inserción de este gen reportero en el genoma del virus TnGV. En otras investigaciones se ha utilizado GFP como gen reportero para la fácil detección de la transformación genética de diferentes tipos de organismos entre ellos los insectos pues otra de sus ventajas es que se puede clonar en vectores de transferencia (Horn *et al.*, 2002).

La utilización de dos sistemas de edición de genoma como el CRISPR/Cas9 y el bombardeo de microproyectiles (PIG) abre una amplia diversidad de alternativas a los virus recombinantes no solo para mejorar su virulencia como agentes de control biológico de plagas, sino también como vectores de expresión de proteínas heterólogas. Por supuesto, esto requerirá el desarrollo de protocolos estándar que deberán incluir el diseño de vectores de reparación homóloga específicos, la optimización de las condiciones de bombardeo y el diseño de más gRNA. Teóricamente, esta técnica tiene el potencial de generar virus recombinantes de cualquier baculovirus.

CONCLUSIONES

La técnica CRISPR/Cas9 también sirve para editar el genoma de un baculovirus que no cuenta con línea celular. En este trabajo se logró la expresión de un gen reportero, lo cual sienta las bases para la introducción de otro tipo de genes con propiedades especiales dentro del genoma de los baculovirus que puedan ayudar a incrementar su potencial bioinsecticida.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca No. 419428 otorgada a Oscar Jesús Ortiz Arrazola.

LITERATURA CITADA

- Airenne, K.J., Y.C. Hu, T.A. Kost, R.H. Smith, R.M. Kotin, C. Ono, Y. Matsuura, S. Wang and S. Ylä-Herttua. 2013. Baculovirus: An insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Molecular Therapy* 21, 739–749. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.286>.
- Cabrera-Ponce, J.L., L. López, N. Assad-Gareia, C. Medina-Arévalo, A.M. Bailey and L. Herrera-Estrella. 1997. PlantCell Reports of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant cell reports* 16, 255–260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01088276>.
- Carbonell, L.F., M.R. Hodge, M.D. Tomalski and L.K. Miller. 1988. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene*, 73(2), 409-418.
- Esvelt, K.M. and G.M. Church. 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods* 10, 957–963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>.
- Finer, J.J., P. Vain, M.W. Jones and M.D. McMullen. 1992. Development of the particle inflow gun. *Plant Cell Reports* 11, 323–328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00233358>.
- Gratz, S.J., A.M. Cummings, J.N. Nguyen, D.C. Hamm, L.K. Donohue, M.M. Harrison, J. Wildonger and K.M.O. Connor-Giles. 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR. *Genetics* 194, 1029–1035. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152710>.
- Gunadi, A., E.A. Dean and J.J. Finer. 2019. Transient transformation using particle bombardment for gene expression analysis, in: Al., S.K. *et* (Ed.), *Transgenic Plants*. Humana Pres, New York, NY. pp. 67–79. https://doi.org/DOI: 10.1007/978-1-4939-8778-8_5.
- Guy, R.H., N.C. Lepla, J.R. Lye, C.W. Green, S.L. Barrette and K.H. Hollien. 1985. *Trichoplusia ni*, in: Singh, P., and R.F. Moore, (Ed.), *Handbook of Insect Rearing*. Elsevier, Amsterdam. pp. 487–494.

- Hajós, J.P., D. Zuidema, P. Kulcsár, J.G.M. Heldens and P. Závodszky. 1998. Recombination of baculovirus DNA following lipofection of insect larvae Brief Report. *Archives of Virology* 143, 2045–2050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s007050050441>.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, M. Sletten and J.C. Sanford. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells with. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 4305–4309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4305>.
- Kost, T.A., J.P. Condreay and D.L. Jarvis. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23, 567–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>.
- Labun, K., T.G. Montague, M. Krause, Y.N. Torres-Cleuren, H. Tjeldnes and E. Valen. 2019. CHOP-CHOP [WWW Document]. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. URL <https://chopchop.cbu.uib.no/> (accessed 7.30.21).
- Lin, C., H. Li, M. Hao, D. Xiong, Y. Luo, C. Huang and N. Xia. 2016. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells. *Nature Publishing Group* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34531>.
- Luckow, V.A., S.C. Lee, G.F. Barry and P. Olins. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome Propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* 67, 4566–4579. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4566-4579.1993>.
- Martens, J.W., G. Honée, D. Zuidema, J.W. Van Lent, B. Visser and J.M. Vlak. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2764–2770. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2764-2770.1990>.
- Martínez-Solís, M. and S. Herrero. 2019. Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 113–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-018-9474-7>.
- Merryweather, A.T., U. Weyer, M.P.G. Harris, M. Hirst, T. Booth and R.D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *Journal of General Virology* 71, 1535–1544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-7-1535>.
- Motohashi, T., T. Shimojima, T. Fukagawa, K. Maenaka and E.Y. Park. 2005. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochemical and biophysical research communications* 326, 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.060>.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281–2308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Stewart, L.M., M. Hirst, M. López-Ferber, A.T. Merryweather, P.J. Cayley and R.D. Possee. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 352, 85–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/352085a0>.
- Szewczyk, B., L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, I. Skrzecz and M. Lobo-De Souza. 2006. Baculoviruses-Re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24, 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.001>.
- Thomas, J., J. Bardou, L. Sebastien, B. Mauchamp, and G. Chavancy. 2001. A helium burst biolistic device adapted to penetrate fragile insect tissues . *Journal of Insect Science* 1, 1–10.