

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE LA
MICROALGA *Chlorella vulgaris* CON EL PLÁSMIDO p1335S-Bif PARA
TOLERANCIA A LA SALINIDAD”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Abril Ivett Priscilla Gómez Guzmán

DIRECTOR

Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante

CODIRECTOR

Dra. Gisela Montero Alpírez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Mexicali, B. C.

Noviembre del 2013

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie
(1867-1934)

Dedico esta tesis a lo más importante de mi vida, mi Familia. Mamá y Papá gracias por ser mi fuente de inspiración y de motivación para ser mejor persona, saben que sin ustedes yo no sería lo que soy ahora.

En la vida siempre hay obstáculos, los cuales siempre me ayudan a superar. Saben que con su apoyo y cariño hacen de mí la hija más feliz del mundo. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mamá, Papá, por su gran apoyo en este trayecto, me han llenado de alegría, fe, confianza, amor, sorpresas y demás cosas que han hecho de mi vida algo extraordinario, los quiero, que privilegio ser su hija.

Hermano, gracias por siempre cuidarme y aconsejarme, que orgullo ser tu hermana.

A mi abuelo, gracias por todo el apoyo y confianza, aunque no estés aquí, se que estas muy orgulloso de mi, Abuela, por el cariño que me brindas cada día. Toda mi vida está impregnada de bellos momentos a su lado, gracias por tantas enseñanzas de vida.

Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante, por guiarme en este proyecto, compartiéndome conocimientos y experiencias, fomentando en mí el entusiasmo por la investigación. Gracias por darme tu amistad.

Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por sus grandes enseñanzas y por trasmitirme sus conocimientos, por su ayuda y paciencia, por abrirme las puertas de su laboratorio.

Dr. Augusto Ramírez Trujillo y M en C. Nancy Hernández Bueno, gracias por toda su ayuda, sin ustedes esto no se hubiera logrado.

A mis sinodales, por sus recomendaciones y apoyo otorgado en la presentación de la tesis.

A mi compañero y amigo Tonathiu, gracias por todos esos momentos de complicidad y apoyo en el laboratorio, sabes que te aprecio mucho.

A mis compañeros del laboratorio de metabolismo microbiano y de el laboratorio de fisiología molecular de plantas; Daniel, Tonathiu, Pamela, Claudia, Omar, Dani, Jorgito, Karen, Cristina, Nancy, Ceci, Gloria, Olga, por compartir grandes momentos de alegría y complicidad.

A mis amigos Ory, Tania y Jesús, gracias por ofrecerme su amistad y tantos momentos de diversión, chicos son de lo mejor.

A todos mis grandes amigos, por hacer de este momento el mejor.

A Conacyt, por el apoyo brindado para esta estancia

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
I. INTRODUCCIÓN	4
II. OBJETIVOS GENERALES	5
III. HIPOTESIS	6
IV. ANTECEDENTES	7
4.1 Microalgas	13
4.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	14
4.2.1 Genoma de <i>Chlorella vulgaris</i>	18
4.3 Usos de la biotecnología	21
4.4. Inmovilización de microorganismos	22
4.5 Trehalosa	24
4.6. Transformación de microalgas	28
4.7 Métodos de transformación	30
4.7.1 Agitación con esferas de cristal	30
4.7.2 Electroporación	30
4.7.3 Bombardeo con micropartículas	31
4.7.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.8 Transformación de <i>Chlorella vulgaris</i>	33
V. MÉTODOS	35
5.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	35
5.2 Extracción y cuantificación de DNA	35
5.3 Purificación de DNA plasmídico	36

5.4 Transformación genética de <i>Chlorella vulgaris</i> por electroporación	37
5.5 Transformación genética de <i>Chlorella vulgaris</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
5.6 Verificación de la correcta inserción del plásmido en <i>Chlorella vulgaris</i>	40
5.7 Inmovilización de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335s-Bif	44
5.8 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335s-Bif y <i>Chlorella vulgaris wild type</i>	45
5.9 Determinación de pigmentos por espectrofotometría	45
VI. RESULTADOS	47
6.1 Identificación molecular de <i>Chlorella vulgaris</i>	47
6.2 Verificación de integridad de DNA plasmidico p135SBif y cuantificación	48
6.3 Verificación de integridad de DNA heterologo en <i>Chlorella Vulgaris</i> Bif	49
6.4 Transformación por electroporación	50
6.5 Transformación por <i>agrobacterium tumefaciens</i>	52
6.6 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris p1335S: Bif</i> en medio salino	60
6.7 Medición de clorofila y carotenoides en <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	61
VII. DISCUCIÓN DE RESULTADOS	62
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. PERSPECTIVAS	65
X. BIBLIOGRAFÍA	66
XI. APÉNDICES	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Chlorella vulgaris</i>	16
Figura 2. Mapa del genoma de <i>Chlorella vulgaris</i>	20
Figura 3. Metabolismo de Trehalosa. Rutas de trehalosa para la síntesis de la vía (TPS-TPP)descrito en plantas	26
Figura 4. Mapa del Plásmido p1335SBif	39
Figura 5. Producto de extracción de DNA genómico de <i>Chlorella vulgaris</i> en un gel de agarosa al 1%	47
Figura 6. Verificación de la extracción del DNA plasmidico p1335SBif en un gel de agarosa al 1%	48
Figura 7. Verificación de la extracción de DNA de la microalga modificada	49
Figura 8. Primera prueba de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% para verificar la inserción del plásmido en la microalga	50
Figura 9. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1% con los oligos de 35S con DNA de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	51
Figura 10. Producto de PCR tiempo final con oligonucleótidos TPPS-II en un gel de agarosa 1%	52
Figura 11. Extracción de DNA genómico de diferentes cepas de <i>Chlorella vulgaris</i> transgénica en un gel de agarosa a el 1%	53
Figura 12. Producto de PCR punto final de DNA plasmídico de diferentes cepas de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif con oligonucleótidos de 35S	54
Figura 13. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1% para el borde TPPS-II de DNA genómico de <i>chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	55
Figura 14. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% para el borde NTP-II de DNA genómico de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	56

Figura 15. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1% para el borde NTP-II de DNA genómico de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	56
Figura 16. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% con oligos de kanamicina en DNA genómico de <i>Chlorella vulgaris</i> p1335S-Bif	57
Figura 17. Cepas de <i>Chlorella vulgaris</i> -p1335SBif en medio Bold con hygromicina B como marcador de selección	59
Figura 18. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> p133S-Bif 2.21 en concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de nutrientes de <i>Chlorella vulgaris</i>	17
Tabla 2. Mezcla de la PCR punto final para verificar la síntesis de DNA fuera la correcta	40
Tabla 3. Condiciones de PCR punto final utilizada para la verificación del gen 35S en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen	41
Tabla 4. Condiciones de PCR punto final para la verificación del gen TPPS-II en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen	42
Tabla 5. Condiciones de PCR punto final para la verificación del gen NTP-II en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen	43
Tabla 6. Pares de bases correspondientes a los productos de PCR tiempo real	44
Tabla 7. Contenido de clorofila y carotenoides	61

RESUMEN

Este proyecto se realizó con la finalidad de modificar con diferentes técnicas moleculares *Chlorella vulgaris* con el plásmido p1335S-BIF para que esta pueda expresar y acumular trehalosa confiriéndole así a *Chlorella vulgaris* Bif la capacidad para sobrevivir a diferentes tipos de stress sin que su crecimiento y desarrollo se vea afectado.

La transformación se realizó con dos técnicas: Electroporación y *Agrobacterium tumefaciens*, los resultados obtenidos indicaron que la transformación por *Agrobacterium* es la más eficiente, ya que con esta se obtuvo la inclusión completa del plásmido en CV lo que concuerda con la bibliografía citada. La cepa transformada puede crecer en medios salinos de 0 a 250 mM de NaCl y acumular altas concentraciones de clorofila y trehalosa.

ABREVIATURAS

BBM: medio basal bold.

(CaMV)35S : El promotor del virus del coliflor.

CV: *Chlorella vulgaris*.

CV-WT: *Chlorella vulgaris* wild tipe.

CV-NOS: *Chlorella vulgaris* transgénica.

CV-BIF: *Chlorella vulgaris* transgénica.

DNA: El ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: Desoxirribonucleotidos trifosfato.

Gus: β -glucuronidase.

IAA: acido indoloacetico.

Luc: luciferaza.

LB: Luria Bertani.

mM: Milimolar.

mg: miligramos.

OD: Densidad óptica.

Pb: Pares de bases.

PCR: Por sus siglas en ingles de Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena polimerasa.

PCI: mezcla de fenol cloroformo.

RNasa: es una enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

Tm: Del inglés Melting temperature; es la temperatura a la cual el 50% de un oligo se enlaza a la hebra complementaria a la misma concentración.

Trehalosa: (α -D-glucopyranosyl-1, 1- α -D-glucopyranoside).

TPS: trehalosa-6-fosfato sintasa.

TPP: trehalosa-6 fosfato fosfatasa.

Tsl1: TPS subunidad compleja.

TP6: Trehalosa 6 fosfato.

T6P: Trehalosa-6-fosfato.

UDP-Glc: glucosa-6-fosfato.

UV: Luz ultravioleta.

WT: Por sus siglas en inglés; Wild tipe.

μ l: Microlito.

I. INTRODUCCIÓN

Las algas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (Bold *et al.*, 1985); son responsables de la red primaria de producción de 5.5×10^{10} toneladas de carbón orgánico por año (Frield *et al.*, 1998).

Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40 000 especies aunque se estima que existen más de 100 000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Hu *et al.*, 2008). Estos organismos marinos son las fuentes potenciales de metabolitos secundarios. Son reconocidas en la industria química y farmacéutica, pues son consideradas productoras de diversos componentes marinos de alto nivel (Ali *et al.*, 2004).

II. OBJETIVOS GENERALES

Modificar genéticamente la microalga *Chlorella vulgaris* con el plásmido p1335S:BIF para incrementar la tolerancia a la salinidad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar el método de transformación adecuado para la microalga *Chlorella vulgaris* con el plásmido *p1335S:BIF* para conferirle la tolerancia a la salinidad.
- Determinar la acumulación de trehalosa en las microalgas transgénicas.

III. HIPÓTESIS

La modificación de genética de *Chlorella vulgaris* permitirá a la microalga tolerar altas concentraciones de sal debido a la acumulación de trehalosa.

IV. ANTECEDENTES

Las microalgas son organismos clorofitos unicelulares simples integradas por un célula o agrupadas en colonias (Bol dan Wynne, 1985). Se encuentran en todos los ambientes acuáticos de la tierra: ríos, mares y lago, en simbiosis con otros organismos vivos. Son el grupo eucariota más diverso con gran importancia biológica contribuyendo con alrededor del 50 % de la fijación del carbono a nivel global (Richmond, 2003).

Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40000 especies aunque se estima que existen más de 100 000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Hu *et al.*, 2008).

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo, es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico. Recientemente, se ha enfocado la atención en ellas debido a su alto valor químico y farmacéutico debido a las ficobiliproteínas obtenidas de las algas rojas y cianobacterias, agentes anticancerígenos de las cianobacterias, β -carotenos de *Dunaliella*, xantofilas de las algas verdes y diatomeas, ácidos grasos

poliinsaturados (por ejemplo ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico) de las diatomeas y criptofitas, y astaxantinas obtenidas de *Haematococcus* (Chen, 1996; Chen, 2006).

Existe la posibilidad de obtener subproductos (proteínas, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal, resultando factible el empleo de algunos de estos residuos en la alimentación humana o animal y para la producción de biofertilizantes o de biocombustibles (Arredondo *et al.*, 1991). Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección, y entre ellas se encuentran las microalgas de especies diatomeas y clorófitas (Chisti *et al.*, 2007).

El género de microalgas de mayor interés es *Chlorella* ya que tiene una tasa de crecimiento rápida y puede ser conservado criogénicamente con mejor recuperación, lo cual lo hace muy atractiva para estudios genéticos y moleculares (Johnson *et al.*, 1993; Chow *et al.*, 1997; Kiksharova *et al.*, 2002; Viroque *et al.*, 2007). Habita ambientes marinos de agua dulce, es una fuente esencial de aminoácidos, proteínas de alta calidad, ácidos grasos, minerales, clorofila y compuestos bioactivos, además de ser muy popular como producto alimenticio y suplemento (Cherng *et al.*, 2005;

Hasegawa *et al.*, 2000). Se usan en acuicultura como alimento para peces (Lu et al. 2004).

En general las microalgas no transgénicas se usan para producir aditivos de alimentos, cosméticos, pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos y biomasa. Por otro lado, las algas transgénicas prometen mejorar el campo de aplicación como: la producción de proteínas o metabolitos necesarios en la medicina e industria, antígenos, vacunas, proteínas o biohidrógeno (Hallman, 2007). Los métodos de transformación para lograr estos avances son: selección de genes de marcación, genes reporteros y promotores.

Hay diferentes técnicas para transferir genes exógenos en algas unicelulares, tales como la agitación con microesferas de vidrio, la electroporación, el bombardeo con micropartículas y con *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la selección de las transformantes hay dos métodos 1) el rescate de los mutantes auxotróficos (que implica el uso del tipo salvaje homólogo nuclear o de los genes del cloroplasto); 2) selección por la resistencia a los antibióticos/a los herbicidas (que implica el uso de genes heterólogos). La estabilidad de las copias transformadas obtenidas es examinada para confirmar la presencia del DNA exógeno en el genoma microalgal.

En contraste con el gran número de bacterias, levaduras y plantas transformadas genéticamente, solo unas pocas especies de microalgas han sido exitosamente modificadas, por lo que es necesario aumentar el potencial de transformación. La primera microalga reportada que se transformó exitosamente por los métodos directos son *Chlamydomonas reinhardtii* (Kindle, 1990), *Haematococcus* (Steinbrenner *et al.*, 2006) y algunas diatomeas (Dunahay *et al.*, 2008). Desde entonces, se han desarrollado numerosos marcadores de selección, promotores y procedimientos para la inserción eficiente del DNA en la microalga, aumentando así la eficiencia y estabilidad de la transformación de las microalgas transgénicas.

La viabilidad de las microalgas que se modificaran genéticamente expresando genes heterólogos, abren la posibilidad de aumentar la productividad de los compuestos algaceos tradicionales y de producir nuevos productos bioactivos a nivel industrial, aplicaciones farmacéuticas, agropecuario, etc. Además, las microalgas se pueden usar como modelos de hospederos, en casos específicos donde no se puedan expresar genes en levaduras, es decir genes que tengan que ver con la fotosíntesis, las funciones flagelares y la fotorecepción. También se pueden transformar para expresar proteínas, tales como hormonas o anticuerpos, siendo las algas transgénicas perfectas para su crecimiento controlado en biorreactores bajo condiciones controladas. (Rochaix *et al.*, 1998; Harris, 2001).

Una de las razones de interés para trabajar con *Chlorella vulgaris* es que no hay estudios genéticos y moleculares para la transformación genética directa de esta microalga y en consecuencia, es relativamente es difícil identificar y caracterizar los

genes de interés derivados de este organismo (Wang *et al.*, 2007).

En especies de *Chlorella*, el progreso de transformación ha sido significativo, esto se ha hecho en los últimos años, y tienen una serie de informes que demuestran la expresión génica no nativa en *Chlorella* (Arvis *et al.*, 1991).

El paso crítico para la transformación genética es producir el plásmido vector conteniendo los elementos para la expresión de los genes de interés. La construcción del vector involucra la manipulación de los marcadores de selección, expresión que se da en los cassettes para la selección en bacteria o la selección de transferencia de genes en el organismo hospedero. Se han utilizado algunos promotores heterologos que han sido aplicados en las transformaciones genéticas de la plantas y dada su similitud se han aplicado en la transformación de microalgas. El promotor del virus del coliflor (CaMV) 35S y el promotor p1'2' *Agrobacterium tumefaciens* han sido probados para conducir la de la expresión de genes en plantas y por tanto en microalgas (Leon *et al.*, 2007).

Como *Chlorella* es insensible al cloranfenicol y kanamicina, se han usado hygromicina B como un antibiótico efectivo en la selección de las transformantes (Ortiz *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996).

La dificultad de producir transformantes estables ha significado que el campo de microalgas transgénicas todavía está en su infancia, pues no se han podido desarrollar en su totalidad.

4.1 MICROALGAS

Dentro de las microalgas, las diatomeas son probablemente las más diversas con una diversidad de especies que se estima entre 100 000 y 10 000 000 en todos los hábitats (Norton *et al.*, 1996). Dada la alta contribución de las microalgas como atrapadoras o convertidoras de CO₂, pueden mejorar el medio ambiente, por lo que se intensificó su aplicación en el campo de la biotecnología. Las microalgas tienen diversas aplicaciones tales como: alimentación marina, combustible, medicina y en la contaminación de lodos industriales, puesto que son una fuente importante de subproductos de valor industrial tales como vitaminas, carotenoides, polisacáridos y ácidos grasos; además poseen propiedades de fungicida, antiinflamatorio, anticancerígeno y antioxidante (Baz *et al.*, 2002; Abd *et al.*, 2003; Thajuddin *et al.*, 2005).

Debido a la crisis de energía en 1970 se consideró usar la biomasa de microalgas como combustibles y biofertilizantes. Aquellas con elevada producción lipídica son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección. Entre las más utilizadas con estos fines se encuentran las microalgas de los géneros diatomea y clorófitas (Chisti, 2007; Pulz *et al.*, 1998).

4.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris ha estado en la tierra desde el período pre-cámbrico, cerca de 2 500 millones de años. Sin embargo, fue descubierta por un microbiólogo holandés, Martinus W. Beijerinck en 1890. Después de la segunda guerra mundial, las investigaciones y los organismos fueron enviados a América al instituto de investigación en Standford y al instituto Carnegie. En 1951, la fundación Rockefeller en colaboración con el gobierno Japonés apoyaron al Dr. Hiroshi Tamiya en el desarrollo de la tecnología para crecer *Chlorella* y producirla a gran escala y comercializarla. Después del gran éxito del proyecto se obtuvo la atención de los programas espaciales de América y Rusia para estudiar las posibilidades de usar *Chlorella* como suplemento alimenticio para los viajes espaciales. Esto desarrolló las posibilidades de *Chlorella* de ser usada como promotora de salud por los científicos japoneses en 1960 debido al hecho de su alto contenido de vitaminas y minerales junto con otros nutrientes alimenticios. En 1963, el señor Kaminaka introdujo el proceso de secado de *Chlorella* sin disminuir sus nutrientes, el resultado obtenido era prometedor pues su rango de digestibilidad era arriba del 80% comparado con el 47% del proceso en el cual se consumían las células enteras (frescas). (Kumar *et al.*, 2000)

En estos días, *Chlorella* es la alga más estudiada en la historia de la humanidad con muchas publicaciones de institutos médicos, institutos de investigación y

universidades. Hasta ahora en lo que concierne la salud humana no se ha obtenido ningún aspecto negativo en cuanto a este microorganismo. *Chlorella* es el segundo suplemento alimenticio en Japón, cerca del 30% de la población lo consume como un suplemento principal de salud. En algunas décadas se investigó también que combate problemas malignos como: tumores cerebrales, úlceras, colitis, osteoartritis, disminuye el consumo de insulina y otros problemas de salud. (Kumar *et al.*, 2000)

Chlorella vulgaris es del orden de *Chlorococcales* de la familia *Oocytaceae*, del género *Chlorella* (Figura 1). Cada célula es una unidad completa y bien definida con un núcleo distintivo incluido. El ser el más simple, *Chlorella*, forma la primera conexión en la cadena alimentaria de la tierra. Es de color verde, esférica con un diámetro que es entre 1 y 10 μm . El color verde lo obtiene de los cloroplastos que son estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis, esta característica le da el nombre de *Chlorella* al género que significa pequeña verde (Bewicke *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 1987; Steenblock *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 2000).

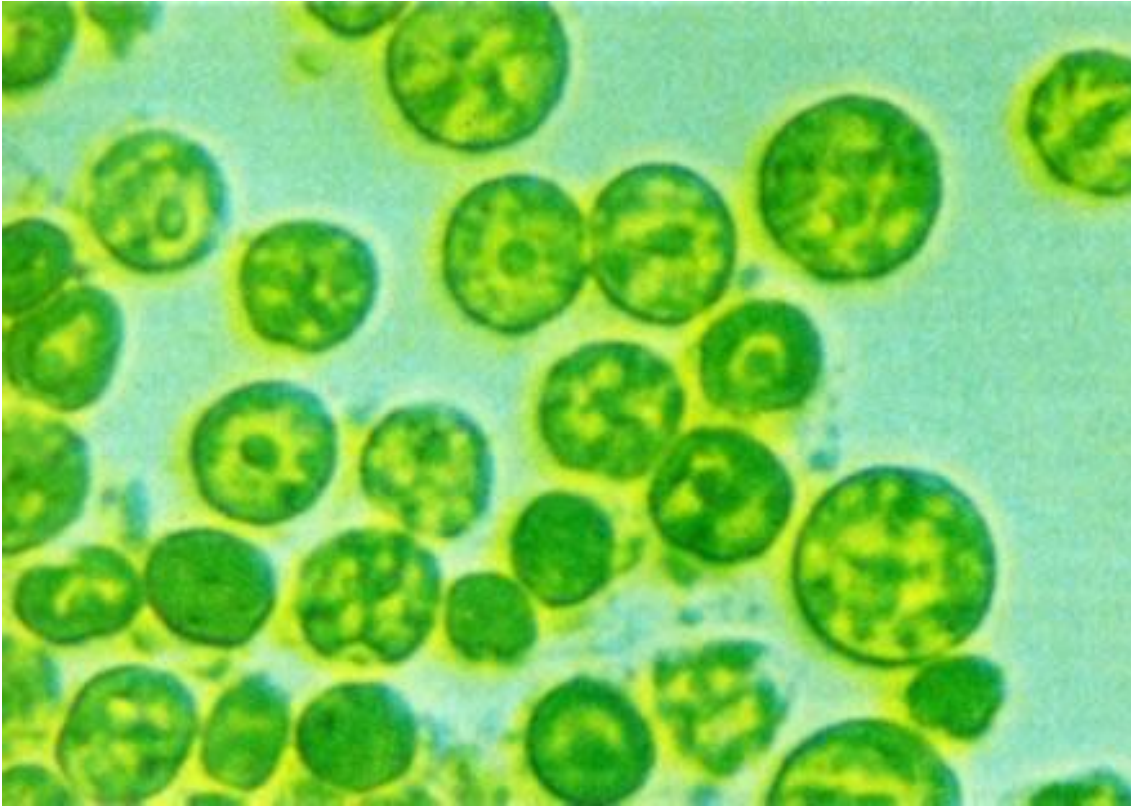


Figura 1. Células de *Chlorella vulgaris* (<http://chlorella.joyau-vert.ch.html>)

Sus características principales son que se reproduce rápidamente y de forma asexual, para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y de la pequeña cantidad de minerales. Contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitaminas B (Tabla 1) (Brown *et al.*, 1989).

**Tabla 1. Contenido de nutrientes de *Chlorella vulgaris*
(Brown *et al.*, 1989; Becker, 1994)**

<i>Chlorella vulgaris</i>	
Composición	Contenido
Proteínas	51 a 58 g
Carbohidratos	12 a 7 g
Lípidos	14 a 22 g

4.2.1 GENOMA DE *Chlorella vulgaris*

ctgcagctgaacgcatggttagttgcaacactgaactatggtgtgtgtgtaagctgcctcaacaacagcaagagtccc
agcgaaaagttttcaatctacctcatcacacagagggatgcccacggcaagggatcgtagtcacatgctggagtct
atcatgcatgccatgcaaccagtggatgagcatatgaataaggatcaagtttgctatatatggcc tatctctgagacg
caatcaggcctttgaaatgtgacatactgaagcgtgtgtaaggcagtcatgtgatgatgggactttatcgcggaacaaa
ttgctgctctgtttccatcactctgcaaaaatttgccaactgcaacaaatgtggacttggaatgcagggtagcatcagca
tacatattatccagaaaatttgagaacatgcttgcaagcagagcaatgtagaagggtgctttcattctctcaaaatgtt
gcatctacacaagtgc aaatgctcaaattaccttgacaggcatgag taatttcacttattctaaagcttcaaaacctgt
gcagatgcaaacgatgctcaacgtatcctgatggtacacaagtatctgggtagcacataaggggtgcgacaggcag
tgtcctagtctctgccgcagtttatttttttttaggagaacccctctattacaggcatgagggtagcgaacttcccaac
acacacataattggatatttagggaaacctgaccgagttggggcacgcaaaacactcccgcagaggatagggcg
atacccaaggaacatcaaagcaatgggaaacggcatggtcacaatggcaatcggtccagacaatcaaggacaa
tcaatcatcgatggaatgtaggaaggtaacaatagggcctaacgcgatgactaagtcgggcagtcataaacgc
ccactggttgcggaagctaattcttcaaagtcagtgacaaagcatggcaagctcatacaacacaccaaccag
cagtgggttgggataggcaggaggtaccatgttctcagtccttagacacccgctcaatatgatcacctgctttgctgtgac
ccctgcctccagctgcaaccctaggcttccccgtgggtcctccaacgtcacctcagcgggtgttgcttgccggcgggct
ggagtgcgcctctggggatgaggttacctctgggtgctgggacatgtccatcgctaggagcctttctgttgctttctgtg
gtatgccttcattgcttgcgcttctttaaagtatcgattatcctcctgcgggagtgctctgcgtgccccaaactctgacaggtt
cccaaatactctattgcatgctgctgggaagcgtgcgactggcacctgtgtaatagcggggggttcccccttttaa
aaaaaaaaaatgatcacacatgagagtcataatgcacaggaacaatgaggaatgcaccggatgacacaatgtg
aggggaaggacacgtgatggacacacttgatgaaatgattctaattgggggttgagacaagaaaacacaggaatct
gctaccaggaccctggggagaatgggcttcattgaatgggtggcagcgtcaaagctctccagcgcgccgggtgaag
aggtgcacaggttgaggggcgacgactgagccgcccagcggggagaacccggtacatgagagccggcgggag

catgtctgtggggcgagggcacaagaactggtggcgagggcagtgccccagaagggaaaactgtggagtacg
tgccggagagctggagcgttggcgcaagcttacagaagaccacctgcccagggcttaggctatcaatagtttcca
gtgatcctccgatgtttctgtctcaccagcagccccaacaatccccgtggctaaccggaactgcgccacatgcccgc
ctacctccaacctcatgtcatccgtggccttctgccttagtgtctgtcctctcaccattcacagtagttcattgaaggcta
tctgaagggttagggttccaaccccagtatccacctgaacctgagcgggtgtctaggacctggacatgatgcctc
ctgcctatccccgcctccaatgtggtgggtgtgtgtatctggtcgagtctcgccagcctacctgttttcgcctcatttgcg
cttcatactcccatatgccaccgtttgctgtgccccacctgtctggcagattgaggcatagtttagggtcacattgccag
ccccgagcggacctagtggtaatgggtccgaacgcgatcctgttccatccctgtcggccaaccgtataaacgtgccttt
catgtctgttccaccactggttggcgcacatccataattgctgccagtattgatgattgcctgcttctgtgtgaccttg
cctccagctgcaagccctaggcttggcccggtgctccaacgtcacctcagcgggtgttgcggtgccggcgggctg
gagtgcgcctctggggatgaggttaccctctggtgctgggacatgtccatcgctaggagcctttctgttgcccttctgtggt
atgccttcatgttgcgcttctttaagtatcgattatcctctgcgggagtgctctgcgtgccccaaactctgacaggttccc
caaatacctattgcatgctgtggaagcgtgcgactggcacctgtgtaatagcgggggcttccccctttaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaagaaaggaaaccccaggggcatgcccggcgtgctctctgggactcccaccggtggtaccgc
gtgactggggggcccccttccgcggtggcagaggatggggacggagacggggaggcacttctgaaaaacaacatg
cttgtcatccccagggctctaactgatccacaggtacacatgggtgaaggcaagccggtctgagccgggggtgggg
gtgtgtcatccggagtgcgtgcctagaactcactgaggacgcctacgggtgccaagcccccgatgtgcaaaaag
gatcactaaacgaggctgttcaatcgggtggaggactcgagcgggtgtcatggcaaaaggccatcaaaaagcatg
gtgtcacaggggttgctggtgaggcccaggcaggcctggttctgaagttga agaatcatgcgggcagcggcac
cgggtgtgtgcgctgcaatggatgacaagctgcgcatcgggcgcccgcgccagtgcgagaggacgtcccgatg
gcaccagcgcgccgtgaactcctcgcgctcagtttcgggtcgcgcccgcgaccagtcgctgggcacgcccgtg
tgttctgacgttgatggttgaagccgccagtcgccgaggatggcttctgctggaggagatgatccgagctgctac
cgcgcccgtgattgcgtgcatccggctggtgccgtgcgtgctgtaggctgccagagctggcagataggtgggc
cagccgggaggcgatgccagagagaggcccagctgggaggccggcctccagggtccgcttggctgctgcaaga

aggaggtctgtgctgctgctggcgggcgggggctctcctgtgatggctgcccaagtggccgcaaaccagtcccatacgg
acgctgccagggggcaggtcatgaggacgtgggtgagcgtggcatcctgatctgtgcagtgaggatgcgggcagc
ggtaggctgtgcatctgctcgatggatgtgccgcgagaaggccccgacgaagagcttcccgtgtag

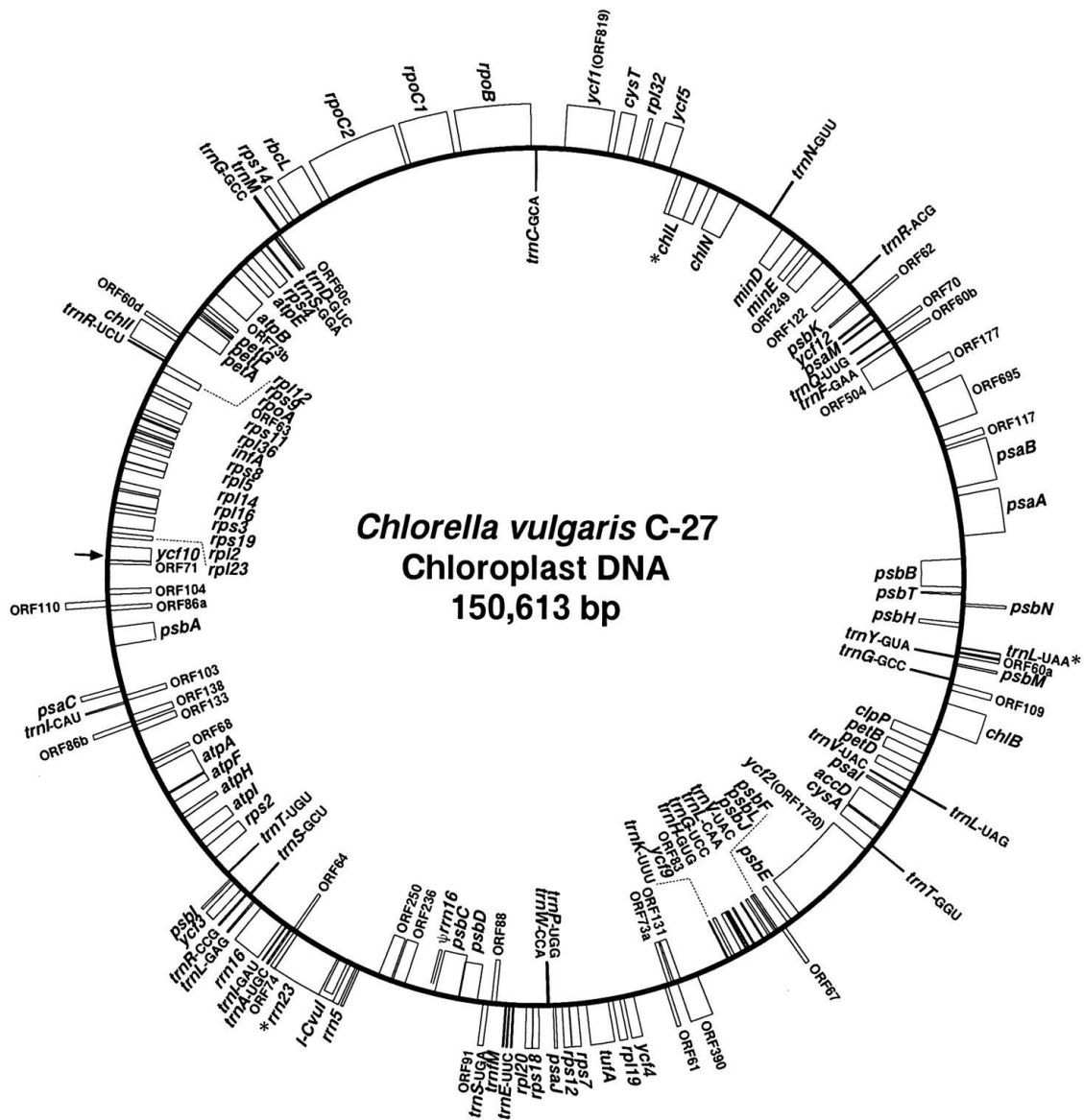


Figura 2. Mapa del genoma de *Chlorella vulgaris* (CNBI, Noutoshi *et al.*, 1998)

4.3 USOS EN LA BIOTECNOLOGIA

Chlorella vulgaris es en esencia un fitoplancton usado como alimento de peces porque tiene un alto contenido de proteínas y ácidos grasos. En adición de un rápido crecimiento y bajo costo de producción, *C. vulgaris* es una candidata prometedora para crecer en un bioreactor de gran escala. Es uno de los microorganismos con mayor potencial y es muy utilizada en varias líneas de investigación en biotecnología al ser una fuente rica de muchos químicos reconocidos a nivel industrial como vitaminas, carotenoides, polisacáridos, ácidos grasos, etc. (El Baz *et al.*, 2002; Thajduddi *et al.*, 2005).

En el área de la agricultura y horticultura, las microalgas han mostrado que estimulan el crecimiento de plantas debido a la presencia de auxinas, citocina, giberelinas y de sustancias relacionadas con los reguladores de crecimiento (Ordog *et al.*, 2004).

Dentro de los metabolitos microalgales la clorofila es muy investigada. Estos son pigmentos naturales de color verde que hay en abundancia, por su sustentabilidad son muy usados como colorantes naturales en la industria de alimenticia (Taylor, 1989; Hendry, 1996). Se sabe que la ingestión de clorofila promueve el crecimiento de tejidos actuando como una sustancia promotora de la multiplicación de fibroblastos, células del tejido conjuntivo, responsable del proceso de cicatrización (Tanaka *et al.*, 1997; Yamagishi *et al.*, 1997).

4.4. INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS

El alginato es el polímero más comúnmente usado para encapsular microorganismos, procedimiento también denominado inmovilización. La cadena polimérica de alginato está compuesta por ácidos manurónico y gulurónico en proporciones variables y arreglos secuenciales. Los monómeros pueden estar ligados por iones de calcio constituyendo bloques consecutivos de ácido gulurónico para formar un gel (McHugh, 2003; Smirnov *et al.*, 1990). El alginato es aislado de algas marinas pardas y es utilizado en forma de sal sódica. Se gelifica por intercambio de iones de sodio con iones de calcio en una solución de cloruro de calcio. El alginato es ampliamente usado en industrias farmacéuticas, textil y en producción de papel, aunque se han encontrado nuevos usos como estabilizador, agente gelificante y formador de biopelículas (Najafpour *et al.*, 2003).

El sistema de inmovilización de células consiste en retener un tipo microorganismo en una matriz de soporte, como tipos de tejidos, microesferas tumorales, células para órganos artificiales, biofilms, placa dental y microorganismos encapsulados para usar en biorreactores. Las células encapsuladas para su uso en biorreactores son esferas que se agregan al biorreactor con medio nutritivo. Estos biorreactores son muy usados para generar antibióticos, etanol o para la degradación de compuestos tóxicos en aguas contaminadas. Con la inmovilización, las células solo obtienen nutrientes por difusión (Ryley *et al.*, 1996), siendo esta una alternativa eficiente para la retención de biomasa, donde las células solo se dividen dentro de la matriz (Senthuran *et al.*, 1997).

La inmovilización de microorganismos atrapados en esferas de alginato es una técnica ampliamente utilizada para células microbianas viables (O'Reilly *et al.*, 1995). Este método es utilizado ampliamente en varios campos biotecnológicos como una forma práctica para producir metabolitos secundarios de valor comercial; también se utiliza como una herramienta en la manipulación genética para inmovilizar bacterias recombinantes ya que mejora la estabilidad de los plásmidos (Romo *et al.*, 1997) y para inmovilizar microalgas con el fin de eliminar de aguas residuales compuestos inorgánicos y metales pesados (Tam *et al.*, 2000). En este último caso, su mayor ventaja reside en el hecho de que facilita significativamente la cosecha de la biomasa de microalgas del agua después del tratamiento (De la Noüe *et al.*, 1998)

4.5 TREHALOSA

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1, 1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor presente en bacterias, levaduras, esporas de hongos, algunas especies de invertebrados y en plantas como *Selaginella lepidophylla* (Crowe *et al.*, 1992). Es un osmoregulador que involucra dos reacciones enzimáticas mediante la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y de trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP), con trehalosa-6-fosfato (T6P) como compuesto intermediario (Cabib *et al.*, 1958).

La trehalosa es conocida por su capacidad para retener agua lo cual mantiene los fluidos de la membrana aún bajo condiciones de sequía (Leslie *et al.*, 1995). Así, este azúcar permite que las plantas desérticas toleren su hábitat natural con sus ciclos de deshidratación y rehidratación (Drennan *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1995). El azúcar es acumulado por los organismos vivos para adaptarse a el estrés como deshidratación, salinidad, congelamiento y calor, puede también servir como una fuente de energía y de carbono (Müller *et al.*, 1999).

Hay al menos 3 diferentes vías para la síntesis de la trehalosa (figura 3) en diferentes microorganismos, lo que implica la formación de T6P a partir UDP-Glc y glucosa-6-fosfato por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS), y el segundo paso es la síntesis de trehalosa por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Cabib *et al.*, 1958).

El metabolismo de trehalosa se ha estudiado en más detalle en *Saccharomyces cerevisiae*. En este microorganismo, la trehalosa es sintetizada por un complejo multi-

enzimático desde trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) que codifica para TPS1, trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) que codifica para TPS2 y dos subunidades reguladoras codificadas para los genes de TSL1 y TPS3. Aunque los últimos genes no juegan un importante rol catalítico comparten la significancia homológica con TPS y TPP (Reinders *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1998). La trehalosa-6-fosfato (T6P) es sintetizada a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato como sustratos para TPS y se desfosforila por medio de la TPP (Cabib *et al.*, 1958; Vandercammen *et al.*, 1989; Londesborough *et al.*, 1993). La cancelación de los genes TPS1 o TPS2 causa una debilitación de la tolerancia al estrés (Mackenzie *et al.*, 1988; De Virgilio *et al.*, 1994).

Adicionalmente en levaduras transgénicas con el gen *tpsΔ* ocurre una disminución en el estrés abiótico en estas, pues no pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono; se ha sugerido que este defecto puede ser debido al papel adicional de la subunidad de TPS en la regulación del flujo de glucosa en la glicólisis (Van Aelst *et al.*, 1993; Theveleind *et al.*, 1995).

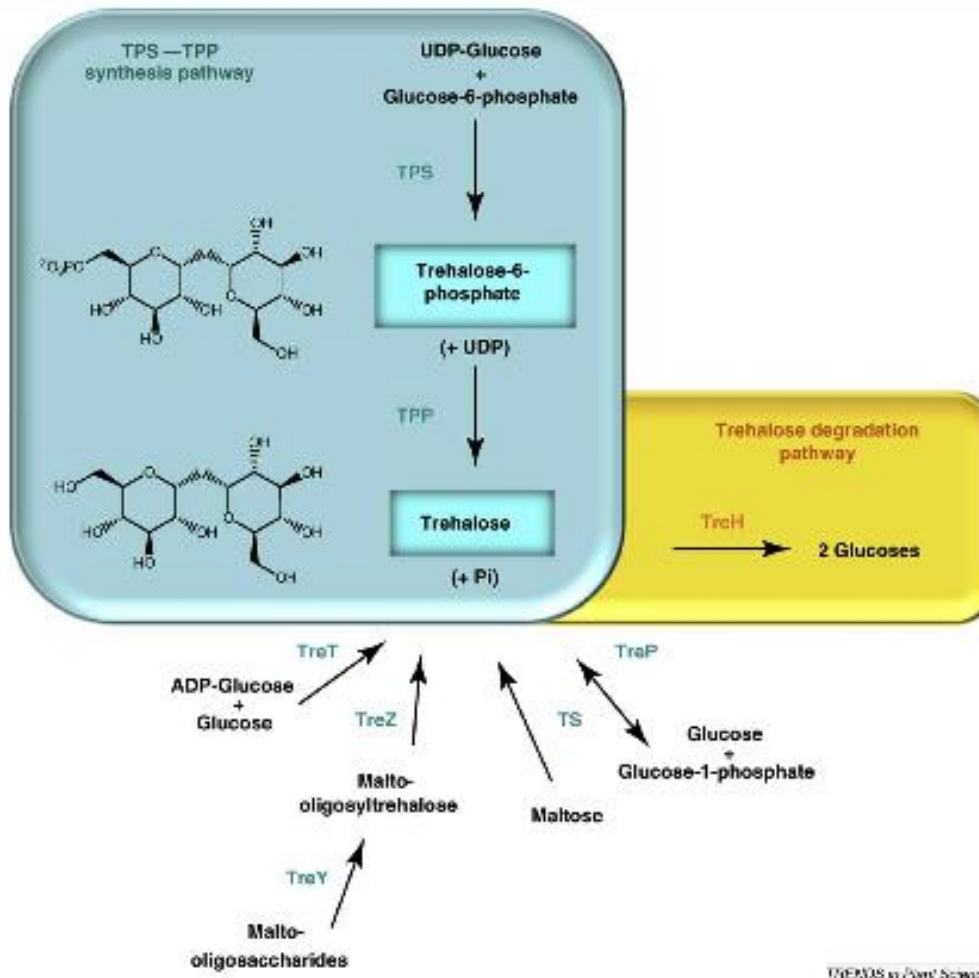


Figura 3. Metabolismo de Trehalosa. Rutas de trehalosa para la síntesis de la vía (TPS-TPP) descrito en plantas (Cuadro azul). Las vías TPS-TPP también se pueden encontrar en organismos eucariotas y procariotas. Las vías para la síntesis de la trehalosa están presentes en otros microorganismos como se muestra debajo del cuadro azul. Las vías para la degradación de trehalosa en plantas se muestra en el cuadro amarillo (Fernández *et al.*, 2010).

En investigaciones recientes acerca de la sobreexpresión del gen TPS1 de levaduras y bacterias plantas, se ha reportado que este mejora la tolerancia al estrés en

cosechas. Por ejemplo, las plantas de tabaco, papa y arroz, tuvieron un incremento en la tolerancia al estrés después de su transformación (Holmstrom, 1996; Pilonis *et al.*, 1998; Yeo *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2002). Esto es posible gracias a la biofuncionalidad en los canales de proteínas de trehalosa sin causar problemas en la acumulación de T6P (Wingler *et al.*, 2000; Wingler *et al.*, 2002).

Como ejemplo en plantas de arroz transgénicas, estas no mostraron ningún tipo de cambio morfológico en la planta (Garg *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha observado que en niveles bajos expresión de trehalosa que se generan en la planta la T6P solo trabaja como osmoprotector y como estabilizador de la membrana (Leymand *et al.*, 2001).

Hay una extensa investigación y tecnología patentada de los usos de la trehalosa para preservar membranas biológicas, proteínas, macromoléculas, alimentos, sangre, vacunas y varias enzimas, eso se puede secar a temperatura ambiente sin que la estructura y la bioactividad se dañe después de la rehidratación (Paiva *et al.*, 1996). Estas observaciones y el hecho que la trehalosa se acumula en varios organismos que resisten condiciones extremas de estrés, hacen de esta un blanco para la ingeniería genética en plantas (Weisburd *et al.*, 1988; Colaço *et al.*, 1992).

4.6 TRANSFORMACIÓN DE MICROALGAS.

La transformación de microalgas es el primer paso para su uso en aplicaciones biotecnológicas produciendo proteínas o con la modificación molecular y sus cambios metabólicos. Desde que se logró la primera transformación nuclear en *Chlamydomonas*, otras microalgas se han empezado a transformar con marcadores moleculares que permite los cambios necesarios. Sin embargo, estas transformaciones han tenido problemas tales como deficiencia, integración o estabilidad. Por esto el número de especies de microalgas transformadas exitosamente no es muy alto (León *et al.*, 2007).

El mejor estudio de modificación genética de microalgas fue con *Chlamydomonas reinhardtii*, que fue transformada en 1988 con la complementación de nit I y arg7 con nitrato reductasa como homólogo (Sun *et al.*, 2005).

En general, la microalga transgénica *C. reinhardtii* tiene varias aplicaciones biotecnológicas tales como la síntesis de anticuerpos y vacunas (Mayfield *et al.*, 2003, Sayre *et al.*, 2003), producción de bio-hidrógeno (Melis, 2002) y biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

El primer éxito de la introducción y expresión de inducción de DNA en células de *Chlorella* reportado fue la expresión de luciferasa (Luc) en protoplastos de *C. ellipsoidea* (Jarvis *et al.*, 1991) y de β -glucuronidase (Gus) en *C. saccharophila* por electroporación (Hawkins *et al.*, 1999). La primera evidencia de una transformación

estable de *Chlorella* fue la complementación de la deficiencia de nitrato reductasa en las mutantes de *C. sorokiniana* con el gen homólogo de nitrato reductasa de *C. vulgaris* por microbombardeo, ese evento fue reportado como un acontecimiento en la recombinación homóloga (Dawson *et al.*, 1997)

Otras clorófitas de gran importancia económica como *Dunaliella* o *Haematococcus* han estado durante un largo tiempo en el reflector de las manipulaciones genéticas, solo hay algunos informes prometedores de la transformación acertada de estas microalgas.

4.7 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

4.7.1 Agitación con esferas de cristal

Fue el primer método usado para transformar *Chlamydomonas reinhardtii* (Kindel, 1990). Desde entonces se ha usado por su simplicidad y su fácil reproducción. Este método permeabiliza las células, lo cual se logra agitando en vortex en presencia de DNA con esferas de cristal (Shiedlmeier *et al.*, 1994). Esta técnica fue desarrollada para transformar levaduras y ha sido usada exitosamente para la transformación de *Chlamydomonas* buscando la degradación enzimática de la pared celular. No hay reportes sobre la eficiencia de este método para la transformación de otras especies, pero por la simplicidad y eficiencia de este método es interesante investigar su aplicación en otras especies de microalgas. La ventaja de este método es que no se requiere equipo especializado (Quesada *et al.*, 1994).

4.7.2 Electroporación

En electroporación se forman orificios en la membrana celular cuando se aplica una corriente eléctrica. La introducción de los genes por electroporación es usado en animales, plantas y bacterias. Según los reportes, por este método se han logrado transformantes estables de microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* (Shimogowara *et al.*, 1998), *Chlorella ellipsoidea* (Chen *et al.*, 2001) y *Dunaliella salina* (Geng *et al.*, 2003). Hoy en día, todavía es importante considerar variaciones

en temperatura, osmolaridad, corriente eléctrica, fuerza, tiempo y concentración de DNA para optimizar la obtención de transformantes eficientes (Shimogawara *et al.*, 1998).

4.7.3 Bombardeo con micropartículas

Conocido también como método de balística, en el cual el DNA es literalmente metido dentro de células huésped con “pistola genética”. Se utilizan pequeñas partículas de oro o de tungsteno (0.5 - 1.5 nm) revestidas con DNA y aceleradas a cerca de 500 ms^{-1} con una pistola de helio, hacia el interior de las células objetivo. Ha sido muy aplicado en la transformación de células de plantas y tejidos (Stanford *et al.*, 1993) pero también ha sido usado para la transformación de otros sistemas biológicos tales como células animales, hongos, organelos subcelulares, bacterias y algas. Esta técnica ha demostrado particular éxito en la transformación de microalgas (Apt *et al.*, 1996; Dunahay *et al.*, 1995).

4.7.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Es una herramienta común en la transformación genética de plantas porque tiene la capacidad única de transferir una parte de DNA en su misma (T-DNA) del plásmido Ti dentro del genoma nuclear de las células de plantas. Este representa un ejemplo del material de transferencia genética y que se ha permitido gracias a que esta bacteria puede usarse como herramienta de integración de genes seleccionados en cromosomas de plantas. El método fue inicialmente propuesto para plantas

dicotiledóneas que son los hospederos de esta bacteria en el suelo, pero pronto se usó para la manipulación genética de plantas monocotiledóneas, incluyendo cereales y hongos. Kumar y colaboradores (2004) reportaron la transformación estable de *C. reinhardtii* por medio de *Agrobacterium* usando un promotor CAM35S. La eficiencia de la transformación obtenida por este método fue 50 veces más alta que con otras técnicas. Hasta ahora no hay reportes de la transformación de microalgas usando este método, sin embargo, el rango de organismos para transformación con *Agrobacterium* incluye gimnospermas, una amplia variedad de hongos y células animales, lo que sugiere que la transferencia de T-DNA se podría convertir en un sistema para transferir genes en algas (Gelvin *et al.*, 2003).

4.8 TRANSFORMACIÓN DE *Chlorella vulgaris*

Chlorella es una microalga apta para transformarse genéticamente, ya que es una microalga de fácil crecimiento y con un genoma pequeño. Su potencial uso biotecnológico ya ha sido descrito antes y se cree que al modificarse genéticamente, la microalga tendrá un potencial todavía mayor para la producción de bienes, sin embargo, no se ha establecido un método efectivo por su transformación, lo cual dificulta la identificación y caracterización de los genes de interés que llevarían a lograr el objetivo (Johnson *et al.*, 1993; Chow *et al.*, 1997).

Se ha estudiado la transformación de *Chlorella* sp. usando las técnicas de microbombardeo y electroporación (Dawson *et al.*, 1997). Para lograr la selección se ha utilizado hygromicina B como marcador, esto debido a que el género *Chlorella* es insensible a los antibióticos cloranfenicol y kanamicina (Brown *et al.*, 1991; Ortiz *et al.*, 1996; Lun *et al.*, 1996; Akama *et al.*, 1992). En general, la transformación de *Chlorella* sp. ha tenido dificultades en la integración de los genes foráneos al genoma nativo (Hawkins *et al.*, 1999). Se ha intentado introducir genes humanos en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*, sin éxito en la obtención de líneas transgénicas estables. En pro de lograr una mayor estabilidad en las transformaciones, se han realizado varios estudios en busca de las condiciones para lograr una construcción estable y así producir proteínas y péptidos de interés comercial, incluyendo hormonas de crecimiento humano, alimento para peces y bioinsecticidas (Borovsky, 2003; Hawkins

et al., 1999). No obstante, el mayor logro en la transformación de las microalgas antes mencionadas ha sido la integración temporal de los plásmidos foráneos a su genoma, quizá se necesario verificar las construcciones homólogas para obtener mejores resultados (Chow *et al.*, 1999).

V. MÉTODOS

5.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

Se cultivó *Chlorella vulgaris* (UTEX 276) en medio basal bold (BBM) a temperatura ambiente con iluminación de 2000 lux y agitación manual, se ajustó el pH a 6.8 para su óptimo crecimiento. Para verificar el crecimiento de la microalga se hizo conteo de células en de Cámara de Neubauer hasta un crecimiento de 1×10^6 cel/ml o por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm.

5.2 Extracción y cuantificación de DNA

La extracción de DNA se realizó con ayuda de un kit de purificación de DNA (Pure gene) adaptado para la extracción en microalgas. Se agregaron 600 µl de solución de lisis y se agitó por 3 segundos, posteriormente se sometió a incubación a 65 °C durante 1 hora. Las muestras así tratadas se invirtieron 10 veces durante la incubación para asegurar la homogeneización. Una vez pasado este tiempo, se agregó 1 µl de solución de RNAsa y se invirtieron los tubos 25 veces antes de incubar a 37 °C por 15 minutos. Finalmente, se agregaron 200 µl de solución de precipitación proteínas y se agitaron los tubos con muestra por 20 segundos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 minutos. Se separó la fase acuosa y se agregaron 400 µl de solución de Fenol-Cloroformo-Isopropanol (PCI) y se centrifugó a 14 000 rpm por unos segundos. Se separó nuevamente la fase acuosa y se agregan 600 µl de isopropanol. Los tubos con

isopropanol se invirtieron 50 veces y se centrifugaron a 14 000 rpm por 3 minutos. Se retiró la fase acuosa para eliminar los residuos de alcohol y se resuspendió la pastilla remanente en 50 µl de TERNasa. La concentración del DNA genómico se determinó en el equipo NanoDrop y se verificó la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1% sometido a 100 Volts por 25 minutos.

5.3 Purificación de DNA plasmídico

La purificación del DNA plasmídico p1335SBIF, se realizó con ayuda de un kit comercial (GeneJet Plasmid Miniprep Kit de Fermentas). Se usaron 5 ml de cultivo de *E.coli* portando el plásmido correspondiente, los cuales fueron centrifugados en un tubo de microcentrifuga, para colectar la pastilla. Se resuspendió la pastilla celular en 250 µl de la solución de resuspensión, y se agregaron 250 µl de solución de lisis y se incubó a temperatura ambiente por 5 min para completar la lisis. Se agregaron 350 µl de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos para precipitar los restos celulares junto con el DNA cromosomal. El sobrenadante que contiene el plásmido en suspensión fue transferido a una columna de purificación y se centrifugó por 1 minuto a velocidad máxima, se agregaron 500 µl de solución de lavado en la columna y se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por 60 segundos (este paso fue repetido una vez más). La columna vacía fue centrifugada nuevamente para restos de la solución de lavado. Finalmente, para eluir el plásmido se agregaron 50 µl de buffer de elución en la membrana de la columna y se centrifugó por 2 minutos, se desechó la columna y se verificó la integridad del DNA

mediante un gel de agarosa al 1%, y se cuantificó su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000.

5.4 Transformación genética de *Chlorella vulgaris* por electroporación

Se tomaron 500 µl de cultivo de la microalga de un cultivo inicial de 1×10^6 cel/ml mas 500 µl de medio HS, se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células fueron lavadas dos veces con 500 µl agua desionizada estéril centrifugando a 6500 rpm entre cada lavado para sedimentar las células. Posterior a los lavados las células fueron resuspendidas en 80 µl de agua estéril y se le adicionaron diferentes concentraciones de plasmido 35Sbif: 18.17 µg/µl ,62.2 µg/µl , 103.2 µg/µl y 35SNOS; 17.88 µg/ml, 14.685 µg/µl, 110.7 µg/µl . La mezcla de *C. vulgaris* y plásmido fue transferida a una celda de electroporación de 0.2 mm de separación entre electrodos y electroporada. La electroporación se realizó en un electroporador Multiporator (Eppendorf), utilizando voltaje de 1800 V/cm durante 5 mseg. Las células electroporadas fueron resuspendidas en 920 µl de medio BBM y se recuperaron por 24, 48 y 72 hrs. Transcurridos los tiempos de electroporación, las células fueron seleccionadas plateando en cajas con medio semisólido BBM, suplementado con hygromicina B (50 µg/ml). Después de 14 días de crecimiento en medio selectivo, se seleccionaron las colonias transformantes para demostrar por PCR su transformación, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen marcador y para la región TPS y TPP de la enzima bifuncional de síntesis de trehalosa.

5.5 Transformación genética de *Chlorella vulgaris* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 previamente transformada por electroporación con el plásmido p1335BIF se creció en 10 ml de medio Luria Bertani (LB), con 5mM de glucosa y 50 mg L⁻¹ de kanamicina, a 200 rpm en oscuridad por 24 hrs. Posteriormente 5 ml de este cultivo fueron utilizados para inocular 50 ml del medio LB y crecidos a las condiciones arriba mencionadas hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0.8-1.2. El cultivo bacteriano fue cosechado por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos y resuspendido en medio FCM+100 µM de acetosiringona (pH 5.6), llevando el cultivo a una OD₆₀₀ = 0.5.

A partir de un cultivo de *Chlorella vulgaris* de 5x10⁶ cel/ ml, precultivadas 5 días en medio sólido de FCM sólido con 1.2% (v/v) de agar bacteriológico a 25 °C fueron colectadas y resuspendidas en medio de inducción a una DO₆₀₀ = 0.5-1.0.

Las microalgas se centrifugaron y se mezclaron con 200 µl de la agrosuspensión; se plaquearon en medio de inducción sólido y se co-cultivaron por 3 días a 25 °C en oscuridad. Transcurridos los 3 días de co-cultivo, las células se cosecharon en medio FCM suplementado con 500 mg L⁻¹ de cefatoxima en un volumen total de 7 ml y se incubaron en oscuridad a 25 °C por 2 días para eliminar el *A. tumefaciens*.

Las células de *C. vulgaris* libres de la agrobacteria, se plaquearon en medio selectivo con 50 mg L⁻¹ de hygromicina B y 500 mg L⁻¹ de cefatoxima y se incubaron en oscuridad por 2 días y posteriormente se expusieron a la luz.

Las colonias transformantes se analizaron por PCR para verificar la transformación genética, utilizando los oligonucleótidos antes mencionados.

Para verificar la ausencia de contaminación por *Agrobacterium tumefaciens*, se plaquearon muestras de cultivo de la microalga transformada en medio LB (Cha *et al.*, 2011).

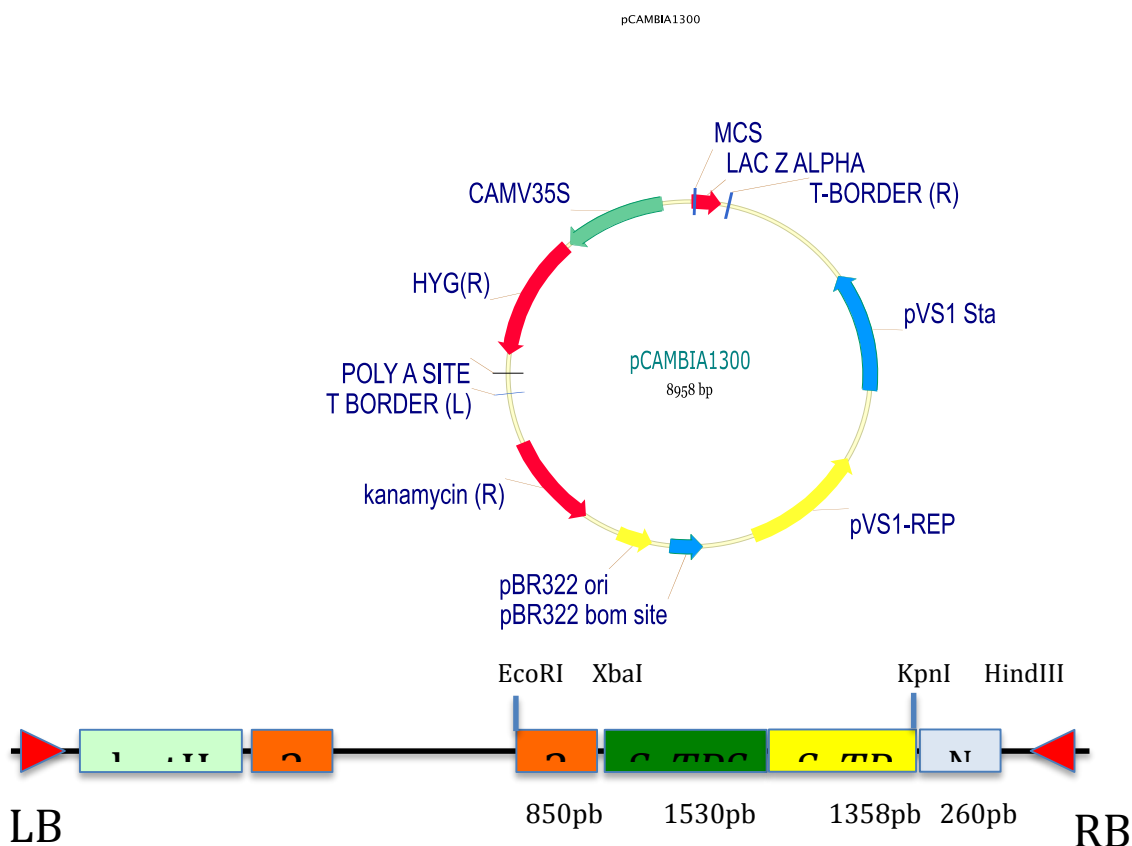


Figura 4. Mapa del Plásmido p1335SBif (12,956 pb)

5.6 Verificación de la correcta inserción del plásmido en *Chlorella vulgaris*

Para verificar la inserción del plásmido se hicieron análisis de PCR (Tablas 2 a 6) buscando 3 controles específicos del vector tales como 35S, TPPS-II, NTP-II con sus diferentes pares de oligonucleótidos.

Tabla 2. Mezcla de la PCR punto final para verificar la síntesis de DNA fuera la correcta

Agua de grado biología molecular	14µl
Buffer 10x	2.5µl
dNTPs 10 Mm	2µl
Primer Forward (10mM)	1.5µl
Primer Reverse (10 mM)	1.5µl
Taq polimerasa Fli 5U/l	1µl
MgCl ₂	1.5µl
DNA	1µl

Tabla 3. Condiciones de PCR punto final utilizada para la verificación del gen 35S en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen

35S			
1	Desnaturalización	95°C	5 minutos
2. 35 ciclos	Desnaturalización	95°C	40 segundos
	Alineamiento	58°C	40 segundos
	Extensión	72 °C	1 minutos
3	Extensión	72°C	10 minutos

Se usaron estos oligonucleótidos:

35S 5' CCCGAGTAACAATCTCCAGG

35S 3' GAGGAAGGGTCTTGCGAAGG

Tabla 4. Condiciones de PCR punto final para la verificación del gen TPPS-II en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen

TPPS-II			
1	Desnaturalización	95°C	5 minutos
2. 36 ciclos	Desnaturalización	95°C	50 segundos
	Alineamiento	58°C	50 segundos
	Extensión	72 °C	1:30 minutos
3	Extensión	72°C	10 minutos

Para la PCR se utilizaron oligos específicos y este fue su diseño:

TPPS-II 5' CGGGATCGGCTAACTAATCTATTA

TPPS-II 3' CGGGGTACCATGGTGGGTTGAGA

Tabla 5. Condiciones de PCR punto final para la verificación del gen NTP-II en la síntesis de DNA. Se utilizó la Tm específica para cada gen

NTP-II			
1	Desnaturalización	94°C	5 minutos
2. 36 ciclos	Desnaturalización	94°C	45 segundos
	Alineamiento	57°C	45 segundos
	Extensión	72°C	1 minutos
3	Extensión	72°C	10 minutos

Para la PCR se utilizaron oligos específicos y este fue su diseño:

NptII 5' GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC

NptII 3' GAA CTC GTC AAG AAG GC

Como control se utilizaron:

- 1) Endógeno: DNA plasmídico de *p1335sBif*
- 2) Control positivo: DNA de *Chlorella vulgaris* Bif
- 3) Control negativo: Agua

Tabla 6. Pares de bases correspondientes a los productos de PCR tiempo real

Genes	Producto a amplificar
35 S	850 pb
TPPS-II	1500 pb
TPP-II	1300 pb

Se verificó que hubiera amplificación utilizando un control endógeno de P1335sBif y se probaron que los amplicones fueran del tamaño correcto. Lo anterior se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% con SYBRsafe durante 25 minutos a 100 V para su posterior visualización con luz UV en un fotodocumentador.

5.7 Inmovilización de *Chlorella vulgaris* p1335s-Bif

Se preparó una solución de 200 ml de alginato de calcio estéril adicionado con un cultivo axénico de *Chlorella vulgaris* transgénica. La solución se goteó con una jeringa de 10 ml gota a gota en 100 ml de solución CaCl₂ al 2% con agitación periódica. Las esferas resultantes se dejaron reposar en la solución de CaCl₂ durante una hora para estabilizar el gel, al termino las esferas se lavaron dos veces en con agua estéril. Finalmente, las esferas se colocaron en medio BBM adicionado con hygromicina B a una concentración de 50 µg/ml.

5.8 Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* p1335s-bif y *Chlorella vulgaris* Wild type

Para realizar el recuento celular se usó una Cámara de Neubauer. Se tomó una muestra de 100 µl de cultivo para hacer el conteo. Con los datos de concentración celular de cada recuento en tiempos sucesivos se obtuvo la curva de crecimiento graficando en el eje de las Y los valores de concentración celular y en el eje de las X el tiempo (días), dejando como constante las concentraciones de NaCl de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM.

5.9 Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

Se colocaron 3 ml de cultivo en tubos cónicos de plástico y se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 minutos a 15 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se colocó en un tubo de vidrio limpio el cual se cubrió con papel aluminio para evitar la fotooxidación. Se añadieron 300 µl de acetona al 90% y se agitó en el vortex permitiendo así la resuspensión de la pastilla y la extracción de los pigmentos. Las muestras se dejaron reposar durante 16 horas a 4 °C.

Finalmente, se centrifugaron las muestras a 3 000 rpm por 10 minutos para separar el extracto clorofílico. Se midió la absorbancia en una celda de cuarzo y se leyó en el espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda 630, 647, 664 y 510 nm para clorofilas *a* y *b*, y 480 nm para carotenoides totales.

Para la cuantificación de las clorofilas y carotenoides se utilizaron las ecuaciones de Jeffrey Humphret (1975) y Humphrey (1979), y para los carotenos totales la Strickland y Parson (1972).

$$\text{Clorofila a} = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila b} = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides} = 7.6(A_{430} - 1.49 A_{510})$$

VI. RESULTADOS

6.1 Identificación molecular de *Chlorella vulgaris*

Se verificó el producto de extracción de DNA genómico de la cepa nativa de *Chlorella vulgaris* (UTEX 267) por medio de PCR y gel de electroforesis, el cual mostró un producto de amplificación de 1000 pares de bases correspondiente al fragmento de *Chlorella vulgaris* (Figura 5).

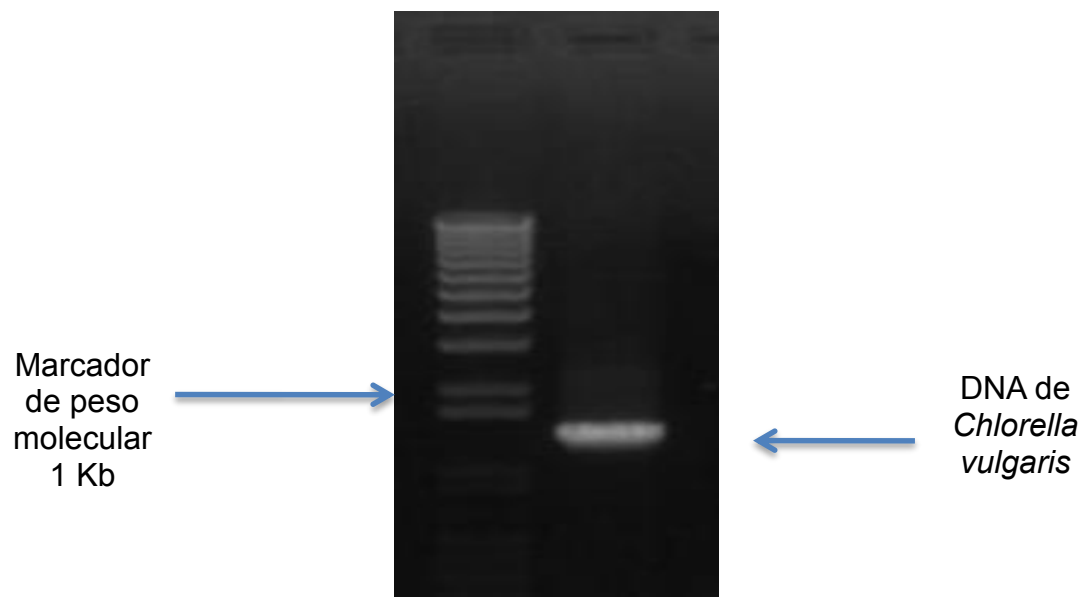


Figura 5. Producto de extracción de DNA genómico de *Chlorella vulgaris* en un gel de agarosa al 1%

6.2 Verificación de integridad de DNA plasmidico p135SBif y cuantificación

Se verificó la correcta extracción de DNA del plásmido p1335S-Bif extraído de *E. coli* y se cuantificó. Se obtuvieron concentraciones de 79.8 ng/μl de p1335SBif y 390.8 ng/μl de p1335S.

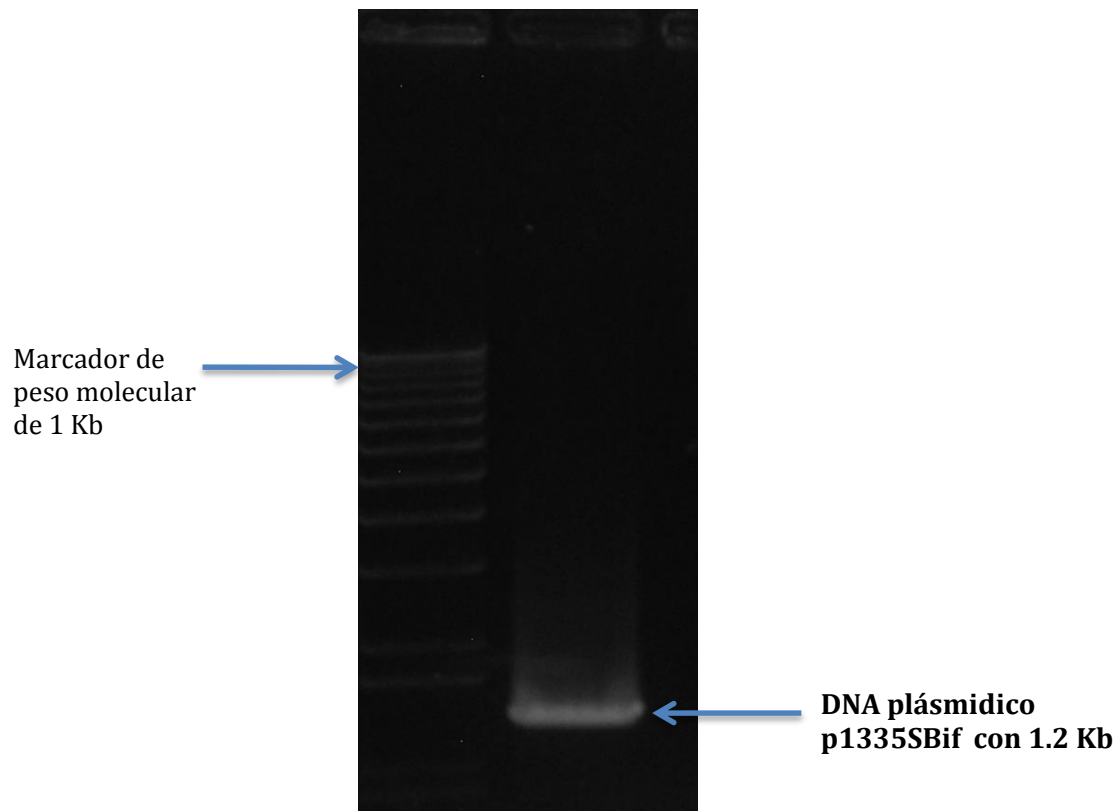


Figura 6. Verificación de la extracción del DNA plasmídico p1335SBif en un gel de agarosa al 1%

6.3 Verificación de integridad de DNA heterólogo en *Chlorella Vularis* Bif

Al hacer el análisis de extracción del DNA de la microalga conteniendo el vector BIF se pudo observar que la inserción del plásmido en el genoma de la microalga no se completó satisfactoriamente (Figura 7). Se hicieron más pruebas de verificación de la transformación.

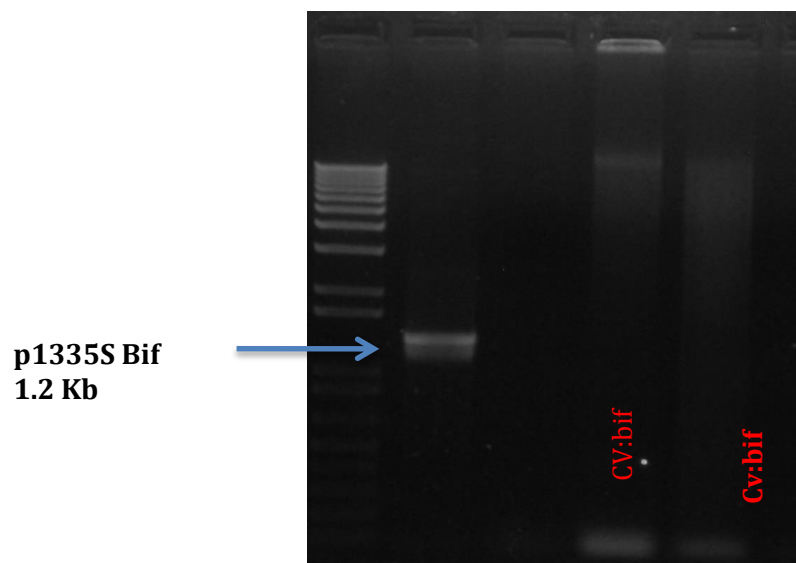


Figura 7. Verificación de la extracción de DNA de la microalga modificada

6.4 Transformación por electroporación

En la figura 8 se muestra el resultado de PCR punto final usando los oligonucleótidos del promotor del virus de la coliflor (35S) para verificar la correcta inserción del plásmido p1335S-Bif. Se obtuvieron bandas de 850 pb correspondientes al tamaño del gen buscado, no obstante la concentración de DNA plasmídico fue demasiado alta por lo que decidió diluir las muestras de DNA

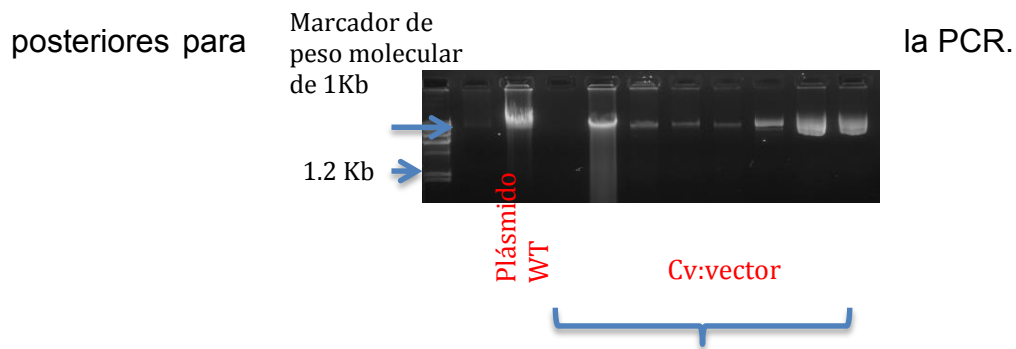


Figura 8. Primera prueba de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% para verificar la inserción del plásmido en la microalga

El producto de la PCR para detectar la parte inicial de la inserción del plásmido p1335S-Bif fue negativo, es decir, no se pudo verificar la correcta inserción del plásmido en la microalga, ninguna de las 4 pruebas mostró el fragmento buscado (Figura 9).

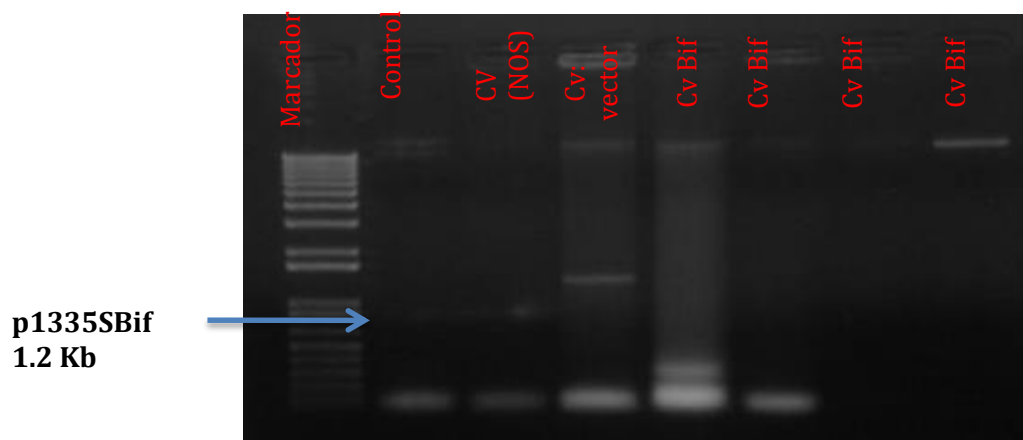


Figura 9. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1% con los oligonucleótidos del promotor (35S) con DNA de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif

Debido a que no se pudo verificar la inserción completa del plásmido, se buscó el vector del gen TPPS. Se corrió una PCR para comparar el DNA de *Chlorella vulgaris* wild type, de *Chlorella vulgaris* NOS (cepa vector) y las cepas de interés *Chlorella vulgaris* Bif. Nuevamente no se pudo observar la inclusión del vector del gen TPPS (Figura 10). Se hizo una segunda prueba y tampoco se observó la inclusión, lo que hace suponer que la microalga transformada expulsa el plásmido.

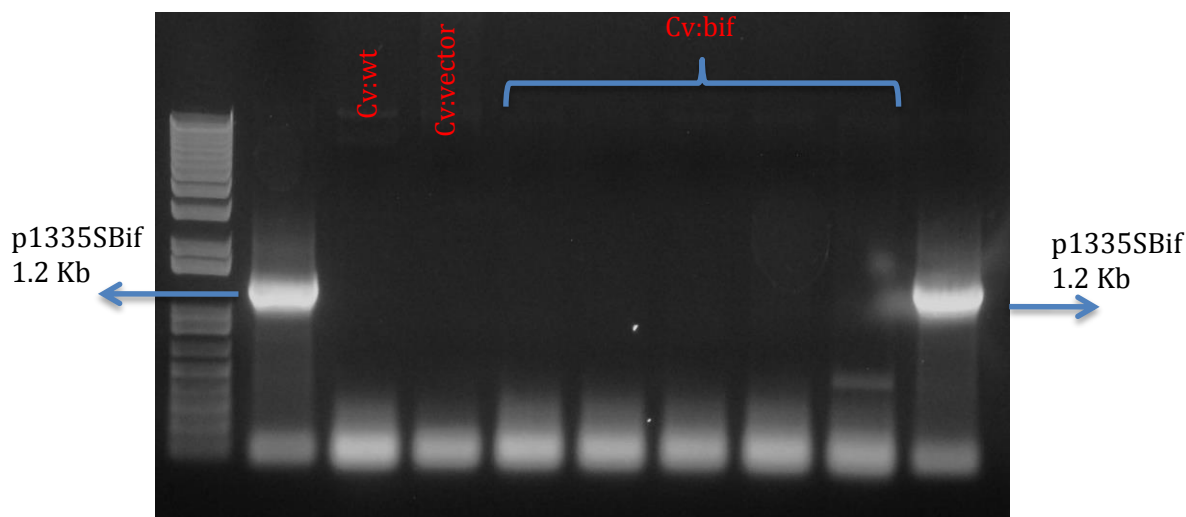


Figura 10. Producto de PCR punto final con oligonucleótidos TPPS-II en un gel de agarosa 1%

6.5 Transformación por *Agrobacterium tumefaciens*

Para determinar la efectividad del método de transformación por medio de *Agrobacterium*, se verificó la inserción del plásmido p1335S-Bif en 20 colonias de *Chlorella vulgaris* transformadas con esta bacteria. En el gel se muestran cinco cepas conteniendo el vector p1335S (NOS) y cinco cepas con el plásmido p1335S-Bif (Figura 11). Posteriormente, de las cepas seleccionadas al azar para verificar la inserción del borde 35S se detectó que solo 7 cepas mostraron contener el borde 35S (Figura 12).

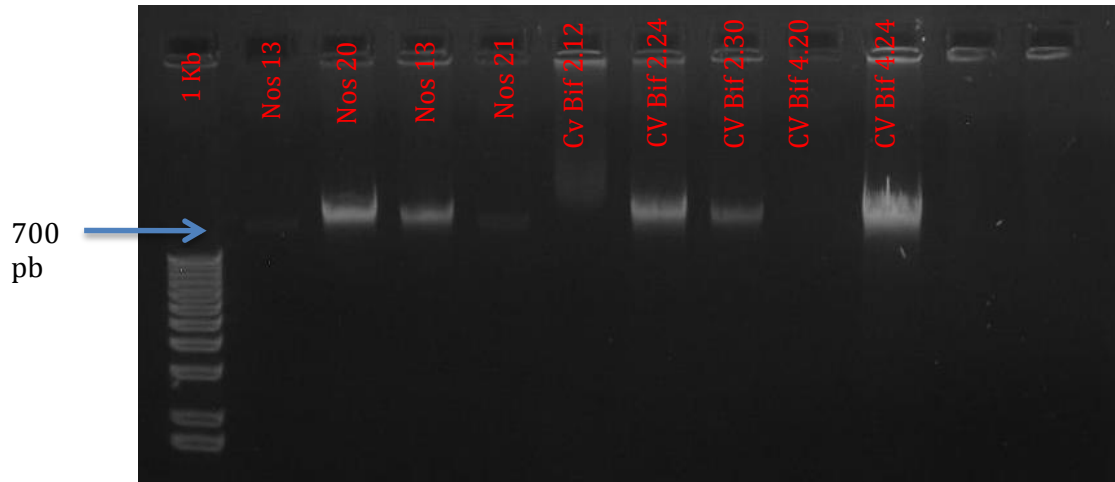


Figura 11. DNA genómico de diferentes cepas de *Chlorella vulgaris* transgénicas en un gel de agarosa a el 1%

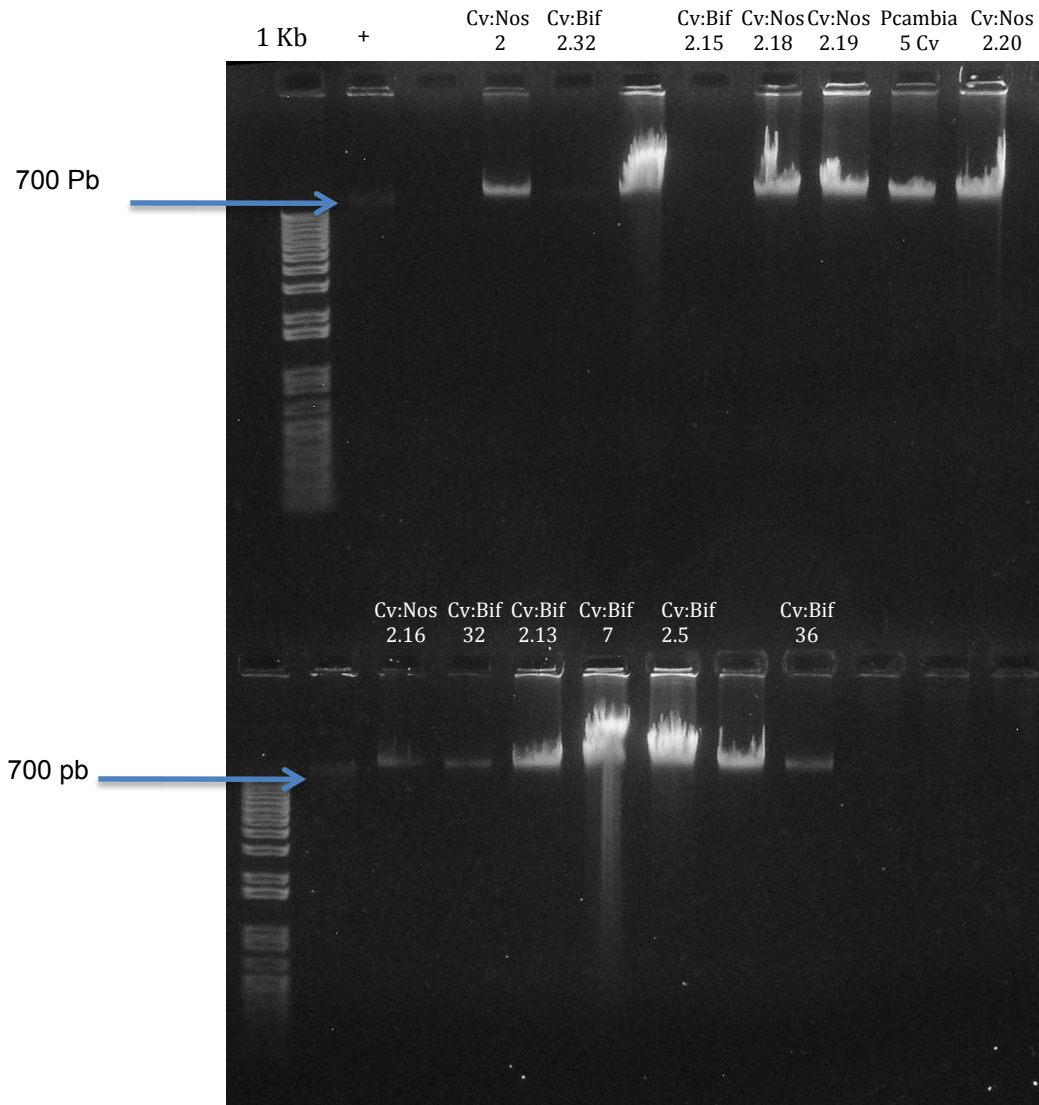


Figura 12. Producto de PCR punto final de DNA plasmídico de diferentes cepas de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif con oligonucleótidos de 35S

Después de obtener cepas con el borde 35S, se continuó su análisis para el borde TPPS-II de 1300 pb. Se investigaron 15 cepas de *Chlorella vulgaris* transgénicas de las cuales solo se obtuvieron 3 cepas positivas para este borde: CV Bif 26, CV Bif 7 y CV Bif 2.5 (Figura 13). Seguido de este análisis se verificó la inserción del borde

NTP-II (1500 pb) por reacción de PCR punto final con oligonucleótidos específicos para poder eliminar cepas donde sus construcciones no estuvieran completas (Figura 14 y 15). En este gel se obtuvieron 7 cepas positivas: CV Bif 36, 32, 7, 2.5, 2.21, 26 y 2.23.

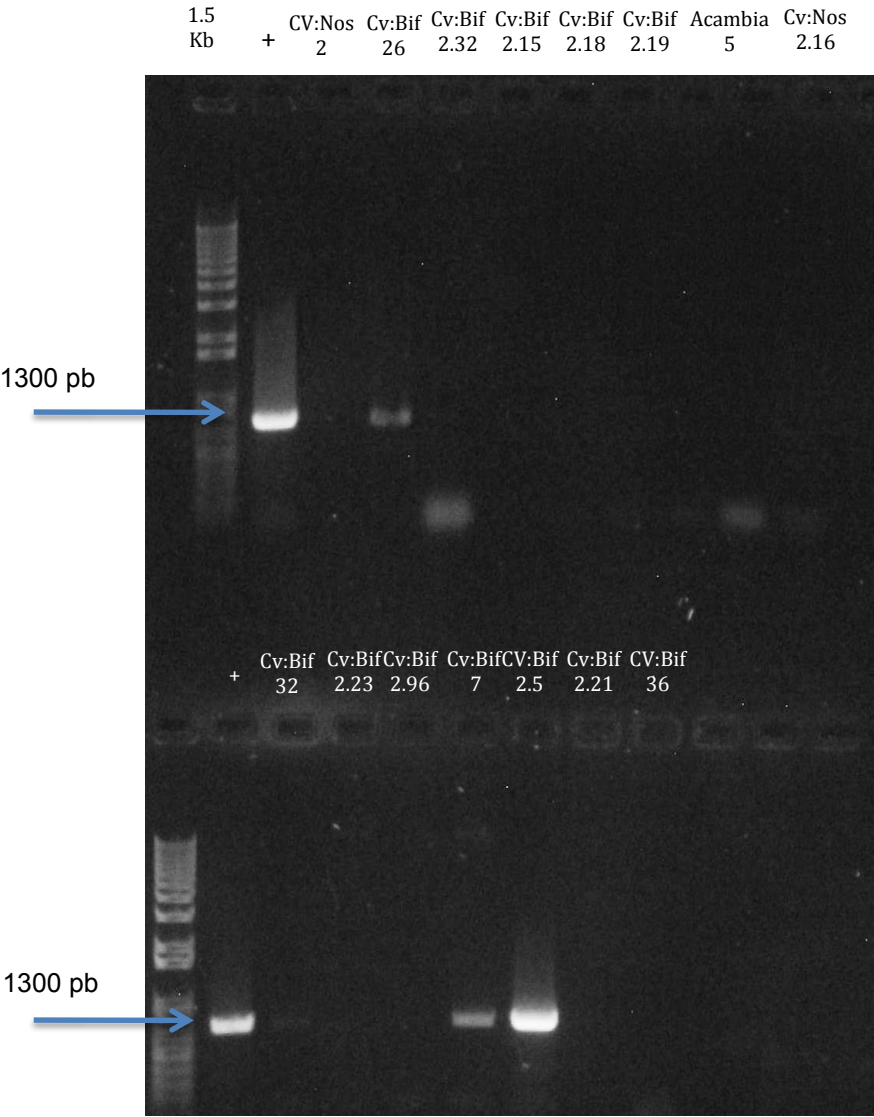


Figura 13. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1%, para el borde TPPS-II de DNA genómico de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif

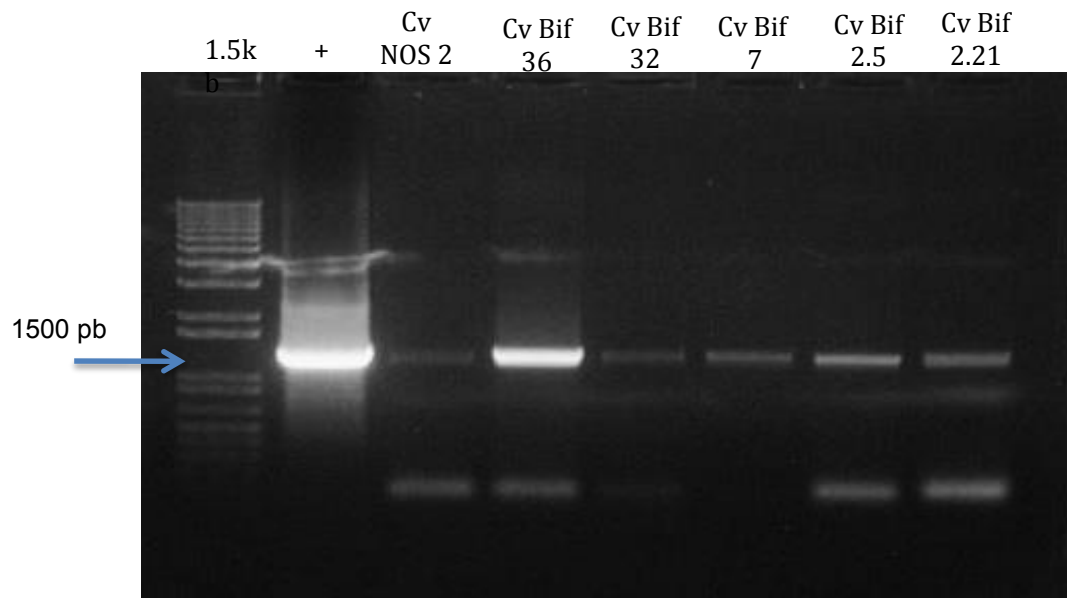


Figura 14. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa al 1%, para el borde NTP-II de DNA genómico de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif

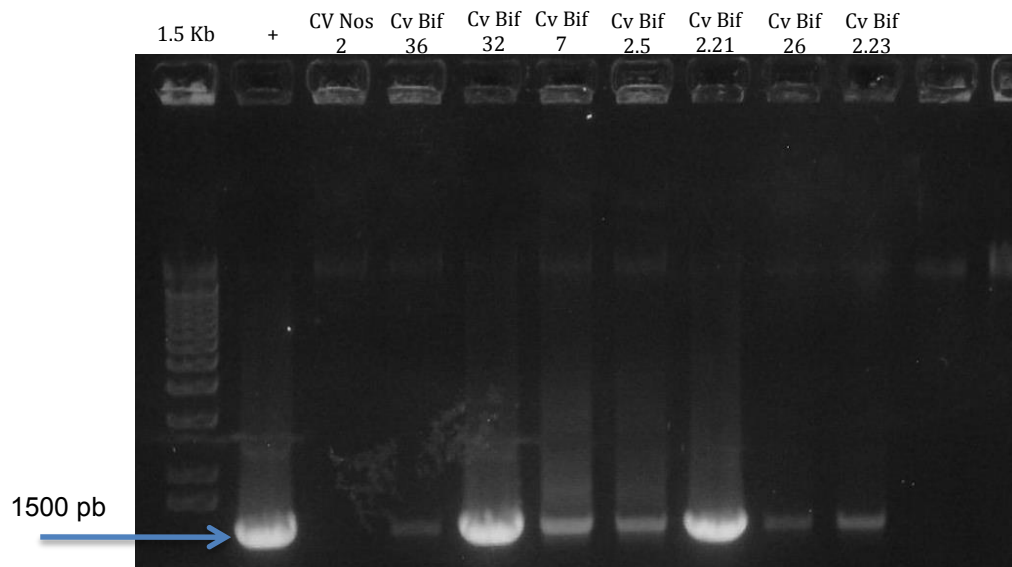


Figura 15. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa a el 1% para el borde NTP-II de DNA genómico de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif.

Finalmente, se buscó resistencias a kanamicina en las siete cepas transformadas de *Chlorella vulgaris*. No se observó amplificación para el gen de resistencia a la kanamicina en seis de las cepas: Cv NOS 2, Cv Bif 26, Cv Bif 2.23, Cv Bif 2.21, Cv Bif 36 y Cv Bif 32 (Figura 16). Este resultado es positivo indicando la completa transformación de *Chlorella vulgaris*, puesto que de haber amplificación del gen de resistencia a kanamicina se podría concluir que las muestras estaban contaminadas con *Agrobacterium tumefaciens*, ya que esta es una bacteria resistente a dicho antibiótico.

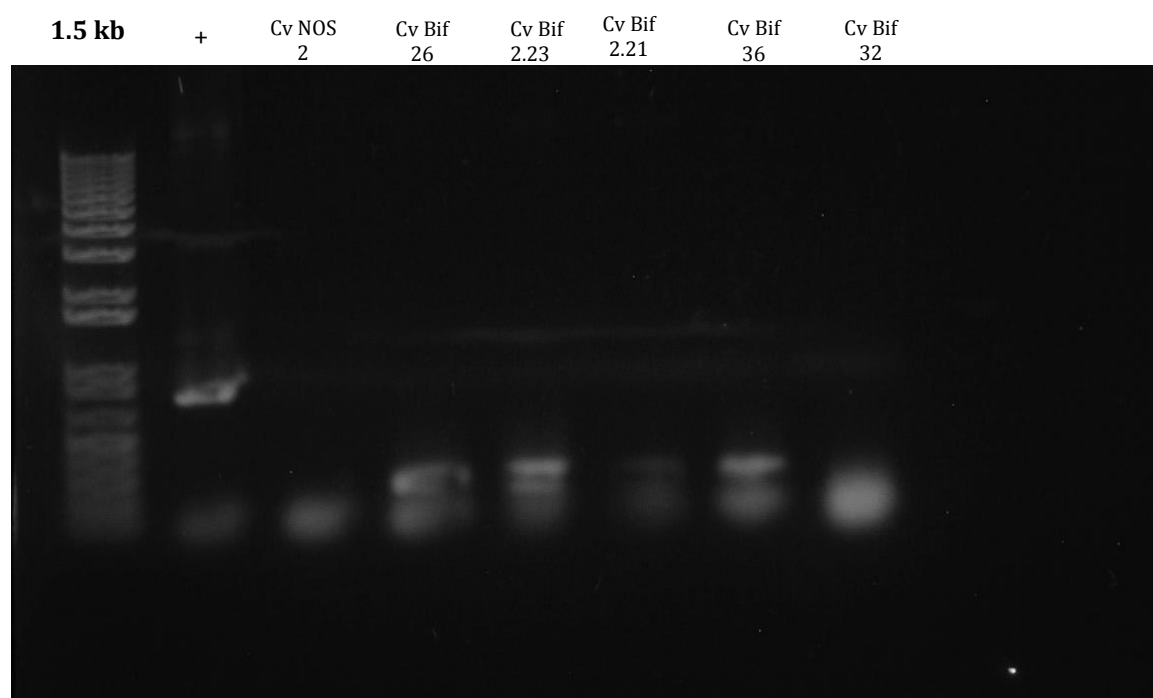


Figura 16. Producto de PCR punto final en un gel de agarosa al 1% con oligonucleótidos de kanamicina en DNA genómico de *C. vulgaris* p1335S-Bif

Para corroborar la correcta inserción del plásmido y el crecimiento adecuado de las cepas transformadas de *Chlorella vulgaris*, se hizo siembra en placa de las cepas seleccionadas con hydrogmicina B como marcador de selección. De las veinte cepas seleccionadas inicialmente se detectó que solamente 7 fueron positivas en la total inclusión del plásmido (Figura 17).

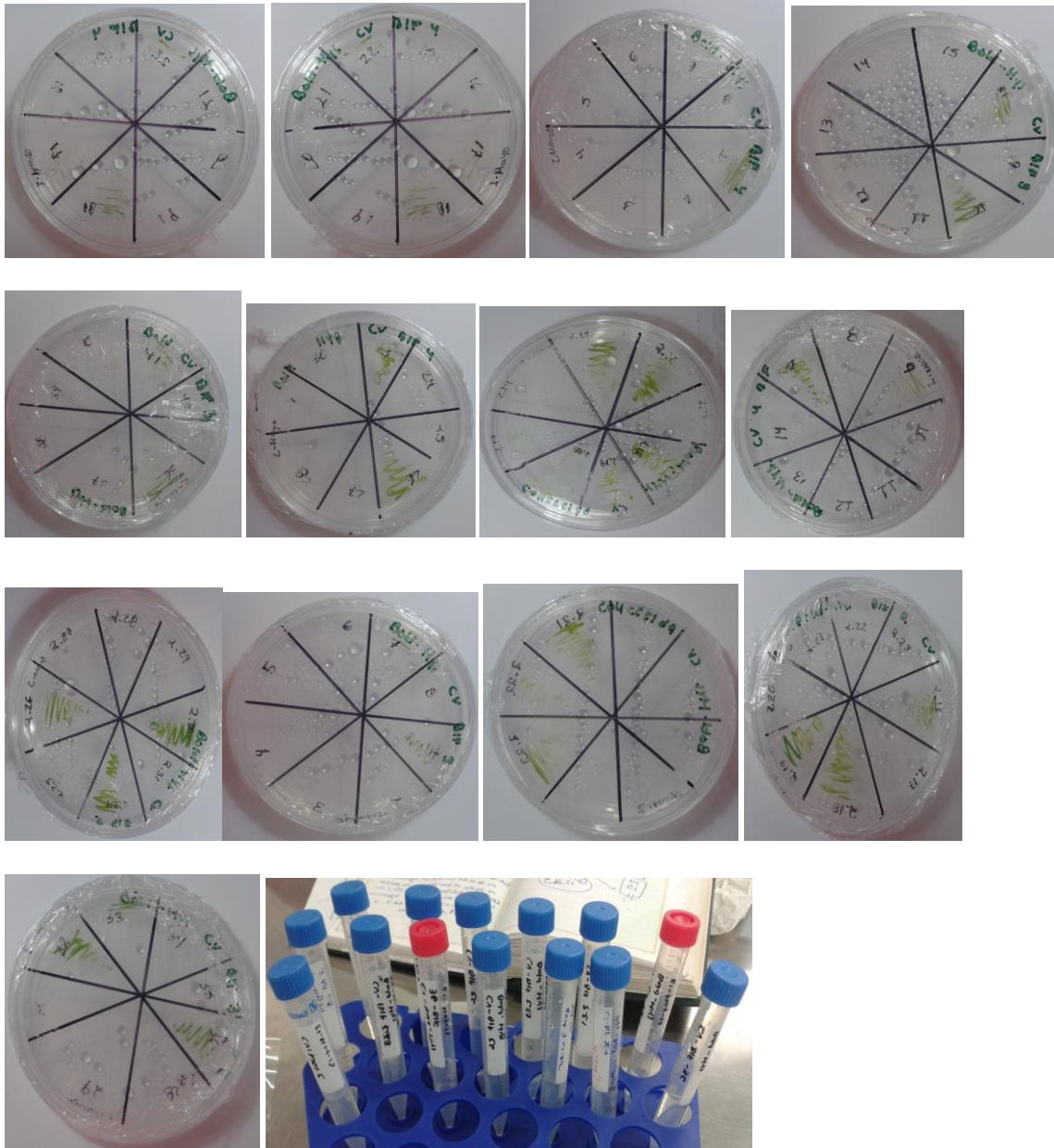


Figura 17. Cepas de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif en medio Bold con hygromicina B como marcador de selección

6.6 Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif en medio salino

Además de las pruebas moleculares se hizo una cinética de crecimiento de la cepa transgénica 2.21 como ejemplo de tolerancia a la salinidad de las cepas transformadas. Se evaluó el crecimiento en medio Bold a seis diferentes concentraciones de NaCl: 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM. Se pudo observar que no hay diferencias significativas en el desarrollo de la cepa a las diferentes concentraciones de sal estudiadas con una aparente disminución de la velocidad de crecimiento a 250 mM de NaCl (Figura 18).

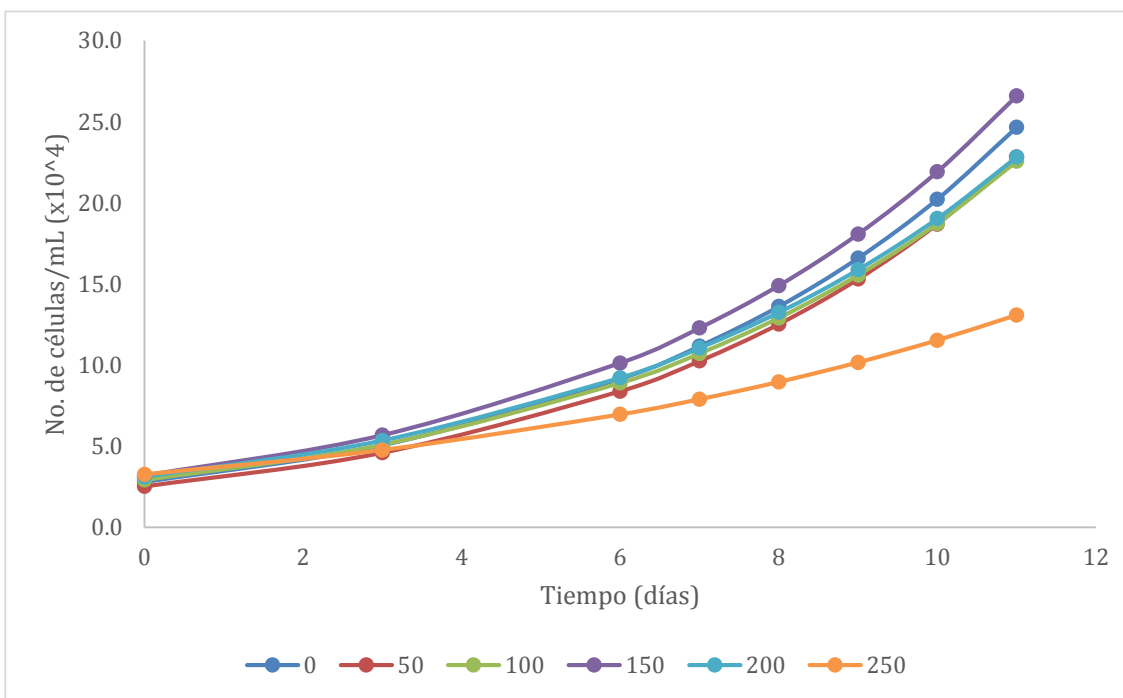


Figura 18. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif 2.21 en concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl.

6.7 Medición de clorofila y carotenoides en *Chlorella vulgaris* p1335S-Bif

Se midió el contenido de clorofila y carotenoides en cinco de las cepas transgénicas para determinar si hubo un incremento de pigmentos con respecto a la cepa nativa. La cepa Cv Bif 7 mostró un contenido significativamente mayor de clorofila *a* con respecto a las demás cepas analizadas, mientras que la cepa Cv Bif 2.21 mostró el mayor contenido de carotenoides como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Contenido de clorofila y carotenoides

Cepa	Clorofila A en µg/ml	Clorofila B en µg/ml	Carotenoides en µg/ml
CV:WT	8.4140	3.9030	4.9922
CV:Bif 36	10.3071	41.3190	7.8290
CV:Bif 7	85.6400	41.3190	7.8281
CV:Bif 2.21	52.4179	41.3190	19.8840
CV:Bif 32	3.7088	1.7948	3.2293
CV:Bif 26	0.7772	0.2258	0.5022

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La transformación de *Chlorella vulgaris* con el plásmido p1335S-Bif por electroporación permitió crecer efectivamente las cepas en medio Bold adicionado con hygromicina B como marcador de selección durante 30 días, sin embargo, al realizar pruebas de verificación de inclusión del plásmido en la microalga se observó que las cepas mostraban fragmentos variados del plásmido, con lo cual se prueba que la hygromicina B deja de ser efectiva como marcador de selección y las cepas modificadas dejan de producir el plásmido de interés, lo cual concuerda con lo reportado por Chow *et al.* (1999).

Dados los resultados anteriores, se realizó una transformación de *Chlorella vulgaris* con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. En las cepas así transformadas se logró una mejor estabilidad del plásmido insertado, aunque no se obtuvo un 100% de inserción del vector, este resultado concuerda con lo reportado por Thye San Cha *et al.* (2011). Para mejorar la eficiencia de la selección de transformantes se decidió suplementar el medio Bold + hygromicina B con acetosyringona.

Otro aspecto a señalar es que el co-cultivo de la microalga con la bacteria de transformación se debió realizar en medio sólido para lograr una adecuada interacción entre los microorganismos. El aspecto anterior ya había sido reportado

por Kathiresan *et al.* (2009) y Yee *et al.* (2011). Con las transformaciones así obtenidas se ha reportado que se pueden lograr células transgénicas viables por hasta 2.5 años (Kathiresan *et al.*, 2009).

Se observó que la microalga modificada con el plásmido bifuncional, tiene capacidad de crecer en concentraciones de NaCl de hasta 250 mM, una característica no observada en la cepa nativa, lo cual implica una correcta transformación al haberse incluido en la célula la tolerancia a la salinidad por medio de los genes para la acumulación de trehalosa como osmoprotector (Suárez *et al.*, 2008; Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009; Zawoznik *et al.*, 2011).

En el aspecto de acumulación de pigmentos (clorofila *a* y *b* y carotenoides), las microalgas transgénicas mostraron acumulaciones superiores de estos pigmentos en relación a la cepa nativa, lo cual es de esperarse en plantas transgénicas que además de tolerar el estrés abiótico incrementan su tasa de fotosíntesis (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003).

VIII. CONCLUSIONES

La técnica de transformación de *Chlorella vulgaris* con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido p1335SBif para conferir tolerancia al estrés salino permitió obtener una mejor eficiencia en la transformación logrando obtener cepas transgénicas más estables en comparación con el método de electroporación.

Para la transformación de *Chlorella vulgaris* con la técnica de electroporación aún no se han logrado establecer las condiciones óptimas con las cuales lograr transformaciones estables.

IX. PERSPECTIVAS

Es necesario optimizar el método de transformación de *Chlorella vulgaris* con *Agrobacterium tumefaciens* para lograr un mayor número de células transgénicas con estabilidad ante el plásmido insertado.

Toda vez que la microalga *Chlorella vulgaris* modificada con el gen de acumulación de trehalosa p1335S-BIF es capaz de mantenerse estable y tolerar el estrés salino, es importante verificar los rangos de tolerancia a la salinidad y los cambios en la temperatura para determinar si puede ser utilizada como vector en la producción de vacunas recombinantes, la producción de pigmentos y la producción comercial de trehalosa.

Puesto que se ha probado la eficiencia de la asociación de microalgas con cultivos vegetales para que las plantas así cultivadas superen el estrés abiótico, es necesario determinar si la microalga *Chlorella vulgaris* que contiene el plásmido bifuncional puede incluso mejorar la calidad de los cultivos vegetales sometidos a estrés.

X. BIBLIOGRAFIA

- Apt, K.E. y Behrens, P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology 35 (1999):215 – 226.
- Arredondo, B.O. y Vázquez-Duhalt, R. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo* 17 (1991): 99-111.
- Latef, A.A.H.A. y He, C. 2011, Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127 (2011): 228–233.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. y Iturriaga, G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 6 (2006): 109-124.
- Bischoff, H.W. y Bold, H.C. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. In: Elsevier Academic Press. *Algal culturing techniques*. Andersen, R.A., London, UK 1(1963): 95.
- Brown, L.E., Sprecher, S.L. y Keller, L.R. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol. Cell Biol.* 11(1991): 2328–2332
- Cherng, J. y Shih, M. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin induced diabetic mice. *Life Sci.* 77 (2005): 980–990.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25 (2007): 294-306.
- Chow, K.C. y Chow, K.L. Improvement of the recovery of cryopreserved *Chlorella vulgaris* and *Caenorhabditis elegans* by pretreatment with heat shock. *Technical Tips Online* (1997): T01043.

- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54 (1992): 579-599.
- Dawson, H.N., Burkingame, R. y Cannons, A.C. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.* 35 (1997): 356–362.
- De-Bashan, L.E., Antoun, H. y Bashan, Y. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the micro- algae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54 (2005): 197–203.
- De-Bashan, L. E., Antoun, H. y Bashan, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J. Phycol.* 44 (2008): 938–47.
- De-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K. y Bustillos, J. J. Increased pigment and lipids content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae- growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48 (2002): 514–21.
- De-Bashan, L.E., Magallon, P., Antoun, H. y Bashan, Y. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *azospirillum brasilense*. *J. Phycol.* 44 (2008): 1188–1196.
- Dubois, M., Gilles, K.A, Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (1956): 350 – 356.

- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E. y Roessler, P.G. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. J. Phycol. 31(2008): 1004–1012.
- Foster, A.J., Jenkinson, J.M., Talbot, N.J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. EMBO Journal 22 (2003): 225-235.
- Gonzalez, L. E. y Bashan, Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when co-immobilized and co-cultured in alginate beads with the plant- growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000): 1527–31.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8 (1962): 229– 239.
- Harris, E. *Chlamydomonas* as a model organism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52 (2001): 363–406.
- Hasegawa, T., Noda, K., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A. y Yoshikai, Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in *thymocytes* of mice. Int. J. Immunopharmacol. 22 (2000): 877–885.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. y Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54 (2008): 621-639.
- Ip, P. y Chen, F. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. Process Biochemistry 40, 2 (2005): 3491-3496.

- Jensen, M.M. y Malter, A. Protected agriculture: A global review. World Bank, Technical Paper #253. The World Bank, Washintong DC EUA. (1995): 157 pp.
- Johnson, D.E. y Dutcher, S.K. A simple reliable method for prolonged frozen storage of *Chlamydomonas*. Trends Genetics 9 (1993): 194–195.
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G.A. y Sarada, R. *Agrobacterium* mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae, volvocales). J. Phycol. 45 (2009): 642–649.
- Chow, K.C. y Tung, W.L. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. Plant Cell Reports 18 (1999): 778–780.
- Kindle, K.L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1228–1232
- Kim, D.H., Kim, Y.T., Cho, J.J. y Bae, J.H. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga *Chlorella ellipsoidea*. Mar. Biotechnol. 74 (2002): 1163–1174.
- Kumar, S.V., Misquitta, R.W., Reddy, V.S., Rao, R.J. y Rajam, M.V. Genetic transformation of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. 166 (2004): 731–738.
- Leon, R. y Fernandez, E. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. Adv. Exp. Med. Biol. 616 (2007): 1–11.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry 193 (1951): 265 – 272.

- Miranda, J.A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. e Iturriaga, G. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226 (2007): 1411-1421.
- Okon, Y., Albrecht, S.L. y Burris, R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977): 85-88.
- Ortiz, J.P.A., Reggiardo, M.I., Ravizzini, R.A., Altabe, S.G., Cervigni, G.D.L., Spitteler, M.A., Morata, M.M., Elias, F.E. y Vellegos, R.H. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep*, 15 (1996): 877–881.
- Rodríguez-Salazar, S.J., Suárez, R., Caballero-Mellado, J. e Iturriaga, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters* 296 (2009): 52- 59.
- Rochaix, J.D. The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers ed.
- Rodríguez-Cáceres, E. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1998): 990-991.
- Roser, B. y Colaço, C. A sweeter way to fresh food. *New Scientist* 138 (1993): 25- 28.
- Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing (2003).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1989).

- Saunders, J.A. y Bates, G.W. Genetic manipulation of plant cells by means of electroporation and electrofusion. In: Chang DC, Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers, A.E. eds. Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press, New York (1992): 471–483.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O. y Hankamer, B. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1 (2008): 20- 43.
- Stein. J. Handbook of phycological métodos. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, 448 pp.
- Steinbrenner, J. y Sandmann, G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006): 7477–7484.
- Suárez, R., Calderón, C. e Iturriaga, G. Improved tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Science* 49 (2009): 1791-1799.
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M.C., Cevallos, M.A., Lara, M., Hernández, G. e Iturriaga, G. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in *Rhizobia*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21 (2008): 958- 966.
- Thye San Cha, Yee, W. y Aziz, A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium* mediated genetic transformation of the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(2011): 1771–1779.
- Tobe, K., Li, X. y Omasa, K. Seed germination and radicle growth of a halophyte *Kalidium capsicum* (*Chenopodiaceae*). *Annals of Botany* 85 (2000): 391-396.

Young, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. En G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, N. Y. (1992)

Zaslavskaja, L.A. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. Science 292 (2001): 2073–2075.

APÉNDICES

1. Medio Basal Bold BBM. (mg/l)

KH₂PO₄, 175; CaCl₂·2H₂O, 25; MgSO₄·7H₂O, 75; NaNO₃, 250; K₂HPO₄, 75; NaCl, 25; H₃BO₃, 8.05; EDTA+KOH (10 g/l + 6.2 g/l), 1 ml; FeSO₄·7H₂O + H₂SO₄, (4.98 g/l + 1 ml), 1 ml; Metales traza, 1 ml. Composición de los metales traza (g/l): H₃BO₃, 2.86; MnCl₂·4H₂O, 1.81; ZnSO₄·7H₂O, 0.222; NaMoO₄·5H₂O, 0.30; CuSO₄·5H₂O, 0.079; Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.0494. Se ajustó el pH a 6.8.

2. Medio HS (Sveika's high salt medium).

Se preparan las siguientes soluciones con las composiciones correspondientes en ml/l: Solución de Beijerinck's, 5; Solución de fosfato, 5; elementos traza de Hutner, 1; acetato de sodio, 1g.

3. Solución de Beijerinck's.

Composición en g/l: NH₄Cl, 10; MgSO₄·7H₂O, 4; CaCl₂·2H₂O, 2.

4. Solución de fosfato.

Composición en g/l: K_2HPO_4 , 288.0; KH_2PO_4 , 144.0.

5. Oligoelementos de Hutner.

Composición en g/l: EDTA, 50; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22; H_3BO_3 , 11.4; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.06; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.61; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.57; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.10; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.99. El EDTA se disuelve en H_2O hirviendo y el FeSO_4 se debe preparar al final para evitar la oxidación. Se debe ajustar el pH a 7.0.

6. Medio FCM.

Medio Basal Bold, con la siguiente composición (mg/l): KH_2PO_4 , 175; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75; NaNO_3 , 250; K_2HPO_4 , 75; NaCl , 25; H_3BO_3 , 8.05; EDTA+KOH (10 g/l + 6.2 g/l), 1 ml; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + H_2SO_4 , (4.98 g/l + 1 ml), 1 ml; metales traza; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.046; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.304; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0146; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0136; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 9.2; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.8. Vitaminas; Biotina, 0.1; vitamina B12, 1.0.

7. Medio LB líquido.

Medio Luria Bertani, con la siguiente composición (g/l): 10 ; NaCl , 10; peptona, 5; extracto de levadura.

8. Buffer TAE 50X.

Buffer, con la siguiente preparación (g/l): 242; Tris, 100 ml de EDTA 0.5 M ph 8; 57.1 ml ácido acético glacial. Se ajusta el pH 7.6-7.8.

9. Gel de agarosa.

Preparación para 50 ml: 0.5 g agarosa, 50 ml de buffer TAE, 1 µl de bromuro de etidio.

Se mezclan y se calienta hasta fundir la agarosa y se deja enfriar para su uso.

10. Preparación de concentraciones de medio salino.

Salinidad	Concentración de NaCl en g/100 ml	Conductividad
0	0	4.96
50	0.2925	6.85
100	0.585	15.32
150	0.8775	18.56
200	1.17	22.6
250	1.4625	28.8

Se preparan las soluciones en medio BBM con sus respectivas concentraciones de sal.