



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

TESIS

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *NEOCHLORIS OLEOABUNDANS*
UTILIZANDO *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y ELECTROPORACIÓN

PRESENTA

Felipe de Jesús García Flores

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR

Dr. Juan Jáuregui Rincón

COMITÉ TUTORAL

Dra. Diana Linda Cárdenas Chávez

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Aguascalientes, Ags, 20 de Mayo de 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **Felipe de Jesús García Flores** con ID **92246** quien realizó la tesis titulada: **Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y electroporación**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 19 de Mayo de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Jauregui Rincón', written over a horizontal dashed line.

Dr. Juan Jauregui Rincón

Tutor o asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **Felipe de Jesús García Flores** con ID **92246** quien realizó la tesis titulada: **Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y electroporación**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 18 de mayo de 2015.

Dra. Diana L. Cárdenas Chávez

Tutor o asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **Felipe de Jesús García Flores** con ID **92246** quien realizó la tesis titulada: **Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y electroporación**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 19 de Mayo de 2015.



Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Tutor o asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Ingeniería Bioquímica
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FELIPE DE JESÚS GARCÍA FLORES
ALUMNO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimado alumno García:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Neochloris oleoabundans* UTILIZANDO *Agrobacterium tumefaciens* Y *electroporación***", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., 19 de mayo de 2015

"SE LUMEN PROFERRE"

EL DECANO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.
JJRG.yscd

DICTAMEN DE REVISIÓN DE LA TESIS / TRABAJO PRÁCTICO

DATOS DEL ESTUDIANTE	
NOMBRE: Felipe de Jesús García Flores	ID (No. de Registro): 92246
PROGRAMA: MAESTRIA EN CIENCIAS	ÁREA: BIOTECNOLOGIA VEGETAL
TUTOR/TUORES: DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN DRA. DIANA LINDA CÁRDENAS CHÁVEZ DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA	
TESIS (X) TRABAJO PRÁCTICO ()	
OBJETIVO: Seleccionar un método de transformación genética estable y con alto rendimiento para la microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> .	
DICTAMEN	
CUMPLE CON CRÉDITOS ACADÉMICOS:	(X)
CONGRUENCIAS CON LAS LGAC DEL PROGRAMA:	(X)
CONGRUENCIA CON LOS CUERPOS ACADÉMICOS:	(X)
CUMPLE CON LAS NORMAS OPERATIVAS:	(X)
CONINCIDENCIA DEL OBJETIVO CON EL REGISTRO:	(X)

Aguascalientes, Ags. a 19 de Mayo de 2015

FIRMAS


CONSEJERO ACADÉMICO DEL ÁREA


SECRETARIO TÉCNICO DEL POSGRADO


SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

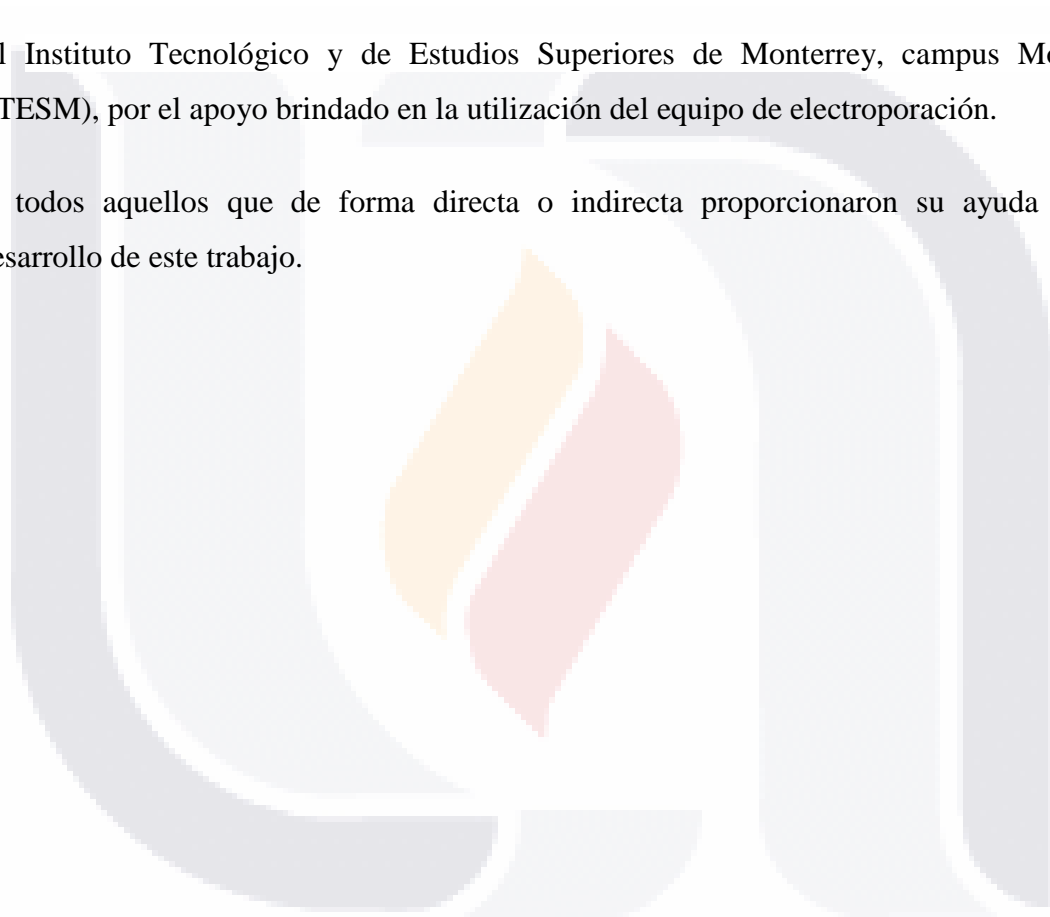
AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y asesores por la paciencia y apoyo recibidos durante el desarrollo del trabajo de tesis.

A los profesores, investigadores, técnicos de laboratorio y compañeros por sus grandes aportaciones a este trabajo y su paciencia en dedicarme tiempo para realizarlo.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Monterrey (ITESM), por el apoyo brindado en la utilización del equipo de electroporación.

A todos aquellos que de forma directa o indirecta proporcionaron su ayuda para el desarrollo de este trabajo.

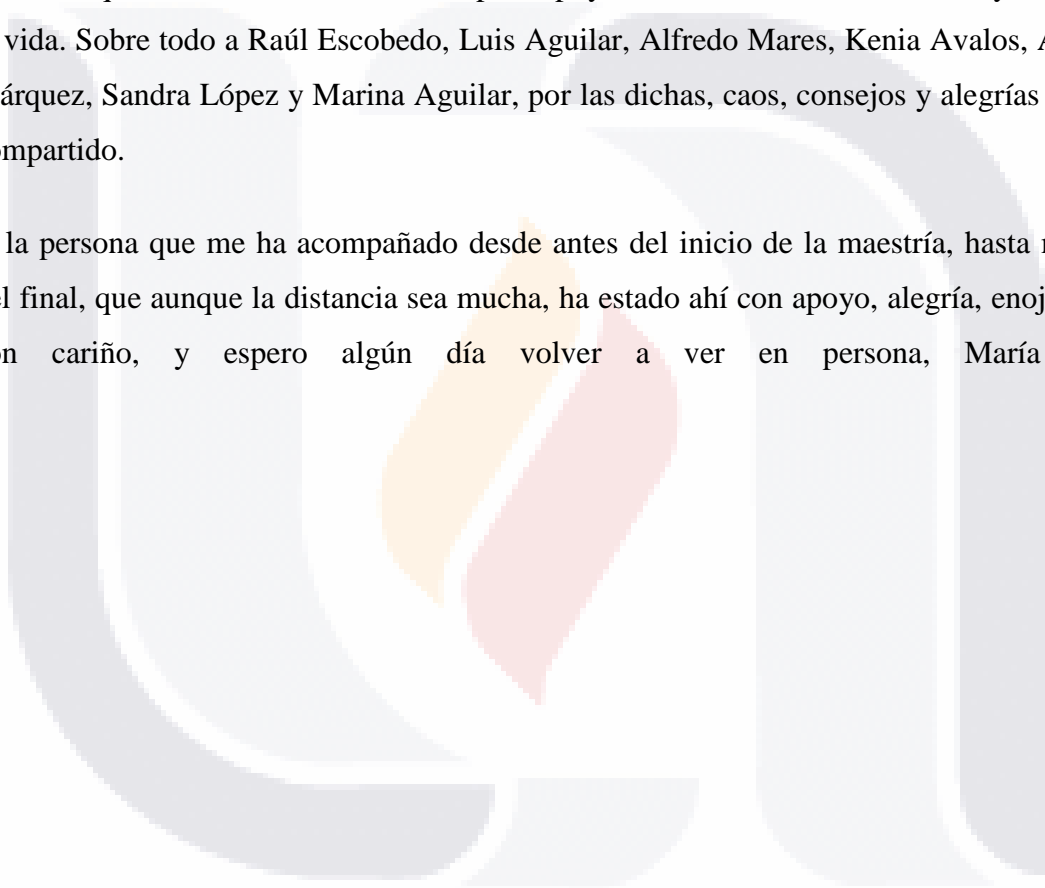


DEDICATORIAS

A mi familia, Benjamín García, Teresa Flores, Rene García y Alejandra García, que aunque los he hecho batallar con mis ideas y con mi forma de ser, con cariño, apoyo y mucha paciencia para salir adelante.

A mis amigos, que aunque algunos van, y otros vienen, los que se quedan aun sabiendo de las cosas que uno hace, estuvieron ahí para apoyarme en los momentos malos y buenos de la vida. Sobre todo a Raúl Escobedo, Luis Aguilar, Alfredo Mares, Kenia Avalos, Azucena Márquez, Sandra López y Marina Aguilar, por las dichas, caos, consejos y alegrías que han compartido.

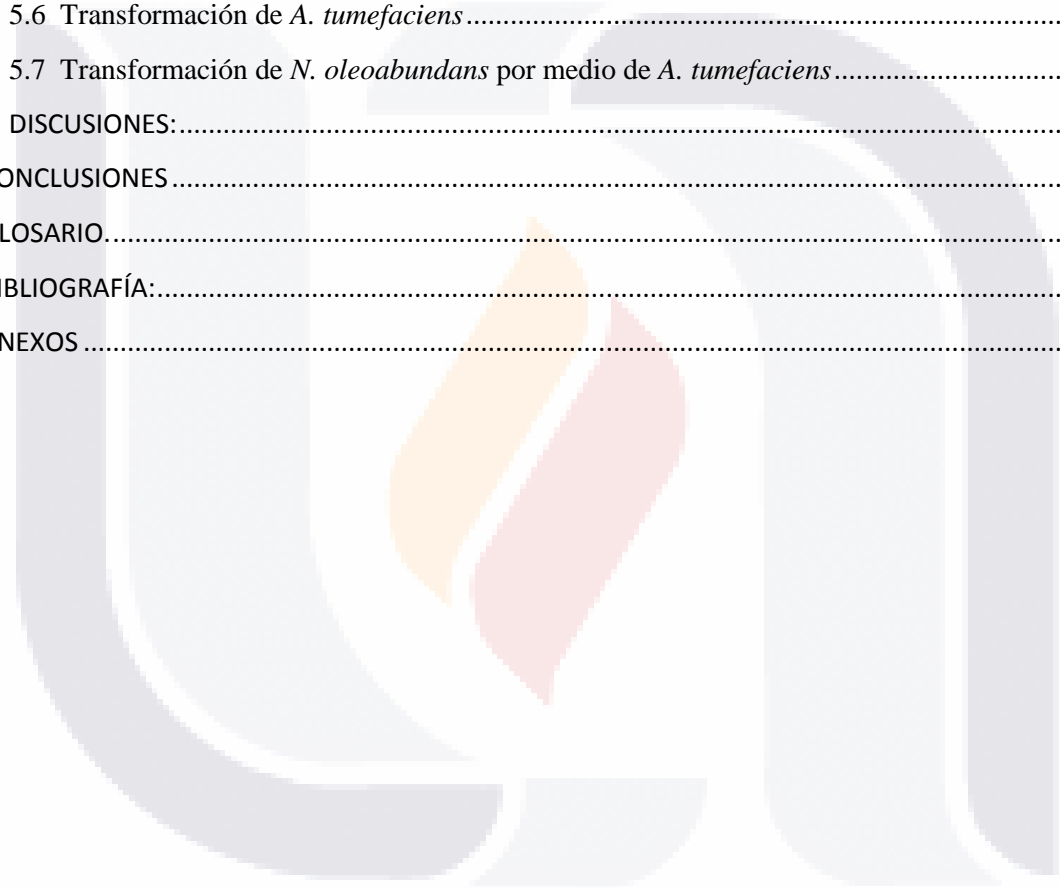
A la persona que me ha acompañado desde antes del inicio de la maestría, hasta más allá del final, que aunque la distancia sea mucha, ha estado ahí con apoyo, alegría, enojos, pero con cariño, y espero algún día volver a ver en persona, María Mejía



INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	3
ACRÓNIMOS.....	4
RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCION.....	7
1. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1 Microalgas.....	8
1.1.1 Neochloris oleoabundans	9
1.2 Métodos de transformación genética.....	11
1.2.1 Biolística	13
1.2.2 Electroporación	14
1.2.3 Agrobacterium tumefaciens	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1 Neochloris oleoabundans	17
4.2 Preparación del vector de transformación.....	17
4.3 Ensayos de electroporación.....	18
4.4 Evaluación de contaminación de <i>N. oleoabundans</i>	18
4.5 Viabilidad de <i>N. oleoabundans</i>	19
4.6 Cultivo de Agrobacterium tumefaciens	19
4.7 transformación de Agrobacterium tumefaciens	19
4.8 Evaluación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
4.9 Transformación de <i>N. oleoabundans</i> por medio de <i>A. tumefaciens</i>	20

4.10 Evaluación de transformación de <i>N. oleoabundans</i>	21
5. RESULTADOS	21
5.1 Cultivo de <i>Neochloris oleoabundans</i>	21
5.2 Preparación del vector de transformación.....	22
5.3 Ensayos de electroporación de <i>N. oleoabundans</i>	23
5.4. Viabilidad de <i>N. oleoabundans</i>	25
5.5 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
5.6 Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	26
5.7 Transformación de <i>N. oleoabundans</i> por medio de <i>A. tumefaciens</i>	32
6. DISCUSIONES:.....	34
CONCLUSIONES	38
GLOSARIO.....	39
BIBLIOGRAFÍA:.....	41
ANEXOS	45



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Neochloris oleoabundans</i> observadas por microscopia.....	22
Figura 2. Caracterización del plásmido pPha-DUAL-[2xNR].	22
Figura 3. Colonias resultantes de la transformación de <i>N. oleoabundans</i>	24
Figura 4. Matraces con diferentes condiciones de cultivo de <i>N. oleoabundans</i>	25
Figura 5. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
Figura 6. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Bacterias no transformadas.	31
Figura 7. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Bacterias presuntamente transformadas.	31
Figura 8. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformada en medio LB con 100 µg/mL de Ampicilina y 25 mg/L de Rifampicina.	32
Figura 9. Colonias de <i>N. oleoabundans</i> obtenidas en la caja de petri con una concentración de zeocina de 100 microgramos por mililitro.....	33
Figura 10. Detección de fluorescencia en las colonias trasformadas.	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Viabilidad de <i>N. oleoabundans</i> utilizando medio BBM y buffer hipos molar.....	25
Tabla 2. Comparación del crecimiento de colonias presuntamente transformadas	33
Tabla 3. comparación entre el contenido de lípidos y la productividad.	37

ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
AS	Acetosiringona
BBM	Medio Bold Basal
C	Carbono
g	Gravedades
gr	Gramo
GFP	Proteína verde fluorescente
H	Hidrógeno
mg	Miligramos
N	Nitrógeno
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
OD	Densidad óptica
[pb]	Pares de bases
S	Azufre
rpm	Revoluciones por minuto
μl	Microlitro
μm	Micrómetro o micra

RESUMEN

Se evaluó las diferentes formas de transformación genética por medio de electroporación y *Agrobacterium tumefaciens* de la microalga *Neochloris oleoabundans*. Se obtuvieron diferentes resultados de transformación según el método utilizado, así como un mejor índice de colonias transformadas en un método. En cuanto al resultado de la transformación, se utilizó zeocina como agente seleccionador y el gen de GFP como respuesta a esta. Se obtuvo un grado de transformación de 3.33% utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y 1.33% en caso de electroporación, esto ya que el plásmido utilizado pPha-DUAL-[2xNR], no fue compatible con la microalga. Los medios de cultivo para que creciera la microalga presuntamente transformada fueron los medios BBM, los cuales tienen los nutrientes necesarios de crecimiento, así como concentraciones de Zeocina entre 50 µg/mL a 200 µg/mL, para ver como reaccionaba la microalga con los diferentes métodos de transformación. De igual manera se utilizó un espectro de luz de 305 nm para que el gen de GFP reaccionara y mostrara su luminiscencia.

ABSTRACT

Different forms of genetic transformation were evaluated by electroporation and *Agrobacterium tumefaciens* of the microalgae *Neochloris oleoabundans*. Different processing results were obtained by the method used and a better index of colonies transformed in a method. In the result of the transformation, zeocin was used as selecting agent and the GFP gene in response to this. A 3.33% degree of transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and 1.33% for electroporation were obtained, as result of the plasmid used pPha-DUAL- [2xNR] was not compatible with the microalgae. The culture media to grow microalgae were allegedly transformed by BBM media, which have the necessary nutrients for growth and Zeocin concentrations of 50 mg / mL to 200 mg / mL, to see how they react to different microalgae transformation methods. In the same way a spectrum of light of 305 nm was used to react in GFP gene and show its luminescence.



INTRODUCCION

Las microalgas representan el "mejor de ambos mundos", la combinación de la alta tasa de crecimiento y facilidad de cultivo de los microorganismos y la capacidad de realizar modificaciones post-transcripcional y post-traduccionales de las plantas. El desarrollo de sistemas de expresión de microalgas económicamente viables es, sin embargo, obstaculizado por los bajos rendimientos de proteínas recombinantes. Aunque todavía hay muchos obstáculos para superar antes de convertir las microalgas en sistemas de expresión de proteínas estándar, se han logrado avances considerables. Algunos transgenes se han expresado con éxito en los genomas de microalgas tanto nucleares como del cloroplasto, aunque a niveles económicamente viables sólo en cloroplastos. La siguiente sección de la introducción de esta tesis describe los avances recientes en la manipulación genética de las microalgas, estrategias para aumentar la producción de proteínas y algunas interesantes vías de investigación que aún no se han explorado.

Las microalgas tienden a ser de fácil manipulación y transformación debido a la falta de una pared celular rígida similar a la encontrada en las plantas superiores. La principal ventaja de utilizar microalgas sobre otros sistemas son los bajos costos, alta tasa de crecimiento, fácil cultivo, junto con la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales. Sin embargo, los resultados de la transformación del genoma nuclear de microalgas dan bajos e inconsistentes rendimientos. Se han observado diferentes rendimientos del total de proteínas en las células (0.88 a 20.9 %) en una única transformación biolística de los cloroplastos de microalgas. Actualmente, los potenciadores y reguladores han demostrado ser un recurso eficiente para aumentar los rendimientos de proteínas recombinantes.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que pueden crecer de manera autótrofica o heterótrofica. En general, son altamente eficientes en la fijación del Dióxido de carbono (CO₂) y utilización de la energía solar para producir biomasa. Estos microorganismos están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditados solo al agua. Se encuentran también presentes en el suelo y en la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos, lo cual permite encontrarlas ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones. Así como son ubicuos (es decir que están presentes en muchos ambientes), también tienen una gran diversidad taxonómica. Las microalgas para su desarrollo requieren de CO₂, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros nutrientes menores como metales, los cuales son esenciales porque actúan como cofactores de enzimas importantes en el metabolismo de estos microorganismos. (Guedes y Malcata, 2010) mencionan que las microalgas (es decir, las algas o fitoplancton unicelular) representan el más grande, y sin embargo uno de los más mal entendidos, grupos de microorganismos de la Tierra. Como sucede con las plantas con respecto a los animales terrestres, las microalgas representan la base nutricional natural y fuente principal de nutrientes a granel en la cadena alimentaria acuática.

La biosíntesis de triacilglicérols en algas está presente en un diverso grupo de estos organismos incluyendo procariontes y eucariontes en forma de células individuales, células colonizadoras y plantas multicelulares. Como se mencionó anteriormente, las algas pueden crecer en diversos ecosistemas, como son marinos y ambientes frescos, tierras del desierto, aguas calientes e incluso en hielo y nieve. Para sobrevivir a esos ambientes, el alga produce variedades de lípidos, como componentes de membranas celulares o para reserva de energía. Las algas verdes oleaginosas presentan un promedio total de lípidos de 25.5 % en peso seco, el cual puede incrementar a 55.2 % cuando el alga está en condiciones de estrés (Yu, et al. 2011). Las especies de algas, concretamente las microalgas, tienen una composición

general bioquímica de 30-50 % en peso seco de proteínas, 20-40 % en peso seco de carbohidratos y 8-15 % en peso seco de lípidos bajo condiciones óptimas. Bajo condiciones desfavorables, algunas especies cambian su ruta metabólica para la biosíntesis de lípidos o polisacáridos para su almacenamiento como reserva de energía.

La ASP (Aquatic Species Program), ha hecho copias extras del gen de la ACCasa monomérica, la cual está implicada en la síntesis de los lípidos y ácidos grasos. Los lípidos son componentes esenciales de las membranas celulares y sin ellos no se pueden producir nuevas células. La actividad de la enzima ACCasa se produce por dos isoenzimas localizadas en diferentes compartimentos de la célula de la planta, los plastidios y el citosol. La enzima plastídica es responsable de la biosíntesis de nuevos ácidos grasos en la célula y la enzima ACCasa citosólica se necesita para la elongación de los ácidos grasos y para formar ácidos grasos de cadena larga.

En la diatomea *Cyclotella cryptica*, en un intento de incrementar la acumulación de lípidos, sin embargo no ha sido favorable para dicha producción. La razón de estos resultados no positivos por ingeniería genética es más que todo por la falta de un sistema de transformación viable como el que es utilizado en plantas superiores. Se han desarrollado varias técnicas de transformación genética para expresar proteínas recombinantes tanto en el cloroplasto, como en el genoma nuclear. Técnicas de transformación como la electroporación, bombardeo de partículas, carburo de silicio y *Agrobacterium tumefaciens* se ha visto que transforman una diversidad de microalgas y diatomeas. La principal finalidad es usar los aceites de algas como materia prima para la producción de biodiesel, por lo que los avances de la tecnología en ingeniería genética se deben usar para alcanzar el objetivo (Yu, et al. 2011).

1.1.1 *Neochloris oleoabundans*

Existen numerosas evidencias del valor nutricional de *Neochloris oleoabundans* para su empleo en acuicultura. Sin embargo, el reciente interés que ha adquirido esta especie se relaciona a la obtención de bioenergía, concretamente de biodiesel, debido a su capacidad para almacenar elevadas cantidades de lípidos que pueden ser transesterificados

para la producción de aceite. También se considera la producción de bioetanol y de biogás, ya que estos también se obtienen de diferentes tipos de microalgas. En condiciones estándar de crecimiento, *N. oleoabundans* contiene alrededor de 30% de lípidos respecto a su peso seco. No obstante, bajo determinadas condiciones de cultivo puede llegar a acumular hasta un 54 % de lípidos en su citoplasma, de los cuales el 80 % corresponden a triglicéridos. Por otro lado, *N. oleoabundans* muestra un elevado contenido en ácidos grasos saturados de 16–20 carbonos, tal como es requerido para la conversión a biodiesel, lo que la convierte en una de las especies de microalgas con mayor potencial para este fin (Saei, 2012).

Uno de los factores importantes a considerar para el cultivo de un tipo específico de microalga, por ejemplo *Neochloris oleoabundans*, es establecer los parámetros óptimos de crecimiento y obtener así un amplio beneficio. (Garduño et al, 2011) han trabajado con microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz y utilizando diferentes técnicas establecieron cultivos viables con medios tales como F/2, Provasoli y el fertilizante foliar Bayfoland forte. A partir de una *Cyanoprokaryota* y 16 *Chlorophyta* se logró el cultivo clonal de 11 especies: *Acutodesmus acuminatus*, *Closteriopsis acicularis*, *Coelastrum microporum*, *Chlorella minutissima*, *Desmodesmus quadricauda*, *Monactinus simplex*, *Oocystis marssonii*, *Pseudanabaena limnetica*, *Scenedesmus aculeolatus*, *S. obliquus* y *Staurastrum gracile*. Adicionalmente, a partir del material preservado se identificaron taxonómicamente 6 taxones de *Pediastrum sensu latum*. La obtención del ADN total de *M. simplex* y *Scenedesmus obliquus* se realizó mediante el Kit comercial DNeasy Plant. Se amplificaron las regiones ITS 1, 5.8S, ITS2, rbc-L y tnr-L. Estos resultados contribuyeron a incrementar el conocimiento de algunos géneros de microalgas dulce-acuícolas en México y constituyó la primera descripción de la ultra-estructura de poblaciones silvestres y en cultivo para *Monactinus simplex*. Los cultivos establecidos servirán además para la búsqueda de compuestos de uso industrial, alimenticio y farmacológico.

A pesar que *Neochloris oleoabundans* es una microalga que genera una gran cantidad de lípidos que pueden ser utilizados en la producción de biodiesel, los factores de crecimiento aún no han sido establecidos de una manera óptima. (Quezada et al., 2011) evaluaron el efecto de la intensidad luminosa sobre el crecimiento y presencia de lípidos intracelulares de esta microalga encontrando que la mayor densidad celular ocurrió a

136 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y que la productividad celular es sostenida durante el período experimental (15 días) en tales condiciones. El tamaño celular fue también afectado significativamente, siendo mayor a la menor ($10.92 \pm 1.26 \mu\text{m}$) y media ($11.88 \pm 1.12 \mu\text{m}$) intensidades probadas. Además, la intensidad luminosa afectó la acumulación de lípidos, los cultivos expuestos al mayor nivel probado mostraron un mayor porcentaje de células teñidas con Sudán III, tinte usado para manchar triglicéridos.

Para obtener una mayor acumulación de lípidos en microalgas, se ha trabajado recientemente con la inanición de nitrógeno en diferentes lotes de cosecha. Particularmente (Pruvost, 2009) ha investigado la capacidad para acumular lípidos, especialmente triacilgliceroles (TAG), de la microalga *Neochloris oleoabundans* en estas condiciones. Esto en un estudio sistemático, a partir de la determinación del medio de crecimiento para su caracterización en un fotobiorreactor puente aéreo, teniendo como resultados máximos una producción de $3.8 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$.

Una de las técnicas que también se utilizan para incrementar la producción de lípidos de *Neochloris oleoabundans* es la Ingeniería genética (IG), la cual consiste en introducir uno o varios genes, procedentes del mismo u otro organismo, con el propósito de conferir al organismo receptor nuevas características. Los requisitos para hacer IG son: genes específicos que confieran la características que deseamos y elementos genéticos reguladores (controlan la expresión correcta del gen), un organismo donador (fuente o portador del material genético) y un organismo receptor (que llevará el gen exógeno para producir el producto de interés). (Hodson, 2005)

1.2 Métodos de transformación genética

La idea de realizar ingeniería genética en microalgas, por ejemplo para incrementar el contenido de componentes de valor agregado, es muy atractiva hoy en día. Esto debido a que la diferenciación celular de las microalgas representa un sistema mucho más susceptible de manipulación genética que las plantas superiores. Adicionalmente, los genes alélicos están ausentes debido a la naturaleza haploide de los estados vegetativos de la microalga. Desafortunadamente, el progreso en la ingeniería genética de algas ha sido

extremadamente lento. Los métodos efectivos de transformación de otros sistemas han fallado cuando son aplicados en las algas, esto principalmente por la brecha evolucionaria entre las algas y los otros organismos (Pulz, 2004). Además, las algas tienen a menudo un uso inusual de codones que requiere incluso más ajustes antes de una exitosa transformación. En la actualidad, todos estos requisitos se han cumplido para las diatomeas *Phaeodactylum*, *Chlamydomonas* y las cianobacterias *Synechococcus* y *Synechocystis*. El desarrollo de un sistema de transformación funcional se puede esperar en un futuro próximo para otras diatomeas y cianobacterias. Las diatomeas son de especial interés para la biotecnología porque tienen el potencial fisiológico para acumular altas proporciones de lípidos. Por lo tanto, la mejora de la producción de aceite de estas algas, naturalmente, es un objetivo prioritario de la ingeniería genética.

Los avances que se han obtenido son muy prometedores, sin embargo, deben ser vistos con precaución por las siguientes razones:

La acumulación de sustancias valiosas en las algas a través transformación genética sólo puede aumentar hasta un punto donde el metabolismo celular comienza a ser negativamente afectado. Este umbral puede ser bastante bajo y, por lo tanto, los beneficios insignificantes.

Las algas transgénicas potencialmente representan una amenaza considerable al ecosistema, y lo más probable es que sean prohibidos los sistemas de cultivo al aire libre y de esta manera estén bajo regulación estricta.

Las áreas de aplicación de la biotecnología de microalgas, son aquellas opciones donde la microalga sea aprovechada a su máxima capacidad, estas son: la biomasa de algas para nutrición humana, alimentación animal, acuicultura, biofertilizante, los ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, antioxidantes, pigmentos y productos colorantes alimentarios y otras sustancias con actividad biológica, los isótopos estables de microalgas y aplicaciones medioambientales (biorremediación de efluentes), entre otros.

1.2.1 Biolística

El bombardeo de células con partículas metálicas recubiertas de ADN es un método de transformación generalizada, simple, eficaz y altamente producible. Este método denominado biolística se ha empleado con éxito para la transformación de la mayoría de los sistemas de expresión celulares estándar, y por lo tanto, no es sorprendente que también sea útil para el estudio de microalgas. En la biolística se utilizan microesferas de metal cubiertas de ADN (bolas de oro o tungsteno de un micrón de diámetro) que son proyectadas a enorme velocidad sobre las células que desean modificarse con el fin de cruzar su pared. Estas esferas se retrasarán progresivamente cruzando las distintas capas celulares. Algunas de las células alcanzadas van entonces a integrar espontáneamente los genes en su genoma. Pero el núcleo de la célula incluye el ADN de manera aleatoria.

Según la especie, el período que ha de transcurrir antes de obtener una cepa transgénica estable puede variar de algunos días a varios meses. Este método se utiliza también para efectuar la transformación de los genomas de orgánulos, cloroplastos o mitocondrias. La transformación por biolística es además una alternativa interesante a la transformación de plantas por *Agrobacterium tumefaciens*, ya que no requiere secuencias exógenas para permitir la integración del fragmento de ADN.

El principal inconveniente del método de bombardeo de partículas es el costo del equipo especializado requerido. Aunque el número de transformantes recuperados tras el bombardeo de partículas puede ser bajo, sigue siendo el método más eficaz para la transformación de cloroplastos, ya que permite la entrega de múltiples copias de ADN recombinante, aumentando la posibilidad de éxito de integración del gen de interés. Este método ha demostrado ser eficaz y estable para los cloroplastos y transformación de cepas de *C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Chlorella sorokiana*, *Chlorella ellipsoidea* y *Chlorella kessleri*. (Randor et al, 2010). Trabajos recientes han demostrado que el método de bombardeo de partículas también es eficaz para la transformación de especies de algas más complejas, tales como *Gonium pectorale*. (Kai et al, 2009)

1.2.2 Electroporación

En el método de electroporación se induce la captación de macromoléculas mediante la exposición de las células a los pulsos de un campo eléctrico de alta intensidad. La electroporación interrumpe específicamente las bicapas lipídicas generando un transporte molecular eficiente a través de la membrana plasmática. La transformación mediada por electroporación se ha logrado tanto en cepas deficientes de pared celular como de tipo silvestre. La electroporación se lleva a cabo en un electroporador, un aparato que crea un campo electromagnético a través de la suspensión celular (típicamente bacterias, aunque se puede aplicar a otros tipos de células, como se ha comentado anteriormente). La suspensión se pipetea en una cubeta de plástico o vidrio con electrodos de aluminio en los costados. La eficiencia de transformación por electroporación es de dos órdenes de magnitud más alta que el método de granos de cristal, y sólo requiere un equipo relativamente simple. Los parámetros más importantes que afectan la eficiencia de la electroporación incluyen la intensidad de campo, longitud de pulso, composición del medio, temperatura y características propias de la membrana, así como la concentración de ADN. La electroporación se ha utilizado con éxito para la transformación de las especies: *D.salina*, *Dunaliellaviridis* y *Dunaliella tertiolecta*, *C.reinhardtii*, especies de *Chlorella* y *Nannochloro psisocolata*. El éxito de la electroporación depende en gran medida de la pureza de la disolución de plásmido, especialmente de su contenido en sales. Las disoluciones impuras pueden causar una pequeña explosión (un arco eléctrico), en cuyo caso las células morirían. Si esto ocurre a menudo, podría ser necesaria una sedimentación de las células antes de una nueva electroporación. (Griesbeck et al, 2012)

1.2.3 *Agrobacterium tumefaciens*

El método de transformación más utilizado hasta la fecha es el basado en la habilidad de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para transferir e integrar ADN propio - un tramo concreto denominado T-ADN - en la célula vegetal a la que infecta. Los genes incluidos en el T-ADN son capaces de perturbar la regulación del crecimiento de la célula infectada (se multiplica como si fuera un tumor), y de hacer que esta célula fabrique unas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sustancias que sirven de alimento exclusivo para la bacteria porque sólo ella está equipada para digerirlas. Si se eliminan estos genes, pero se respetan los extremos del T-ADN, se retiene la capacidad de transferir material genético a la planta aunque pierde la capacidad de formar tumores y producir sustancias nutritivas para la bacteria. Si introducimos genes ajenos entre los bordes del T-ADN, la bacteria introducirá por lo tanto estos genes en la célula vegetal y los integrará en un cromosoma de ésta misma. Una vez integrados, los genes se expresarán y se transmitirán a la descendencia del mismo modo que lo hacen los que componen el genoma original (García, 1999).

La transformación por *Agrobacterium* puede realizarse en una célula vegetal aislada a la que se ha eliminado su pared celular (protoplasto), en un trozo de tejido foliar en cultivo (explante) o, incluso, en una plántula en desarrollo. Este último método, que hasta ahora sólo se ha optimizado en *Arabidopsis*, es el más fácil ya que sólo requiere sumergir una plantita con su botón floral en una suspensión de la bacteria portadora del T-ADN deseado y hacer un breve vacío. Esto conduce a la transformación de algunas de las células germinales de los tejidos florales. En la descendencia se identifican las plantas portadoras de T-ADN.

La transformación mediada por inducción de tumores por *A. tumefaciens* hasta ahora se ha utilizado principalmente para modificar células vegetales empleando las regiones de T-ADN y virulencia (vir) que se encuentran en el plásmido inductor de tumores (PTI). Utilizando el método de transformación mediada por *Agrobacterium*, *C. reinhardtii* se transformó exitosamente con los genes indicadores uidA (β -glucuronidasa), GFP (proteína verde fluorescente) y hpt (higromicina fosfotransferasa), con un aumento de cincuenta veces de transformantes. GUS (β -glucuronidasa), GFP y los genes hpt fueron también integrados con éxito en *H. pluvialis* usando este mismo método. Uno de los trabajos más recientes es la transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Para esta transformación se empleó el plásmido binario pGJ2798, portador del gen de selección NPTII, que confiere resistencia a antibióticos aminoglicosilados y el gen reportero GFP que codifica la proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Para el desarrollo del protocolo se realizaron experimentos sucesivos en los que se evaluó el efecto de diferentes factores implicados en el éxito de la transformación, como

son el periodo de co-cultivo (24, 48 y 72 h), temperatura (22 y 25 °C) e irradiación (oscuridad /fotoperiodo de 16 h) durante el periodo de co-cultivo, así como el tipo de soporte empleado durante la infección. Por otro lado, y con el fin de aumentar la virulencia de *A. tumefaciens*, se emplearon dos concentraciones, 100 y 200 µg/mL de acetosirigona en el cultivo bacteriano. Los resultados mostraron que la irradiación durante el periodo de cocultivo es un factor determinante para el éxito de la infección, obteniéndose una eficiencia de 30 colonias por millón de células sembradas, de las cuales un 82% mantiene el fenotipo de resistencia al antibiótico de selección durante al menos un año. La verificación molecular de transformantes mediante PCR permitió amplificar dos fragmentos de 654 y 524 pares de bases correspondientes a los genes NptII y GFP confirmando el carácter transgénico de las colonias obtenidas. No obstante, no se pudo detectar la proteína GFP en las colonias transformadas. (Ikarán, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de aceite y de compuestos importantes como proteínas y biomasa obtenida a partir de las microalgas tiene la limitante de que la concentración celular en base seca es baja. Sin embargo, la productividad y el rendimiento puede optimizarse ya sea por incremento en la concentración celular o incrementando el porcentaje de estos compuestos dentro de la célula. Una manera de incrementar el contenido proteico y lipídico en la célula es mediante el uso de la transformación genética. Si se aplica esta metodología a la microalga *Neochloris oleoabundans* utilizando diferentes técnicas de transformación, como la electroporación, biolística y uso de *A. tumefaciens*, se podrá incrementar de manera sustancial el contenido de compuestos y aumentar así el rendimiento y la productividad. Se utiliza esta especie de microalga debido a su gran productividad de lípidos, y a que esta especie requiere bajos costes nutricionales para poder sobrevivir, por lo que es una microalga con un gran potencial de negocio.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar un método de transformación genética estable y con alto rendimiento para la microalga *Neochloris oleoabundans*.

3.2 Objetivos particulares

- I. Evaluar la transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando electroporación.
- II. Realizar la transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Neochloris oleoabundans

Se cultivaron las células de la microalga *Neochloris oleoabundans* en el Medio Bold Basal (BBM) líquido, el cual contiene soluciones de micro y macro nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas verdes de agua fresca. La composición del medio fue previamente descrita por Nichols y Bold (1965). *Neochloris oleoabundans* fue cultivada en agitación orbital constante (150 rpm), por un fotoperiodo de 24 h y un tiempo de 2 semanas para la posterior obtención de una cantidad considerable de microalgas. Se utilizó la cámara de Neubauer para el conteo celular por mililitro de cultivo.

4.2 Preparación del vector de transformación

Se empleó la cepa de células competentes *E. coli* DH5a para su transformación genética mediante choque térmico con el vector pPha-DUAL-[2xNR], donado por Franziska Hempel, Andrew S Bozarth, Nicole Lindenkamp, Andreas Klingl, Stefan Zauner, Uwe Linne, Alexander Steinbüchel and Uwe G Maier, el cual contiene el gen reportero egfp, que codifica para la proteína GFP y el gen de selección Ble que confiere resistencia frente a antibióticos como la Zeocina. Posterior a su transformación, las bacterias se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivaron en medio Luria Broth (LB) sólido, con ampicilina (1000X) e incubadas a 37 °C durante 24 h para la selección de colonias transformadas.

Las colonias aisladas resultantes de la transformación se cultivaron en medio LB líquido con Ampicilina. La extracción de su DNA plasmídico se realizó por medio de la técnica de Minipreparación por Lisis Alcalina a pequeña escala. Mediante el uso del kit comercial Plasmid Midi (Qiagen) se llevó a cabo la extracción a gran escala del plásmido. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% para verificar la correcta extracción del DNA plasmídico. Todos los ADNs se cuantificaron usando el espectrofotómetro Jenway genova nano midiendo específicamente su concentración y pureza (relación 260/280). Las enzimas utilizadas para la caracterización de los plásmidos obtenidos con sus respectivos fragmentos de restricción generados son los siguientes: BamHI (834y 4691 pb), EcoRV (796 y 4779 pb) y SacII (5523 y 2 pb). Estas enzimas pertenecen a la casa comercial Invitrogen.

4.3 Ensayos de electroporación

Se realizó un diseño de experimentos Taguchi para este caso, utilizando 4 factores: Fuerza del campo, tiempo de pulso y número de pulsos. Cada uno con 3 niveles: fuerza de campo con 750, 900 y 1000 V, tiempo de pulso: 100, 250 y 500 μ s y número de pulsos: 1, 2 y 3 pulsos. En cuanto a la cantidad de ADN exógeno se mantuvo constante para todo el experimento, utilizando 20 μ g. Se prepararon cajas con medio BBM sólido y diferentes concentraciones de Zeocina: 20 cajas con 50 μ g/mL, 20 cajas con 100 μ g/mL y 20 cajas con 200 μ g/mL.

4.4 Evaluación de contaminación de *N. oleoabundans*

De forma paralela, se evaluó la posible contaminación de la cepa original de *N. oleoabundans* en medio sólido. Para ello, se midió la Densidad Óptica (OD) a uno de los matraces del cultivo y después se centrifugo una muestra y se re-suspendió en medio de cultivo nuevo a una concentración de 1×10^6 células/mL. El volumen obtenido de células re suspendido debe ser mínimo de 500 μ L. En una placa de medio/agar para *Neochloris* (sin

antibióticos) se agregó 20 μL de Ampicilina (el antibiótico tiene una concentración de 1000x y la caja contiene aprox. 20 mL de medio/agar, así la concentración final es 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se distribuyó con el uso de las perlas de vidrio. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 10 min para que se sequen. Se agregaron 20 μL de Cloranfenicol a otra nueva caja de medio/agar para Neochloris y se distribuyó éste antibiótico por medio de las perlas de vidrio. Se plaquearon 100 μL de células re suspendidas en una caja de Petri con medio de cultivo/agar sin antibióticos, 100 μL en una placa con zeocina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 μL en la placa que contiene Ampicilina y 100 μL en la caja que contiene el Cloranfenicol. En total se plaquearon 4 cajas con el uso de las perlas de vidrio. Finalmente las placas fueron incubadas en el cuarto de microalgas (aprox. 28°C) en presencia de luz.

Se evaluó diariamente el crecimiento de Neochloris en las cajas con los antibióticos, así como el crecimiento de microorganismos contaminantes.

4.5 Viabilidad de *N. oleoabundans*

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas de la viabilidad de *N. oleoabundans* en el medio de electroporación Hiposmolar. Para esto, se contabilizó el número de células totales y viables en medio BBM y buffer de electroporación. Se tomó una muestra de cultivo de 100 μL cuya concentración es 1.8×10^7 células/mL, y se re-suspendieron en 2 tubos, uno con 1.7 mL de medio BBM, y otro con 1.7 mL de Buffer de Hiposmolar para obtener una concentración final de 1×10^6 células/mL. Se incubaron 30 min. a temperatura ambiente para visualizar el efecto que tiene el buffer en las células de *N. oleoabundans*.

4.6 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Se inoculo una colonia de *A. tumefaciens* en 200 mL de medio LB suministrado con 25 mg/L de rifampicina y se incubó por 48 h a una temperatura constante de 37 °C y una agitación de 180 rpm en ausencia de luz. Este cultivo se utilizó para transportar e insertar el plásmido pPha-DUAL-[2xNR].

4.7 transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de la bacteria *A. tumefaciens*, se utilizó la técnica de choque térmico como se describe a continuación. Se tomaron 200 μL del cultivo anterior a una absorbancia de 0.8 a 600 nm, en un tubo eppendorf de 1 mL y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. Se retiró el sobrenadante. En seguida se le añadió 50 μL del plásmido Dual con una concentración de 20 μg , extraído anteriormente. Una vez hecho esto, se colocó la mezcla bacteria-DNA en baño de hielo por 10 minutos, e inmediatamente después en baño de agua a una temperatura de 42 °C, por 45 s. Retirándolo de inmediato a un baño de hielo por 30 min. Pasado el tiempo se añadió 200 μL de medio LB y se incubó por una hora a 37 °C en agitación constante.

4.8 Evaluación de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon tubos de 10 mL con medio LB con las siguientes condiciones: 10 tubos con medio LB solamente, 10 cajas con medio LB y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, 10 cajas con medio LB y 25 mg/L de rifampicina y 10 cajas de medio LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 25 mg/L de rifampicina.

Así mismo, se prepararon cajas de petri con medio LB y agar al 7% bajo las siguientes condiciones: 10 cajas con medio LB solamente, 10 cajas con medio LB y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, 10 cajas con medio LB y 25 mg/L de rifampicina y 10 cajas de medio LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 25 mg/L de rifampicina. Se utilizó una caja de cada condición para evaluar la transformación. Se colocaron 10 μL de las bacterias *A. tumefaciens* presuntamente transformadas y se sembraron en las cajas. De las cajas con transformación positiva se tomó una colonia y se cultivó en 100 mL de medio LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 25 mg/L de rifampicina.

4.9 Transformación de *N. oleoabundans* por medio de *A. tumefaciens*

Se prepararon tubos eppendorf con 200 μL de *A. tumefaciens* transformada y se centrifugaron por 5 min. a 20000g posteriormente se desechó el sobrenadante. Se añadió 100 μL de acetosiringona (AS) y medio de inducción (sales AB 1X, 2mM NaH_2PO_4 , 30 mM MES, glucosa 1%, 100 mM acetosiringona), para tener una concentración de AS de

100 mM, esto para aumentar la virulencia de *A. tumefaciens*. Se agregó 200 μ L del cultivo de *N. oleoabundans* cuya concentración celular era de 1×10^6 células por mililitro, para realizar el cocultivo. Este cocultivo se incubó en una cámara con iluminación constante por 12, 24 y 48 h para evaluar la transformación. Pasado este tiempo se añadió cefatoxima para eliminar el rastro de *A. tumefaciens* que aun este presente. Se avaluó finalmente la transformación.

4.10 Evaluación de transformación de *N. oleoabundans*

Se prepararon cajas de Petri con medio BBM, agar al 7% y una concentración de zeocina de 100 μ g/mL. Se sembraron en las cajas *N. oleoabundans* con los diferentes tiempos de agitación y contacto del cocultivo, así como un cultivo de *N. oleoabundans* sin transformar como control negativo.

5. RESULTADOS

5.1 Cultivo de *Neochloris oleoabundans*

Para el cultivo continuo de *N. oleoabundans*, se tomó 1 mL del cultivo primario de la microalga y se inocularon en 200 mL de nuevo medio BBM líquido. Estos nuevos cultivos se incubaron bajo las condiciones anteriormente señaladas en la sección de Material y métodos y fueron constantemente monitoreados para evaluar su crecimiento hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0.8, dando una concentración celular de aproximadamente 4×10^6 células por mililitro. La figura 1 muestra las células de *N. oleoabundans* cultivadas en medio BBM y observadas en microscopio a 100X. Las células mostraron un tamaño aproximado de 10 a 15 micras con una pared celular bien definida.

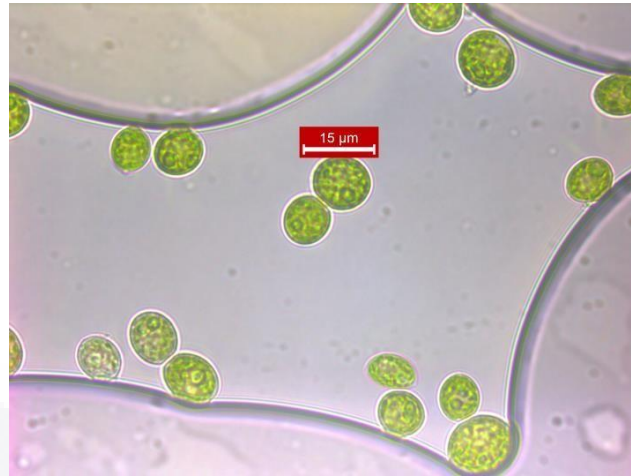


Figura 1. Células de *Neochloris oleoabundans* observadas por microscopia.

5.2 Preparación del vector de transformación

El vector pPha-DUAL-[2xNR] presentó una concentración final de 330 mg/ml con una relación 260/280 nm de 1.67. El plásmido extraído se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se caracterizó mediante digestión con enzimas de restricción específicas (Figura 2). El plásmido se conservó en congelación a -20°C hasta su utilización en la electroporación.

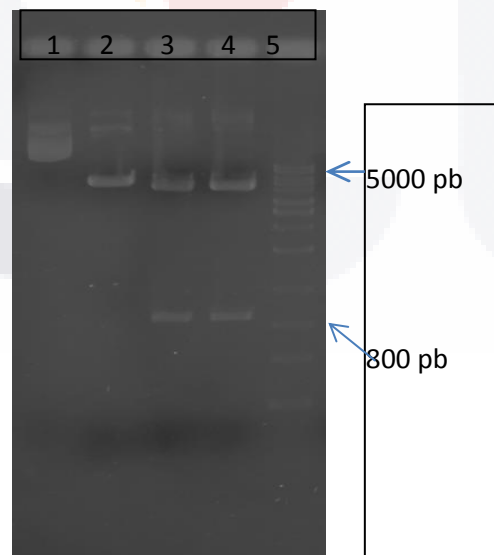


Figura 2. Caracterización del plásmido pPha-DUAL-[2xNR]. En el gel de agarosa 0.7 % se observan las diferentes bandas correspondientes a los fragmentos de restricción

obtenidos en la digestión enzimática. Carril 1: plásmido sin digerir. Carril 2: plásmido digerido con la enzima SacII, carril 3: plásmido digerido con la enzima EcoRV, carril 4: plásmido digerido con BamHI. Carril 5: marcador de 1kb.

5.3 Ensayos de electroporación de *N. oleoabundans*

Con el diseño experimental previamente descrito en la sección de Material y Métodos se pretendía realizar 18 experimentos, pero en ese momento se disponía de únicamente 5 celdas de electroporación, por lo que el experimento fue reducido a 5. Las condiciones evaluadas fueron las siguientes: 1000 V/cm, 100 μ s, 1000V/cm, 250 μ s, 1000 V/cm 500 μ s ,750 V/cm 250 μ s, 750V/cm 500 μ s.

En el experimento de electroporación, se utilizó una concentración celular de 1×10^6 células/ml de *N. oleoabundans*, partiendo de una concentración celular inicial de 4×10^6 células/mL. Para obtener esta concentración se tomaron 5 mL del cultivo de *N. oleoabundans* y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla celular en 2 mL de Buffer de electroporación Hiposmolar (Eppendorf). Para la electroporación, se utilizaron 400 μ L de células resuspendidas en el buffer mencionado y se colocaron en las cubetas de electroporación. El equipo utilizado es el Multiporador Eppendorf. Los pulsos utilizados para todos los experimentos fueron de 2 y la concentración de ADN exógeno se mantuvo en 3 μ g. Cada uno de los experimentos se transfirió a 3 cajas con medio sólido con 3 concentraciones diferentes de zeocina: 50, 100 y 200 μ g/mL. Se incluyeron 3 controles donde la microalga no fue electroporada para evaluar su resistencia con zeocina.

Una vez electroporadas las células, las cubetas se colocaron en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó nuevo medio BBM líquido para permitir la recuperación de las células y se incubaron por una hora a 25 °C. Para determinar la eficiencia de transformación de *N. oleoabundans*, se tomaron 100 μ L de la microalga y se sembraron en medio BBM solido conteniendo las diferentes concentraciones de Zeocina arriba mencionadas. Las placas se mantuvieron en incubación a 25 °C, con luz continua durante 8 días. Al término de éste tiempo las microalgas colocadas en el medio solido con las

diferentes concentraciones de zeocina mostraron poco crecimiento, obteniéndose solamente 2 colonias presuntamente transformadas en las cajas de los experimentos 1000 V, 100 μ s y 100 μ g/mL zeocina y 750v, 250 μ s y 100 μ g/mL zeocina, así como la presencia de colonias bacterianas de color blanco. Las colonias transformadas se transfirieron posteriormente a una placa de cultivo de 12 pozos donde se colocó 1.5 ml de BBM con una concentración de zeocina de 100 μ g/mL. Por otra parte, las cajas control de microalga no electroporadas también mostraron crecimiento bacteriano, quedando en duda la esterilidad del procedimiento utilizado.

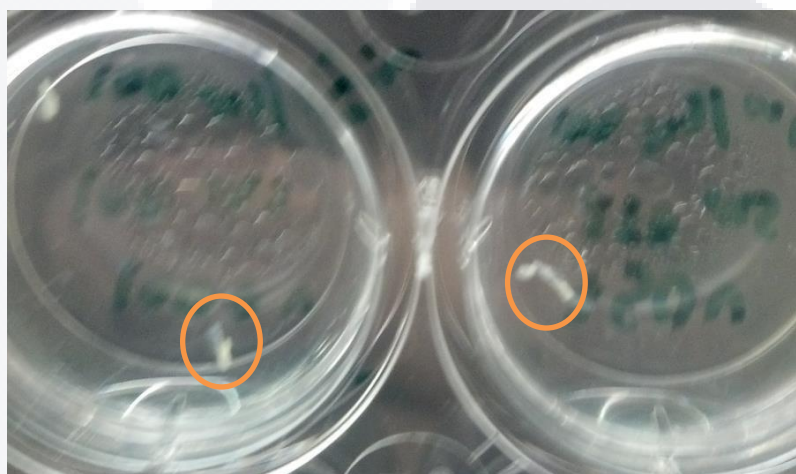


Figura 3. Colonias resultantes de la transformación de *N. oleoabundans* (círculo rojo).

Un segundo experimento se llevó a cabo para analizar el efecto intrínseco del antibiótico zeocina en la microalga *N. oleoabundans*. Para ello, se prepararon 3 matraces con 100 mL de BBM estéril cada uno. A uno se le añadió una concentración de 1×10^6 células de *N. oleoabundans* sin antibiótico, a otro matraz se le agregó zeocina a una concentración de 200 μ g/mL y al tercero se le agregó zeocina y *N. oleoabundans* a las concentraciones antes mencionadas. Se esperaba que en el experimento hubiera crecimiento únicamente en el medio BBM con microalga, sin embargo, también se presentó crecimiento en el matraz que contenía únicamente zeocina o microalga con una coloración blanca sugiriendo la contaminación del cultivo de *Neochloris*.

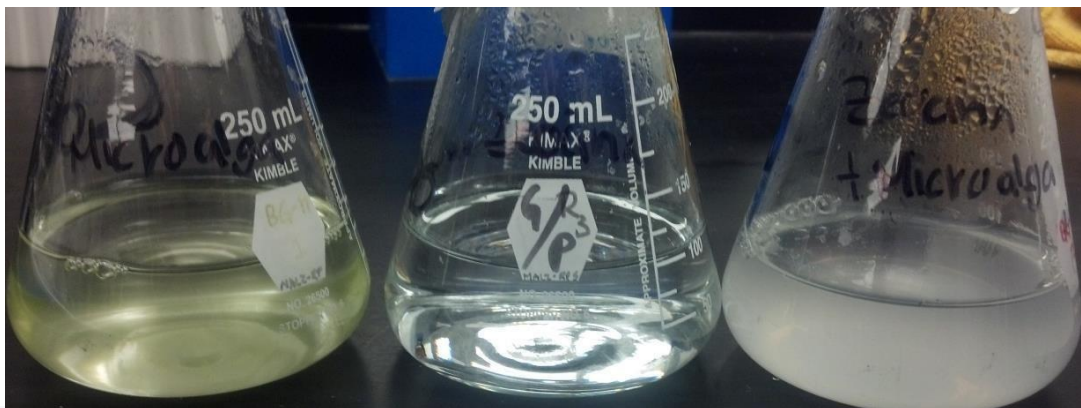


Figura 4. Matracos con diferentes condiciones de cultivo de *N. oleoabundans*. El matraz de la izquierda muestra el crecimiento de la microalga en BBM, el central corresponde al medio BBM con zeocina y el de la derecha es medio BBM con *N. oleoabundans* y zeocina.

5.4. Viabilidad de *N. oleoabundans*

El análisis de viabilidad contabilizando el número de células totales y viables de *N. oleoabundans* obtenidas durante su incubación en medio BBM y buffer de electroporación mostró los siguientes resultados:

Tabla 1. Viabilidad de *N. oleoabundans* utilizando medio BBM y buffer hipos molar.

Medio	total de células/mL	células lisadas/mL	viabilidad %
BBM	52500	15000	28.57
Buffer Hipos molar	17500	7500	42.85

De los resultados mostrados en la tabla, se aprecia como el medio hipos molar tiene una viabilidad mucho mayor a la hora de ser utilizado, esto debido a que es un medio preparado para ser utilizado para la intensidad de corriente, estando más estable a la hora de que el voltaje ataque a las células. Esto nos sirve para en un futuro, para tener la mayor viabilidad posible, utilizar medios selectivos en la hora de utilizar equipos de electroporación para obtener el mejor resultado.

5.5 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fue amablemente donada por el Profesor Investigador Abel Gutiérrez Ortega (CIATEC). Para el cultivo se prepararon tubos con 10 mL de medio Luria Bertani (LB), el cual contiene 10 g de NaCl, 10 g de extracto de levadura y 5 g de triptona, todo esto en 1 L. Posterior a esto los tubos con el medio se esterilizaron y se guardaron para su posterior uso. A los tubos de medio LB se le añadieron 5 μ L de Rifampicina, esta con una concentración de 50 g/mL, para obtener una concentración final de 25 g/L. Cuando cada tubo estuvo listo, se le inoculo una colonia aislada de *Agrobacterium tumefaciens* a cada uno de ellos, y se incubo a 37 °C con agitación constante de 150 rpm durante 48 horas para su crecimiento. En caso de no observarse crecimiento se repetía el procedimiento. Los tubos con crecimiento se guardaron en refrigeración a 4 °C para su uso posterior.

5.6 Transformación de *A. tumefaciens*

Para la transformación de la bacteria *A. tumefaciens*, se utilizó el plásmido pPha-DUAL-[2xNR] extraído en los pasos anteriores. Para los experimentos de crecimiento de la bacteria, se utilizaron tubos de 10 mL y se inocularon con 100 μ L del cultivo preparado anteriormente de *A. tumefaciens*, en nuevo medio LB que tenía una concentración final de 25 g/L de rifampicina. Se incubó el cultivo a 37 °C y 150 rpm por 48 h para obtener suficiente bacteria para los siguientes procedimientos. A continuación se procedió con la transformación genética por medio de choque térmico.

Primer grupo de ensayos

Se colocaron 500 μ L del cultivo de *Agrobacterium* en un tubo eppendorf de 1 mL, con 20 μ L del plásmido pPha-DUAL-[2xNR]. Posteriormente se colocaron en hielo por 30 minutos, e inmediatamente en agua a 42 °C por 45 s, pasado este tiempo se colocaron nuevamente en el baño de hielo por 30 min. Seguido de eso, se colocaron 500 μ L de medio LB en el tubo eppendorf y se incubo por 1 h a 37 °C con agitación constante de 150 rpm. Por separado se prepararon 8 tubos con diferentes concentraciones de antibiótico: 2 tubos

con 10 mL de medio LB, 2 tubos con 10 mL de LB con una concentración de Rifampicina de 25 g/L, 2 tubos con 10 mL de medio LB y una concentración de Ampicilina de 100 µg/mL, y 2 tubos con 10 mL de medio LB con una concentración de Rifampicina de 25 g/L y de Ampicilina 100 µg/mL.

Pasado el tiempo de incubación, se inocularon 100 µL del cultivo presuntamente transformado en los tubos preparados anteriormente. Una vez realizado esto se continuó incubando el cultivo a una temperatura de 37 °C con agitación constante a 150 rpm por 48 h para ver los resultados. Como resultado, no hubo crecimiento bacteriano en ningún tubo, por lo que se procedió a repetir el ensayo.

Segundo grupo de ensayos

Se colocaron 500 µL del cultivo de *Agrobacterium* en un tubo eppendorf de 1 mL se centrifugaron a 20000g por 5 min. a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 200 µL de CaCl₂ a 0.1 M, se agitó y se volvió a centrifugar a 20000g y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 2 veces, esto para hacer competentes a las células y capaces de aceptar el DNA exógeno. Posteriormente se añadieron los 20 µL del plásmido pPha-DUAL-[2xNR]. Se incubaron en hielo por 30 min., e inmediatamente se colocaron en agua a 42 °C por 1 min., pasado este tiempo se colocaron de inmediato en el baño de hielo por 30 min. Seguido de esto, se colocaron 500 µL de medio LB en el tubo eppendorf y se incubó por 1 h a 37°C con agitación constante de 150 rpm. Por separado se prepararon 8 tubos con diferentes concentraciones de antibiótico: 2 tubos con 10 mL de medio LB, 2 con 10 mL de LB con una concentración de Rifampicina de 25 g/L, 2 con 10 mL de medio LB con una concentración de Ampicilina de 100 µg/mL, y 2 con 10 mL de medio LB con una concentración de Rifampicina de 25 g/L y de Ampicilina 100 µg/mL.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon 100 µL del cultivo presuntamente transformado en los tubos preparados anteriormente. Estos tubos se dejaron incubando a una temperatura de 37 °C con agitación constante a 150 rpm por 48 horas para ver los resultados. Los resultados de este intento también fueron nulos, además mostraron crecimiento de hongos, lo que indica que hubo contaminación por un medio externo, por

ello se procedió a repetir el procedimiento con especial cuidado en las condiciones de cultivo.

Tercer grupo de ensayos

Se colocaron 500 μL del cultivo de *Agrobacterium* en un tubo eppendorf de 1 mL, se centrifugaron a 20000g rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 200 μL de CaCl_2 a 0.1 M, se agitó y se volvió a centrifugar a 20000g y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 2 veces y se añadió 20 μL del plásmido pPhaDUAL-[2xNR. Se incubaron en hielo por 30 minutos, e inmediatamente se colocaron en agua a 42 °C por 45 segundos, pasado este tiempo se colocaron de inmediato en el baño de hielo por 30 min. Seguido de esto, se agregaron 500 μL de medio LB en el tubo eppendorf y se incubó por 1 hora a 37 °C con agitación constante de 150 rpm.

Para esta ocasión se prepararon 8 cajas de Petri con las diferentes concentraciones de antibiótico antes mencionadas. Para ello se utilizaron 4 matraces con 100 mL de medio LB cada uno con una concentración de agar al 0.7%. Se calentó el medio/agar y a cada matraz tibio/frío se añadieron de la siguiente forma los antibióticos: un matraz sin antibiótico, a un matraz se le añadió 100 μL de Rifampicina a 25 mg/mL para tener una concentración final de 25 mg/L, a otro matraz se le añadió 200 μL de Ampicilina a 50 mg/mL para tener una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y al cuarto matraz se le añadió 100 μL de Rifampicina y 200 μL de Ampicilina.

Pasado el tiempo del cultivo de la transformación, se inocularon 100 μL del cultivo presuntamente transformado en las cajas preparadas anteriormente. En total fueron 8 cajas, 4 con *Agrobacterium* no transformada y 4 con *Agrobacterium* transformada. Se sembraron por técnica de estriado. Una vez realizado esto se incubaron las cajas a una temperatura de 37 °C por un lapso de 48 horas para ver los resultados.

Los resultados obtenidos de estos métodos fueron los siguientes (Figura 5), las cajas con *Agrobacterium* sin transformar mostraron un crecimiento en los medios LB sin antibiótico y con Rifampicina. En los medios con Ampicilina y con la combinación no hubo crecimiento. Las cajas con *Agrobacterium* presuntamente transformada, en la caja con

medio LB sin antibiótico hubo crecimiento, sin embargo en los medios con antibióticos no hubo crecimiento. Debido a esto, se procedió a realizar otro grupo de ensayos.

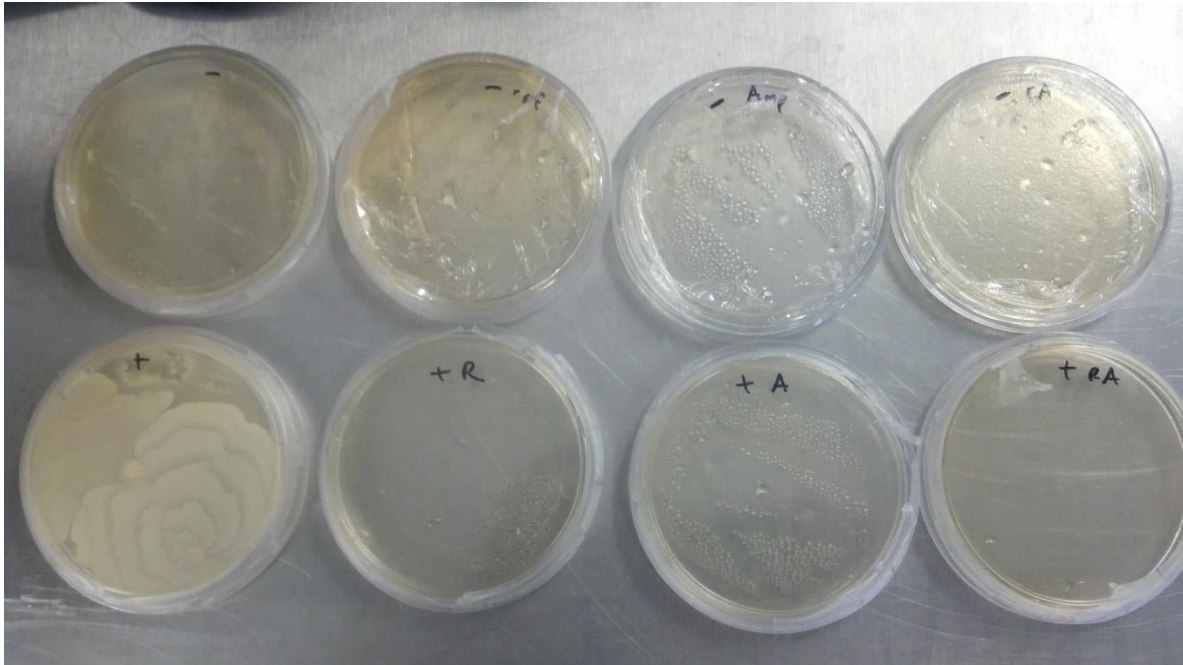


Figura 5. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. En la parte superior bacterias no transformadas. De izquierda a derecha: 1.-medio LB sin antibiótico, 2.- medio LB con Rifampicina, 3.- medio LB con Ampicilina, 4.- medio LB con Rifampicina y Ampicilina. En la parte inferior bacterias presuntamente transformadas, de izquierda a derecha: 5.- medio LB sin antibiótico, 6.- medio LB con Rifampicina, 7.- medio LB con Ampicilina, 8.- medio LB con Rifampicina y Ampicilina.

Cuarto grupo de ensayos

Se colocaron 500 μ L del cultivo de *Agrobacterium* en un tubo eppendorf de 1 mL, se centrifugaron a 20000g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 200 μ L de CaCl₂ a 0.1 M, se agitó y se volvió a centrifugar a 20000g y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 2 veces y se añadió 20 μ L del plásmido pPha-DUAL-[2xNR]. Se incubaron en hielo por 30 min., e inmediatamente se colocaron en agua a 42 °C por 1 min., pasado este tiempo se colocaron de inmediato en baño de hielo por 30 min. Seguido de esto, se colocaron 500 μ L de medio LB en el tubo eppendorf y se incubó por 1 h a 37 °C con agitación constante de 150 rpm. En estos experimentos, se utilizaron

cajas preparadas anteriormente con el mismo procedimiento descrito, para no tener alteraciones en las variables. Los resultados obtenidos en este grupo de ensayos fue una contaminación externa por hongos. Por lo que se procedió a repetir nuevamente el procedimiento.

Quinto grupo de ensayos

Se tomó 1 mL de cultivo de *Agrobacterium* en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 20000g por 5 min. a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 200 µL de CaCl₂ a 0.1 M, se agitó y se volvió a centrifugar a 20000g y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 2 veces más. A las células preparadas se le añadió 20 µL del plásmido previamente mencionado. Se colocaron las bacterias-DNA en un baño de hielo por 30 minutos. Inmediatamente se incubaron en un termoblock a 37 °C por 3 min., pasado este tiempo se colocaron nuevamente en baño de hielo por 30 min. Se añadió 400 µL de medio LB y se incubaron a 37°C y 150 rpm por 1 hora.

Se utilizaron las cajas preparadas del procedimiento anterior. Los resultados obtenidos en este grupo de ensayos fueron: con la bacteria *Agrobacterium* no transformada en presencia de medio LB mostró resultados positivos, en medio LB con Rifampicina, resultados positivos, en el medio LB con Ampicilina, resultados negativos, y el medio LB con Rifampicina y Ampicilina, resultados negativos. Para las cajas con *Agrobacterium* presuntamente transformada, en el medio LB tuvo resultados positivos, al igual que con el medio LB con Rifampicina, Ampicilina y en la combinación de ambos antibióticos (Rifampicina y Ampicilina) también se obtuvieron resultados positivos.



Figura 6. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Bacterias no transformadas. De izquierda a derecha: 1.-medio LB sin antibiótico, 2.- medio LB con Rifampicina, 3.- medio LB con Ampicilina, 4.- medio LB con Rifampicina y Ampicilina.



Figura 7. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Bacterias presuntamente transformadas. De izquierda a derecha: 1.-medio LB sin antibiótico, 2.- medio LB con Rifampicina, 3.- medio LB con Ampicilina, 4.- medio LB con Rifampicina y Ampicilina.

Se tomó una colonia transformada de *A. tumefaciens* y se inoculó en 100 mL de medio LB con 100 µg/mL de Ampicilina y 25 mg/L de Rifampicina, al término de 48 h de incubación a 37 °C se obtuvo un crecimiento, indicando que la bacteria se transformó de manera exitosa.

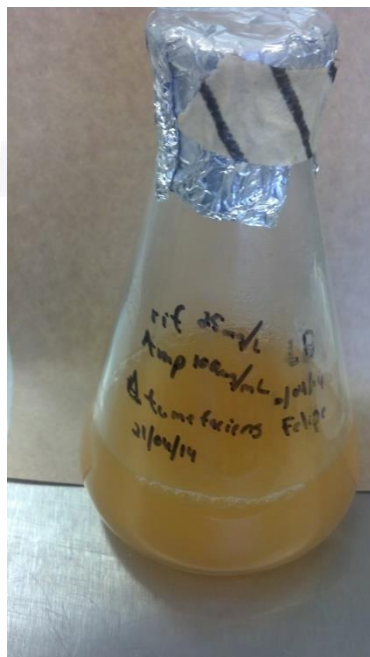


Figura 8. *Agrobacterium tumefaciens* transformada en medio LB con 100 µg/mL de Ampicilina y 25 mg/L de Rifampicina.

5.7 Transformación de *N. oleoabundans* por medio de *A. tumefaciens*

Los resultados de la transformación de *N. oleoabundans* con el vector pPha-DUAL-[2xNR] mediada por *A. tumefaciens* se muestran en la tabla 2 a diferentes tiempos de incubación a iluminación constante. Hubo crecimiento de colonias en una de las cajas con concentración de zeocina de 100 µg/mL, evaluada en un periodo de luz de 24 horas. Estas se obtuvieron después de 2 semanas de cultivo en las cajas con BBM en un cuarto con temperatura y luz controlada. Al cabo de 1 semana las colonias desaparecieron. El total de colonias obtenidas en este proceso fueron cinco. Cabe mencionar que el total de colonias

obtenidas en un cultivo de *N. oleoabundans* en el medio BBM normal es de un rango entre 130 a 150 colonias por caja.

Tabla 2. Comparación del crecimiento de colonias presuntamente transformadas después de un tiempo establecido de 12, 24 y 48 horas de luz continua en cocultivo con *A. tumefaciens*, con concentraciones de zeocina de 50, 100 y 200 µg/mL.

Concentración de zeocina / Tiempo de incubación en Luz	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
12 horas	Sin crecimiento de colonias	Sin crecimiento de colonias	Sin crecimiento de colonias
24 horas	Sin crecimiento de colonias	Poco crecimiento de colonias	Sin crecimiento de colonias
48 horas	Sin crecimiento de colonias	Sin crecimiento de colonias	Sin crecimiento de colonias

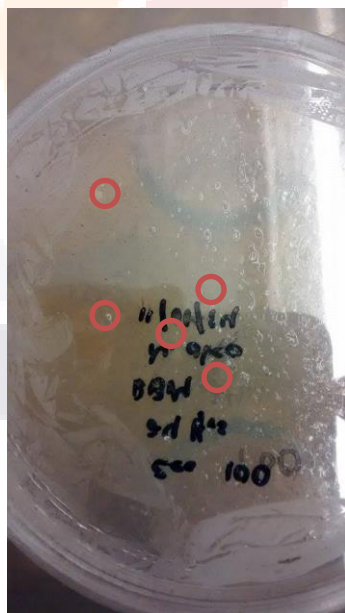


Figura 9. Colonias de *N. oleoabundans* obtenidas en la caja de petri con una concentración de zeocina de 100 microgramos por mililitro. (Círculo de color rojo).

Los resultados de la expresión de GFP en las colonias transformadas evaluadas, mostraron un poco de fluorescencia en las colonias sobrevivientes a la zeocina, indicando un resultado positivo en la transferencia del gen a la célula.

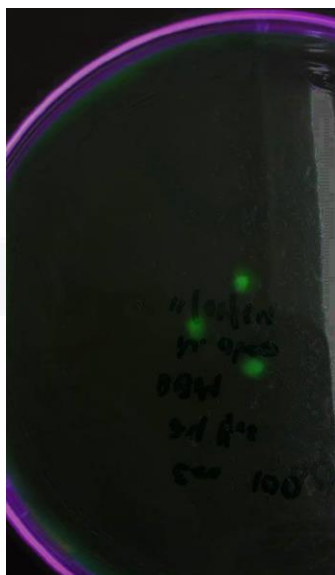


Figura 10. Detección de fluorescencia en las colonias transformadas. Se utilizó una luz negra de una longitud de onda de 305 nm con la cual las colonias transformadas obtuvieron un color verde brillante.

6. DISCUSIONES:

El desarrollo de la ingeniería genética y su aplicación a la biología vegetal han contribuido al crecimiento de la industria biotecnológica. Sin embargo, estas aplicaciones están siendo recientemente utilizadas en las microalgas, evaluando una treintena de especies de microalgas usando diferentes tipos de transformación y obteniendo diferentes niveles de éxito.

Por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, la transferencia de T-ADN es un proceso regulado y tiene éxito dependiendo de diferentes factores tanto bacterianos como del material a transferir (Valderrama, 2005). La infección tiene diferentes factores como las condiciones fisicoquímicas, el tiempo de contacto del cocultivo o la presencia de Acetositingona. (Ramírez, 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El método de transformación mediante choque térmico de células competentes con cationes divalentes es muy rutinario dada la facilidad de realización del mismo y la no necesidad de utilizar aparatos sofisticados, a diferencia de la electroporación o la biolística. No obstante la eficiencia del mismo puede resultar baja, según la especie (Inohue, et al, 1990)

Por medio de la electroporación, la transferencia de ADN se produce por la formación de poros en la membrana de la microalga, existiendo diferentes factores que alteran el resultado final, como el tipo de medio donde se realiza el experimento, el tiempo del choque eléctrico y la intensidad del campo a utilizar.

En el caso de las microalgas, su pared celular es significativamente mayor al de las bacterias, por lo que para encontrar su punto óptimo donde se trabajara, se han de realizar varias pruebas con diferentes variables de intensidad de campo y pulsos. Se han reportado varios trabajos de transformación por electroporación donde se han utilizado equipos cuya fuerza de campo rondaba los 700 y 1000 V, con un número de pulsos regulado entre 1 y 3. Sin embargo lo diferente del presente trabajo con estos reportados es el tiempo de los pulsos utilizados. En los trabajos anteriores?, se han utilizado tiempos de entre 100 y 500 ms, sin embargo los pulsos utilizados para este trabajo fueron de entre 100 y 500 μ s. Estos cambios del tiempo pueden acarrear diferentes resultados en la comparación de los resultados. Estos cambios son debidos principalmente a los diferentes equipos más actuales utilizados. Los equipos actuales de electroporación ya están optimizados para el uso de una gran variedad de microorganismos, sin embargo aún no están registrados por la marca del equipo los valores óptimos para las diferentes especies, como en este caso, *N. oleoabundans*, por lo que nuestros resultados sirvieron para también ayudar a esa base de datos para el equipo. Entonces un decremento en el tiempo del pulso puede resultar en variaciones de transformación, esto debido a que quizás no sea para unas células suficiente para abrir la membrana y permitir entrar el ADN exógeno.

Por otra parte, la fuerza de campo es usada para abrir poros en la membrana celular. Los valores tomados por nosotros son los que anteriores trabajos de investigación han utilizado (Cuales son estos valores) y han resultado ser los más adecuados al momento de

transformar *N. oleoabundans*, al igual que el número de pulsos usados para aumentar la eficiencia de transformación.

En caso de trabajar con otras especies de microalgas, utilizando equipos de electroporación con similares características, se podría tener una aproximación a los valores a utilizar tomando como referencia los resultados obtenidos, para de esta forma estar más cerca de los valores óptimos de diferentes especies.

En este trabajo se pretendió además ver que método es más accesible para la transformación de la microalga *Neochloris oleoabundans*, teniendo en cuenta los factores indispensables para la transformación y trabajos anteriormente realizados con microalgas similares a la trabajada. Para un efecto de mayor virulencia con *A. tumefaciens*, se adiciono acetosiringona, aunque en muchos sistemas vegetales no es indispensable debido a que estas células liberan compuestos fenólicos. (Elvin, 2000).

Muchos de los trabajos que involucran la transformación mediada por *A. tumefaciens* se desarrollan en condiciones de oscuridad, aunque se ha demostrado que el efecto de la irradiación sobre la infección incrementa sustancialmente la transformación de la microalga (Ikarán, 2010), por lo que se ha trabajado pensando en la irradiación continua de luz para aumentar la transformación. Esto debido a que los procesos de infección se ven modificados por la luz, ya que esta altera los niveles hormonales y de otros compuestos químicos.

En los experimentos realizados, todo el tiempo de infección se llevó a cabo en condiciones de 24 horas luz, de esta manera se pensaba maximizar la cantidad de microalgas transformadas con una gran eficiencia. Del mismo modo, las condiciones al mantenerse constantes se esperaba que *N. oleoabundans* sobreviviera lo suficiente para obtener sus nutrientes del medio BBM, y generar suficiente fuerza para crecer.

Después de 7 días del cultivo en los medios adicionados con 100 µg de zeocina, con un periodo de infección de 24 horas luz, se presentó crecimiento de colonias, por lo que la inserción del ADN exógeno dentro de la célula fue satisfactoria, mas sin embargo el tiempo en que la microalga sobrevivió a dicho evento no fue satisfactorio. Los experimentos

fueron realizados por triplicado, esto con la finalidad de eliminar causas externas variables que se presenten.

En estos casos la viabilidad de *N. oleoabundans* fue demasiado baja, esto se debe quizá a la inclusión del ADN exógeno, que no fue muy compatible para esta especie de microalga. Mas sin embargo en los resultados, se vio que aunque no fuera compatible, hubo expresión en una baja cantidad de microalgas transformadas, lo que podría significar que los métodos realizados estaban siguiendo el curso correcto de la transformación, y esto con futuros experimentos y ADN exógenos que sean compatibles con las diferentes especies de microalgas se podrían tener mejores y optimizados resultados de transformación.

Lo que se desea enfatizar es que probando diferentes métodos de transformación genética para una microalga con potencial industrial, no solo para una única especie a nivel laboratorio, y que adicionalmente obteniendo el óptimo resultado de los métodos comparados, se pueden utilizar las condiciones establecidas para introducir en la microalga cualquier gen de interés. Dicho lo anterior, el potencial de las microalgas ha sido estudiado con anterioridad, particularmente el contenido oleoso de *N. oleoabundans*, situándose con un 34% de contenido de aceites, y con una productividad alta, por lo que es una de las mejores especies para trabajar a nivel industrial como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. comparación entre el contenido de lípidos y la productividad. *Sanchez et al (2008), **Lui et al (2010)

Especie	Lípidos totales(% peso seco)	Productividad (mg/L.d)
<i>Neochloris oleoabundans</i> *	34	133
<i>Scenedesmus almeriensis</i> **	12	144
<i>Chlorella emersonii</i> *	63	50
<i>Chlorella vulgaris</i> *	38	54
<i>Nannochloris sp</i> *	30	77
<i>Pavlova lutheri</i> *	36	50
<i>Pavlova salina</i> *	31	49

CONCLUSIONES

Con los experimentos realizados se puede llegar a varias conclusiones:

Primeramente se pudo realizar la transformación de *N. oleoabundans*, utilizando los métodos de transformación por electroporación y utilizando *A. tumefaciens* como medio de transferencia genética.

Se compararon el número de colonias transformantes obtenidas a partir de la transformación, siendo más viable el uso de *A. tumefaciens* que la electroporación.

La eficiencia de transformación de *N. oleoabundans* en el método usando electroporación fue más baja en comparación con el método que utilizó *A. tumefaciens*, esto debido a que la electroporación es un método más destructivo a nivel celular por los choques eléctricos, teniendo una eficiencia de transformación del 1.3% y 3.33% con *A. tumefaciens*.

Hubo una poca compatibilidad del ADN exógeno con la microalga *N. oleoabundans*. Aun así se llevó a cabo la transformación de esta con una eficiencia menor al 5%.

Se espera que al utilizar un ADN exógeno más compatible con *N. oleoabundans*, se obtendría una mayor eficiencia y supervivencia de células transformadas.

GLOSARIO.

Absorbancia

Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo traslúcido, una parte de esta luz es absorbida por el cuerpo, y el haz de luz restante atraviesa dicho cuerpo. Es la energía absorbida o retenida por un cuerpo.

Agrobacterium tumefaciens

Es una proteobacteria alpha de la familia Rhizobiaceae, la cual también incluye a las fijadoras de nitrógeno que viven en simbiosis con las legumbres. A diferencia de éstas, *Agrobacterium* es un parásito y causa grave daño a la planta afectada. La capacidad de transmisión de ADN por el *Agrobacterium* está siendo extensamente explotada en biotecnología, como medio de insertar genes foráneos dentro de las plantas y desarrollar organismos modificados genéticamente.

Biobalística

Técnica de transformación genética en la cual se emplean partículas metálicas microscópicas (0.4 a 2.0 μm de diámetro) de oro o tungsteno cubiertas con el material genético y que son impulsadas a alta velocidad sobre un tejido blanco para permitir que dicho material sea liberado en el interior de la célula. Estas partículas son aceleradas mediante macrocarreadores de polietileno o de nylon (cilíndricos o de disco), que a su vez, son impulsadas por la onda de choque causada por un gas (helio el más usado) a alta presión.

Biotecnología vegetal

Puede ser vista como un término impreciso, ya que el aprovechamiento de cualquier proceso biológico podría ser llamado justificadamente biotecnología. Sin embargo, la revolución en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos de la vida, en particular, nuestra comprensión del ADN, ha resultado en el potencial para manipular esos mecanismos para nuestros

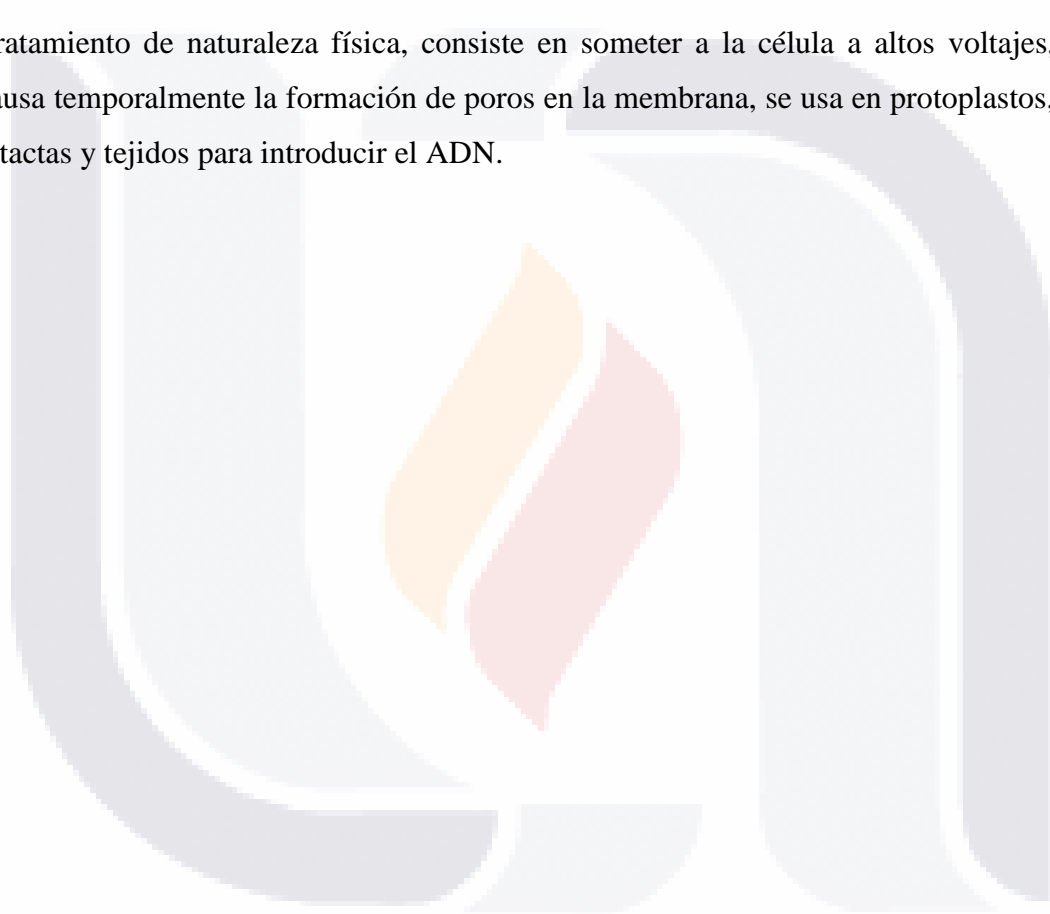
requerimientos. Esta capacidad y conocimiento nuevo es vagamente denominado biotecnología.

Exógeno

Que es debido a causas externas al propio organismo, que se origina por causas externas.

Transformación por Electroporación.

Tratamiento de naturaleza física, consiste en someter a la célula a altos voltajes, lo que causa temporalmente la formación de poros en la membrana, se usa en protoplastos, células intactas y tejidos para introducir el ADN.



BIBLIOGRAFÍA:

Alvarez Cobelas , M. y T. Gallardo. 1989. Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas. Bot. Complutensis 15: 9-60.

García Olmedo, F. (1999), la tercera revolución verde, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid.

Franziska H., A. S. Bozarth, N. Lindenkamp, A. Klingl, S. Zauner, U. Linne, A. Steinbüchel y U. G. Maier, (2011), Microalgae as bioreactors for bioplastic production Hempel et al. Microbial Cell Factories, 10:81

Garduño-Solórzano G., Rodríguez-Palacio M.C., Martínez-García M. (2011). Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz Rev. Latinoam Biotecnol Amb Algal 2(2):6780

Geert, J. de K., Paweena P, (2008), Protection of in-vitro grown Arabidopsis seedlings against abiotic stresses, Plant Cell Tiss Organ Cult 95:149–154, DOI 10.1007/s11240-008-9426-5

Gelvin, S.B. (2000) Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:223-256.

Gómez Luna L.M.,(2007), Microalgas: Aspectos ecologicos y biotecnologicos, revista cubana de química, Vol. XIX, N° 2

Griesbeck C., Kirchmayr A.,(2012), Algae: An Alternative to the Higher Plant System in Gene Farming, Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects pp 125-143

Guedes, C. y Malcata, X. (2010). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental,

Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, Oeiras Portugal ref. SFRH/BPD/72777/2010

Hallmann A., (2007), Algal Transgenics and Biotechnology, Transgenic Plant Journal 1(1), 81-9

Hodson de Jaramillo, E, (2005) Transformacion genética de plantas para resistencia a virus. Rev. Acad. Colomb. Cienc, 29(110):5-24,2005, ISSN: 0370-3908

Ikaran Z. Z., (2010), Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* S.Chantanachat & H.C. Bold (Clorofita) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, Departamento de producción agraria, UPNA.

Inohue H, Nojima H, Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96:23-28.

• Kai L, Armin H, (2009), Stable nuclear transformation of *Gonium pectoral*, 2009, BMC Biotechnology, 9:64 doi:10.1186/1472-6750-9-64

Liu, Q., Siloto, R.M., Lehner, R., Stone, S.J., Weselake, R.J.,(2012). Acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. Prog. Lipid Res. 51: 350-377.

Loera-Quezada M.M., Angeles, G., Olguín, E.J., (2011), Efecto de la intensidad luminosa sobre la densidad, tamaño celular y acumulación de lípidos en *Neochloris oleoabundans*. 2011. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 2(2):81-92

Nichols, H. W. y Bold, H. C., (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. Et sp. Nov. J. Phycol. 1: 34-8.

Nicole P. y N. Kroger, (2005), Control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette FEBS Journal 272, 3413-3423

Potvin G., Zisheng Z.,(2010), Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review, Biotechnology Advances 28, 910-918.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Pruvost J., , G. Van Vooren, G. Cogne, J. Legrand ,(2009), Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in Photobioreactor, Bioresource Technology 100, 5988–5995

Pulz O., Gross W. (2004), Valuable products from biotechnology of microalgae, Appl Microbiol Biotechnol, 65: 635–648, DOI 10.1007/s00253004-1647-x

Radakovits R, Jinkerson, R. E., Darzins A., Posewitz M. C., (2010), Biofuels from Eukaryotic Microalgae, Eukaryotic Cell doi:10.1128/EC.00364-09

Ramírez, H., Lentini, Z., Vallejo Cabrera, F.A. (2009) Evaluación y selección de un protocolo vía *Agrobacterium* para la incorporación de resistencia al cogollero en la variedad de tomate Unapal-Arreboles. Acta Agron (Palmira) 58: 61-68.

Saei, A.A., Ghanbari, P., Barzegari, A., (2012), Haematococcus as a promising cell factory to produce recombinant pharmaceutical proteins, Mol Biol Rep (2012) 39:9931–9939

Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Acién, F.G., Rueda, A., . Pérezparra, J. . MOLINA, E., (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*., Process Biochem. 43: 398-405

Segretín, M. E., Wirth, S. A., Bravo, F, (2004) , Transformacion de Cloroplastos, Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria , p. 358-370

Shimogawara K, Shoko F., Arthur G. y Hideaki U.,(1997) , High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation, Genetics Society of America, Genetics 148: 1821–1828

Valderrama, A.M., Arango, R. and Afanador, L. (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. Rev Fac Nal Agr Medellin 58:2569-2585.

Yu, W.L., Ansari, W., Schoepp, N.G., Hannon, M.J., Mayfield, S.P., y Burkart, M.D.,
(2011) Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol
production in microalgae, *Microbial Cell Factories* 2011, 10:91



ANEXOS

Anexo A. Secuencia completa y modelo del vector pPha-DUAL-[2xNR].

Shuttle vector pPha-DUAL-[2xNR], complete sequence

GenBank: JN180664.1

LOCUS JN180664 4635 bp DNA circular SYN 23-NOV-2011

DEFINITION Shuttle vector pPha-DUAL-[2xNR], complete sequence.

ACCESSION JN180664

VERSION JN180664.1 GI:357535419

SOURCE Shuttle vector pPha-DUAL-[2xNR]

ORGANISM [Shuttle vector pPha-DUAL-\[2xNR\]](#)

other sequences; artificial sequences; vectors.

REFERENCE 1(bases 1 to 4635)

AUTHORS Zauner,S. and Hempel,F.

TITLE Inducible shuttle vector

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2(bases 1 to 4635)

AUTHORS Zauner,S. and Hempel,F.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-JUN-2011) Cell Biology, Philipps-University

Marburg,Karl-von-Frisch Str. 8, Marburg 35032, Germany

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4635

/organism="Shuttle vector pPha-DUAL-[2xNR]"

/mol_type="other DNA"

/db_xref="taxon:[1114287](#)"

[promoter](#) 36..451

/note="nitrate reductase;derived from Phaeodactylum tricornutum"

[misc_feature](#) 452..472

/note="multiple cloning site"

[terminator](#) 473..737

/note="nitrate reductase; derived from Phaeodactylum tricornutum"

[promoter](#) 782..1197

/note="nitrate reductase; derived from Phaeodactylum tricornutum"

[misc_feature](#) 1198..1272

/note="multiple cloning site"

terminator 1273..1537

/note="nitrate reductase; derived from Phaeodactylum tricornutum"

promoter 1546..1731

/note="fcpB; derived from Phaeodactylum tricornutum"

CDS 1732..2106

/note="ble"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="zeocin resistance protein"

/protein_id="[AET83764.1](#)"

/db_xref="GI:357535420"

/translation="MAKLTSAPVLTARDVAGAVEFWTDRLGFSRDFVEDDFAGVVRD
DVTLFISAVQDQVVPDNTLAWVWVRGLDELYAEWSEVVSTNFRDASGPAMTEIG
EQPW
GREFALRDPAGNCVHFVAEEQD"

terminator 2107..2348

/note="fcpA"

CDS complement(3393..4253)

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="beta-lactamase"

/protein_id="[AET83765.1](#)"

/db_xref="GI:357535421"

/translation="MSIQHFRVALIPFFAAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGY
IELDLNSGKILESFRPEERFPMMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLV
E
YSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHNMGDHV
TRL
DRWEPELNEAIPNDERDITMPVAMATTLRKLTTGELLTLASRQQLIDWMEADKVA
GPL
LRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQI
A
EIGASLIKHW"

ORIGIN

1 catatgggca ctagaaggaa ggaagcaaag acgaacggaa gtgactgtaa acgagaagtg
61 cacgaagcct ttcttgtga cgtcacaac cgaacagecc tacgtggcgt ggcacttcc

121 ggcactttgg atategttgc cctatatgta ttgggtgtat acatgtcgtta ttccaactac
 181 gacagaaaac agtcagttac gggatttcga acttccggca cctgcagcga ggagttttgt
 241 gtccgtcgca catcctcctg gctttcggca cctacgtagg cggcaaactt cctgccttcc
 301 gcccgccttg cggcattccg gctccgggccc agaattgccc ggggtgttcac aattttgect
 361 cctcacgaaa aaacgttcta ctttgtatit ttgtcgggtt tggatcctt ccageaacca
 421 ttctcattca aagtcaccac ttgtgcgaac gactagtgcg gccgccccgc ggaatttact
 481 ttaagactag cgcaatitit ttcttacatt agatgaacat aaaacgacga tgaggatcac
 541 tgttagggaa acgatgaact acgctgagga ctctctatta ttctcttctt gatggcgtgg
 601 ttgttctttg gtttgcggtc gacgcgaacg accaaggcct gtacccaaaa cgaagtgtgat
 661 aatcagatat ttgagttgta acaagaaaact aaagcattat tttagcagta gcacgaatca
 721 ggatctaaaa tgaacgcaat tgcattggtt atgtctaagc tgcgttagaa cttagcatat
 781 gcggaagtga ctgtaaacga gaagtgcacg aagccttttc ttgtgacgtc acaaccgaa
 841 cagccctacg tggcgtgcga ctttccggca ctttggatat cgttgcctta tatgtattgg
 901 gtgtatacat gtcgtattcc aactacgaca gaaaacagtc agttacgggt attcgaactt
 961 ccggcacctg cagcgaggag ttttgtgtcc gtcgcacatc ctccgtgctt tgggcacctt
 1021 cgtaggcggc aaacttctg ccttccgccc gccttgcggc attccggctc cgggccagaa
 1081 ttgcccgggt gttcacaatt ttgcctctc acgaaaaaac gttctacttt gtattttggt
 1141 cgggtttcgg atccttccag caaccattct cattcaaagt caccacttgt gcgaaccgaa
 1201 ttcgatataca tcgactaatt cgagctcggg acccggggat cctctagagt cgacctgcag
 1261 gcatgcaagc ttcaatttac tttaagacta gcgcaatitit ttcttacctat tagatgaaca
 1321 taaaacgacg atgaggatca ctgttaggga aacgatgaac tacgctgagg acttctatt
 1381 attcgtcctt tgatggcgtg gttgttctt gggttgcggc cgagcgcgaac gaccaaggcc
 1441 tgtacccaaa acgaagtga taatcagata tttgagttgt aacaagaaac taaagcatta
 1501 ttttagcagt agcacggatc aggatctaaa atgaacgcat ccggagagat tcaaaattca
 1561 atctgtttgg acctggataa gacacaagag cgacatcctg acatgaacgc cgtaaacagc
 1621 aatcctggt tgaacacgta tcttttggg ggcctccgct acgacgctcg ctccagctgg
 1681 ggttctctta ctatacacag cgcgcatatt tcaagggttc cagatgtcaa gatggccaag
 1741 ttgaccagtg ccgttccggt gctcaccgcg cgcgacgctg ccggagcggg cgagttctgg
 1801 accgaccggc tgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcccgcg tgtggtccgg
 1861 gacgacgtga cctgttctat cagcgcggtc caggaccagg ttgtgccgga caacacctg
 1921 gcctgggtgt ggggtgcgcg cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc
 1981 acgaacttcc gggacgcctc cgggccggcc atgaccgaga tggcgagca gccgtggggg
 2041 cgggagttcg cctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttctggtg cgaggagcag
 2101 gactgaacct tcttaaaaa tttaatttct attagttgca gtcactccgc ttggtttca
 2161 cagtcaggaa taacactagc tcgtcttctac catggatgcc aatctcgcct attcatggtg
 2221 tataaaagt caacatccaa agctagaact tttggaaaga gaaagaatat ccgaataggg
 2281 cacggcgtgc cgtattgttg gagtggacta gcagaaaagt aggaaggcac aggatgagtt
 2341 ttctcgaggc cggctctcct atagtgagtc gtattaattt cgataagcca ggttaacctg
 2401 cattaatgaa tcggccaacg cgcgggggaga ggcgggttgc gtattgggcg ctcttccgct
 2461 tctctgctca ctgactcgtt gcgctcggtc gttccgctgc ggcgagcggg atcagctcac

2521 tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga
 2581 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gttttccat
 2641 aggctcggcc ccctgacga gcatcaaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac
 2701 cggacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctctgt gcgctctct
 2761 gtccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcttcc cccctcggg aagegtggcg
 2821 cttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgctc ctccaagctg
 2881 ggctgtgtgc acgaaccccc cgctcagccc gaccgctgcg cttatccgg taactatcgt
 2941 cttgagtcca acccgtaag acacgacta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg
 3001 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac
 3061 ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt tacctcggga
 3121 aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggtttttt
 3181 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt
 3241 tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga
 3301 ttatcaaaaa ggatcttacc ctgatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc
 3361 taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct
 3421 atctcagcga tctgtctatt tegtcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata
 3481 actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca
 3541 cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga
 3601 agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgccc ggaagctaga
 3661 gtaagtagtt cggcagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg
 3721 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga
 3781 gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggctc tccgatcgtt
 3841 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct
 3901 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtact aaccaagtca
 3961 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttccc cggcgtcaat acgggataat
 4021 accgcgccac atagcagaac ttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga
 4081 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tegtgcacc
 4141 aactgatctt cagcatcttt tactttacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg
 4201 caaatgccg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaatact catactctc
 4261 cttttcaat attattgaag catttatcag gggtattgtc tcatgagcgg atacatatt
 4321 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgca cattccccg aaaagtcca
 4381 cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcag
 4441 aggccttcc gtctcgcgcg ttccggtgat gacgggtgaa acctctgaca catgcagctc
 4501 ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc
 4561 gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggttaact atgcggcacc agagcagatt
 4621 gtactgagag tgcac

