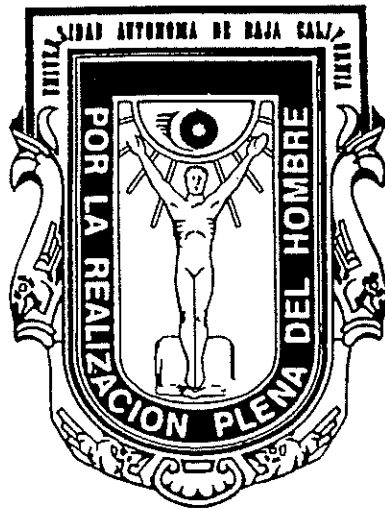


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



" TRANSFORMACION GENETICA DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica, MEDIANTE LA BIOBALISTICA "

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito parcial para obtener el título de

BIOLOGO

Presenta

EVA LUZ SANCHEZ ALVAREZ

ENSENADA, B. C.

JUNIO DE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

“TRANSFORMACION GENETICA DE LA MICROALGA
Tetraselmis suecica MEDIANTE LA BIOBALISTICA”

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

EVA LUZ SANCHEZ ALVAREZ

APROBADO POR:



DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS
Presidente del Jurado



DRA. MA. DEL REFUGIO GONZALEZ
ESPARZA
Secretario



M.C. ENRIQUE VALENZUELA
ESPINOZA
1er Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la Q. Eva Luz Alvarez Galván por su gran ejemplo como mujer, profesionista y madre. Gracias mamá por todo tu amor, apoyo y comprensión durante todas las etapas de mi vida.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Rodríguez por su gran apoyo moral y económico, sobre todo durante la realización de mi tesis en CINVESTAV-IPN. Gracias papá por levantarme el ánimo cuando más lo necesitaba.

Al Biol. Jose Luis Cabrera Ponce por su excelente asesoría y apoyo durante todo el trabajo de tesis llevado a cabo en el Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del CINVESTAV-IPN.

Su ayuda es invaluable Jose Luis. Muchas Gracias.

Al Dr. Luis Rafael Herrera Estrella por permitirme trabajar en el Lab. de Transformación Genética de Plantas y concluir mi proyecto. Igualmente por su valiosa opinión y correcciones a el presente trabajo de tesis.

A la Dra. Meredith Gould Chambers y Dr. Jose Luis Stephano Hornedo por su gran vocación, iniciativa y apoyo a la investigación. Gracias por la educación brindada al haber sido mis maestros durante la carrera, mis tutores durante el Servicio Social y mis asesores de tesis. Forman una pareja excepcional.

, A la Dra. Marta Martínez García por su brillante ayuda durante la realización de la Técnica de Marcaje no Radiactivo para Southern. Gracias Marta.

A mis compañeros de Laboratorio: Rosa Ma. Rangel Cano, Alicia Rangel Cano, Victor Villegas, Ma. Guadalupe Sánchez, Silvia Solis y Liliana Lopez. Gracias por todo muchachos.

Al Ing. Carlos Mario Valdez por su invaluable amistad y sobre todo por saber escuchar. Gracias Carlos Mario.

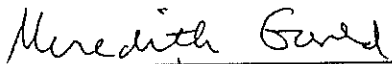
Al Ing. Guillermo Corona por su ayuda técnica en la computadora.

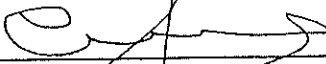
RESUMEN

RESUMEN de la Tesis de Eva Luz Sánchez Álvarez, presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Irapuato, Guanajuato; México. 18 de Marzo de 1998.

"Transformación genética de la microalga: *Tetraselmis suecica*,
mediante la biobalística"

Resumen aprobado:


Dra. Meredith Gould Chambers


Dr. Luis Rafael Herrera Estrella

Se ha desarrollado un sistema de transformación del núcleo de una microalga Chlorophyta: *Tetraselmis suecica*, utilizando la técnica de biobalística. Existen reportes previos sobre transformación génica mediante la biobalística en *Chlamydomonas reinhardtii*, *Vovox carteri*, *Cyclotella cryptica* y *Navicula saprophila*. Los marcadores de selección utilizados en este trabajo son los siguientes: gen Bar que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (PPT), gen HPT que confiere resistencia a higromicina, gen NPT II que confiere resistencia a kanamicina y gen citrato sintasa que confiere resistencia a un medio ácido que contiene aluminio. Se bombardean micropartículas de tungsteno recubiertas de DNA plasmídico (el cual lleva integrado los genes de interés) a presiones entre 1100 y 1600 p.s.i. Solamente se logra la expresión del gen citrato sintasa. Su eficiencia de transformación fluctúa entre 1.4 y 8%. Las microalgas transformadas son capaces de sobrevivir y reproducirse en el medio selectivo F2 de Guillard + AlCl_3 (1mM) con un pH de 5. Como parte de su adaptación a dicho medio, las microalgas adquieren la capacidad de amortiguar el pH entre 0.5 y 2 unidades en dicha escala logarítmica. Las microalgas no transformadas mueren en dicho medio selectivo. La integración del gen citrato sintasa al núcleo de *T. suecica* se comprobó mediante la técnica de transferencia de DNA (Southern Blot) e hibridación con el gen de la citrato sintasa.

ABSTRACT

The development of a stable nuclear transformation system in the green unicellular alga *Tetraselmis suecica* has been achieved by using the biolistic device. In the recent past, the genetic transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*, by biolistics has been reported. The selectable markers used in the present work are: Bar gene, which confers resistance to phosphinotricin (PPT); HPT gene that confers resistance to hygromycin, NPT II gene which confers resistance to kanamycin and citrate synthase gene which confers resistance to an acid environment containing aluminium. Following bombardment of microalgal cells with plasmid-coated tungsten particles at pressures between 1100 and 1600 p.s.i., the only marker that could be used successfully in the selective medium was the citrate synthase gene. Transformants were recovered with an efficiency of 1.4 - 8%. The transgenic microalgae were capable of survival and reproduction in the selective media Guillard F2 + AlCl₃ (1mM) with a pH of 5. As they grew, they developed the capacity of buffering the media between 0.5 and 2 units in the pH scale. The nontransformed microalgae died in the acidified media. The performance of a Southern Blot and hybridization analysis in the aluminium resistant cells of *Tetraselmis suecica* confirmed the integration of the citrate synthase gene sequence into the nuclear genome.

I- INTRODUCCION.

El desarrollo de un sistema de transformación que permita introducir y expresar genes foráneos e integrarlos en forma estable al genoma de algas planctónicas, demarca el inicio de un manejo racional mediante mejoramiento genético de organismos eucariontes pertenecientes al primer eslabón de la cadena alimenticia en el medio acuático (fitoplancton).

Actualmente el campo de la ingeniería genética posee una gran amplitud y su importancia es relevante en múltiples aspectos biotecnológicos. La manipulación genética de las plantas a nivel celular es un excelente ejemplo de ello. La identificación y aislamiento de genes específicos, así como su regulación y expresión, han permitido introducir algunos de ellos en el genoma de plantas. Dichos genes pueden provenir de especies diferentes a la planta receptora e incluso de organismos fuera del reino *Plantae*. Gracias a ello se logra el mejoramiento vegetal en una amplia gama de características, sobre todo para aquellas especies de importancia agronómica.

A la par de estos logros, tenemos la introducción de genes en tejidos animales y el brindar una terapia génica como alternativa al tratamiento médico tradicional. Para ello se evalúa la capacidad regulatoria de ciertos genes hacia mecanismos disfuncionales de fisiología humana y se proponen como candidatos en el mejoramiento de la salud humana.

La biobalística es un método de transformación genética de calidad excepcional: funciona en plantas, hongos, bacterias, insectos, peces y mamíferos. Los tejidos receptores pueden ser bombardeados *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo* (Ning-Sun y Paul, 1994).

Los inconvenientes que poseen los métodos de transformación genética "convencionales", han sido minimizados e incluso eliminados en su totalidad a través de la balística biológica. La especificidad para genotipos o células hospederas, las variaciones inducidas en los cultivos o las dificultades para la regeneración de células o de tejidos desdiferenciados; ya no son consideradas como una barrera en la obtención de tejidos u organismos transgénicos, al utilizar la biobalística (Ning-Sun y Paul, 1994).

Existen varios modelos biolísticos empleados en la transformación genética. Todos ellos utilizan micropartículas de tungsteno o de oro recubiertas del DNA de interés, las cuales son a velocidades supersónicas (dada por una descarga de un helio a la presión deseada) hacia las células blanco. Penetran la pared y membrana celulares, hasta llegar al interior del núcleo, cloroplasto o mitocondria. Cualesquiera de estos organelos puede llegar a integrar los genes de interés en forma transitoria y estable.

Fitoplancton.

La comunidad planctónica está constituida por un gran número de algas unicelulares, coloniales y filamentosas que se encuentran suspendidas en el agua de manera permanente, en donde pueden asociarse a bacterias, hongos, protozoarios y a otros organismos.

Las microalgas son los organismos fotosintéticos que convierten con mayor eficiencia la energía radiante (aproximadamente 7%), lo que les permite lograr productividades de 60-80 ton/ha/año. La mayoría de ellas son fotoautótrofas, aunque algunas son heterótrofas facultativas u obligadas (Cañizarez, 1992). Las aplicaciones que hasta ahora se les ha dado a estos organismos han sido principalmente debido a su biomasa y son mínimas

puesto que su potencial es muy vasto. Se utilizan directamente como alimento en acuicultura, como suplemento de alimento para otros animales, en la producción de fármacos, de pigmentos, enzimas, compuestos isotópicos, glicerol y en el tratamiento de aguas residuales.

El lograr introducir en *Tetraselmis suecica* genes heterólogos y mantener su estabilidad en generaciones subsecuentes, permite establecer un modelo de transformación genética para microalgas en general, pudiendo mejorar o incluir en ellas características permanentes de gran utilidad en aspectos tales como la biorremediación y la biomedicina, así como en modelos de investigación en biología celular y molecular. Dada su gran capacidad de reproducción, obtendríamos millones de clonas con las características deseadas en cuestión de semanas.

Biorremediación.

Hoy en día se desarrolla la llamada biorremediación, la cual considera a las plantas superiores como sistemas solares con capacidad de acumular, procesar y degradar una serie de sustancias. Denota además su actividad de filtrado y bombeo. Integra a ello el fenómeno de fouling. Esta nueva rama de la biotecnología utiliza algunos organismos pertenecientes al reino vegetal para contener o eliminar contaminantes ambientales o simplemente convertirlos en sustancias no tóxicas. (Cunningham y Berti, 1993). Esto nos hace pensar en las microalgas como modelos de ensayo de fitorremediación e incluso ellas mismas (fitorremediación) integradas a dicho campo.

Se sabe por ejemplo, que algunas microalgas producen material orgánico extracelular (polisacáridos) que puede enlazarse con metales en solución, reduciendo o eliminando su toxicidad; ya que la superficie celular

proporciona sitios para su adsorción (Oswald, 1978). El aislamiento y estudio de los genes involucrados en este proceso pudiera convertirse en el punto de partida para utilizar microalgas como agentes quelantes de metales pesados y alternativamente, integrar en ellas genes heterólogos que aumentasen dicha capacidad, creando así un sistema eficaz para la eliminación de metales pesados en ambientes acuáticos altamente contaminados por plomo, mercurio, cobre, etc.

Lluvia ácida.

Otro aspecto digno de atención, es la lluvia ácida como un fenómeno terminal para los seres vivos que habitan miles de lagos en el mundo. La combustión de hidrocarburos en la industria provoca la emisión de dióxido de azufre y de óxidos de nitrógeno hacia la atmósfera. En ella, estos gases se transforman en ácido sulfúrico y nítrico, disminuyendo drásticamente el pH del vapor de agua. Al precipitarse, se crea el fenómeno de la lluvia ácida (ref. 51 y Mohnen, 1988).

La precipitación ácida *per se* no es la causa directa de la mortandad en un lago: existe un efecto aditivo de lluvia ácida e incremento de concentración de aluminio. El aluminio es uno de los metales más comunes en nuestro planeta. Se encuentra combinado con otros elementos en forma natural, lo cual lo hace insoluble en agua y completamente inofensivo para la vida acuática (ref. 52). Al entrar en contacto con la lluvia ácida, se ioniza y adopta una forma extremadamente soluble y altamente tóxica; la cual predomina en pH menores a 5.5. La forma iónica del aluminio existe mientras se de la precipitación de bajos niveles de pH y contribuye de sobremanera a

incrementar la tasa de mortalidad en este ecosistema acuático (ref. 52). Es así como se crea un sinergismo entre la lluvia ácida y el catión aluminio.

La relación entre precipitación ácida y el ion aluminio es muy estrecha. Se especula sobre la posibilidad de que la forma soluble del aluminio posea algún mecanismo de acción que disminuya y/o mantenga el pH ácido en los lagos.

Los organismos afectados en forma primaria en los lagos son los integrantes del fitoplancton (comunicación personal, Cabrera-Ponce*). Al morir éstos, consecuentemente decaen sus consumidores., hasta terminar con la totalidad de integrantes de la vasta cadena alimenticia. Es así como se produce un lago muerto en un periodo de varias décadas o incluso hasta años. Los cambios son tan graduales que difícilmente son notorios en sus etapas iniciales (ref.52).

El crear productores primarios resistentes a un medio ácido, aboga en pro de la repoblación de los lagos muertos.

* Biol. Jose Luis Cabrera Ponce. Laboratorio de Transformación Genética de Plantas. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato, Gto. Correo electrónico: jcabrera@irapuato.ira.cinvestav.mx

II- ANTECEDENTES

Transformación genética.

Transformar genéticamente significa adicionar información génica a un genoma silvestre, novedosa para su fisiología original. Transferir un nuevo gen o grupo de genes en una célula la posibilita en la obtención de nuevas propiedades o mejora sus propiedades intrínsecas.

La transformación genética implica la introducción de genes en una célula o tejido e involucra a un vector (plásmido, cósmido o fago), el cual lleve integrado el o los genes que se deseen transferir. Las células o el tejido candidatos a la transformación deben poseer óptimas condiciones.

Cualquier técnica de transformación debe ser sencilla, eficiente y reproducible. La integración de las secuencias transgénicas en el genoma receptor será estable.

Genes de selección y genes reporteros.

La selección de clones transformantes es un punto clave para el éxito de la técnica, por lo que se deben extremar cuidados en la elaboración del sistema de selección. Un agente de selección es aquel que nos permite detectar las células transgénicas de las no transformadas. Puede ser un antibiótico (higromicina, kanamicina, geneticina) o un herbicida (bialafos, glifosato), la actividad de cada uno de ellos está dada por un gen marcador de selección.

Un gen reportero, como su nombre lo indica nos informa si el gen de interés transferido, se ha integrado o no al genoma tratado. En teoría el gen

reportero se integra de manera conjunta con el gen de interés, ya que ambos forman parte del vector de transformación.

Métodos de transformación genética.

Un método de selección es el que promueve las condiciones fisiológicas y fisicoquímicas óptimas del cultivo celular o tejido previamente sometido a una técnica de transformación; para detectar de manera específica a las clonas transgénicas.

La habilidad para transformar genéticamente a un organismo, le confiere un amplio potencial tanto para su manipulación génica como para su aplicación práctica.

Existen una serie de métodos de transformación genética para núcleo, mitocondrias y cloroplastos; aplicables a organismos pertenecientes a diferentes *filas*:

- 1) El sistema de *Agrobacterium tumefaciens* es un método indirecto que utiliza dicha bacteria como vector biológico, capaz de infectar y transmitir un fragmento de su propio plásmido. A este se le agregan los genes deseados y mediante un cocultivo con las células candidatas a la transformación, se lleva a cabo la transferencia.
- 2) La electroporación de protoplastos o de células intactas, utiliza pulsos de corriente eléctrica para abrir canales en la membrana celular en forma transitoria e introducir el DNA de interés.
- 3) El polietilenglicol (PEG) y el fosfato de calcio, así como la poly-L-ornitina, ayudan a transformar protoplastos al inducir cierta permeabilidad en la membrana y permitir el libre paso de DNA. La microinyección utiliza células

inmovilizadas para internalizar el DNA directamente, al inyectarlo a cada célula blanco de manera individual.

4) Las fibras de silicón carbonatadas, a las cuales se adhiere el DNA, penetran directamente al interior de la célula, al aplicarles agitación mediante vortex.

5) La agitación en presencia de microesferas de vidrio igualmente, permite la integración de DNA por vía mecánica, al aplicar vortex al cultivo celular en presencia del DNA transformante y las microesferas.

6) La biobalística es un método directo de transformación genética, el cual se rige por el principio del envío de micropartículas de tungsteno u oro, recubiertas de DNA a velocidades alrededor de 300 m/s, mediante las cuales pueden penetrar pared y membrana celular e introducir el material genético en células vivas, para su posterior expresión e incorporación estable, ya sea en núcleo, cloroplasto o mitocondria (Ning-Sun y Paul, 1994).

Biobalística

Es en 1987, cuando John Sanford y su equipo de trabajo en la Universidad de Cornell logran establecer las bases de la balística biológica. A partir de esta fecha se inicia el auge de dicha tecnología, ya que este novedoso método desplaza a los anteriores en cuanto a eficiencia y funcionalidad. Es directo, fácilmente reproducible y de notoria sencillez, tanto en infraestructura como en manejo. Exitoso en introducir DNA en bacterias, en el núcleo de hongos, algas, plantas superiores y animales; en mitocondrias de levaduras y algas, cloroplastos de algas y plantas superiores (Ning-Sun y Paul, 1994). Hasta hoy su mayor relevancia ha sido en la agricultura, aunque su aplicación va más allá de este campo. Se ha probado directamente en tejidos como en la piel, hígado, músculo y páncreas en mamíferos vivos; se

discute su aplicación en tratamiento contra el cáncer y algunas enfermedades infecciosas. Se ha experimentado asimismo en su aplicación hacia la inmunización genética en sistemas animales (Ning-Sun y Paul, 1994).

Transformación genética de microalgas.

La habilidad de la ingeniería genética para manipular las microalgas en cuanto a formación de productos, facilita la producción de líneas con las características deseadas (Dunahay, 1993). *Chlamydomonas reinhardtii* fue la primer microalga transformada genéticamente: Rochaix y Dillewijn en 1982 logran transformar su núcleo utilizando DNA de levadura, mediante el tratamiento con PEG y poly-L-Ornitina. Otros métodos como son la electroporación (Brown *et al*, 1991; Keller, 1995; Tang *et al*, 1995), la agitación con microesferas de vidrio (Kindle, 1990; Blankenship y Kindle, 1992; Hall *et al*, 1993; Sizova *et al*, 1996; Stevens *et al*, 1996; Cerutti *et al*, 1997) y las fibras de silicón carbonado (Dunahay, 1993; Dunahay *et al*, 1997); se han reportado como capaces de transformar a *Chlamydomonas reinhardtii*.

Boynton y cols. en 1988 transforman el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, con el gen *atpB*, el cual codifica la subunidad β del complejo CF1 de la enzima cloroplástica adenosintrifosfato sintasa. Las células receptoras fueron 3 mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* con defectos en la fotosíntesis. El bombardeo con el gen homólogo *atpB* produjo células fotosintéticas competentes. Se obtuvo una frecuencia de transformación de 1.9×10^{-6} a 4.2×10^{-6} (aproximadamente 10 a 20 transformantes por microgramo de DNA aplicado). Esto es 8 cloroplastos transformados de cada 10^6 células tratadas.

Asimismo, en 1989, Kindle y cols. logran la transformación estable del núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizando el gen homólogo nit 1, que codifica para la enzima nitrato reductasa. Dicho gen se introdujo en mutantes nit 1, que carecían de ésta actividad enzimática y se obtuvieron células transformantes con una tasa de 15 por μg de plásmido lineal o superenrollado usado. Uno de sus hallazgos fue que el DNA transformante se integra al genoma en copias múltiples. El fenotipo nit⁺ y el DNA transformante permanecen estables durante la mitosis y meiosis, incluso en ausencia de selección. En este mismo año Debuchy y cols. utilizan el gen homólogo ASL (arginosuccinato liasa) para transformar el núcleo de *Ch. reinhardtii* (auxótrofos para arginina). El producto de este gen convierte el arginosuccinato en arginina y fumarato. Se bombardearon placas con 10⁷ células aproximadamente y se obtuvieron en cada placa de 20 a 50 colonias transgénicas. En 1990 Mayfield y Kindle transforman nuevamente el núcleo de *Ch. reinhardtii* utilizando el gen homólogo OEE1, el cual regula la producción de oxígeno durante la fotosíntesis. Las células transgénicas recuperaron su capacidad fotosintética. La tasa de transformación corresponde a la quinta parte de la tasa de reversión.

Day y cols. en 1990 transforman el núcleo de esta misma alga utilizando el plásmido pAD10 (contiene el gen hph que confiere resistencia a la higromicina y al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). Bombardean células previamente transformadas con el gen ASL. No reportan tasa de transformación.

La transformación mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* se logra en 1993 por Randolph-Anderson y cols. Utilizan el gen homólogo apocitocromo

b (CyB) para el bombardeo de mutantes *dum-1* con deficiencias en la cadena respiratoria e incapaces del desarrollo en ausencia de luz. Las células transgénicas crecen en oscuridad. Se obtuvieron colonias transgénicas con una frecuencia de transformación de 7.3×10^{-7} .

Otro experimento bajo condiciones similares al de Kindle y cols. (1989) fue realizado por Schiedlmeier y cols. en 1994. Utilizaron el gen *nit A+* clonado de *Volvox carteri*, que codifica para la enzima nitrato reductasa. Bombardearon micropartículas de oro recubiertas de DNA, hacia los mutantes *nit A-*. Lograron una transformación estable del núcleo de las gonidias de *Volvox carteri*. Las transformantes putativas fueron capaces de utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno y se recuperan con una frecuencia de 2.5×10^{-5} . El plásmido utilizado (pMN24) se integra al genoma en copias múltiples en lugares diferentes al locus *nit A*. Se obtienen cotransformantes con un 40-80% de frecuencia cuando se cobombardea con un marcador selectivo y uno no selectivo.

Dunahay y cols. en 1997 reportan el bombardeo de dos especies de diatomeas: *Cyclotella cryptica* y *Navicula saprophila*; con miras a la obtención de microalgas productoras de biodiesel en gran escala. Utilizan el gen bacteriano que confiere resistencia a la geneticina (NPT II), éste posee en sus flancos secuencias promotora y terminadora provenientes de *acc1* de *Cyclotella cryptica*. El gen *acc1* codifica para Acetil CoA carboxilasa (conversión del acetil CoA en malonil CoA en la síntesis de ácidos grasos). Las transformantes se seleccionaron de acuerdo a su resistencia adquirida a la geneticina. Sus patrones de hibridación sugieren que el DNA recombinante se integra al azar en uno o varios sitios del genoma. Se analizaron extractos

crudos para la presencia de neomicinfosfotransferasa mediante el Western Blotting; el cual mostraba la síntesis de dicha proteína. El número de transformantes es de 1-18 por placa en selección a partir de 3×10^8 células en cada placa.

En Enero de 1997 surge un reporte de integración del gen eubacteriano *aadA* al genoma de *Ch. Reinhardtii* (Cerutti *et al.*, 1997a). Dicho gen confiere resistencia a la espectinomicina y está fusionado a las regiones 5' y 3' del gen endógeno *RbcS2*. Utilizan la técnica de biobalística y la de microesferas de vidrio. Reportan frecuencias de transformación similares para las 2 técnicas: 5 a 30×10^{-8} .

Todos estos logros han sido limitados por razones de baja eficiencia de transformación y de expresión, así como reversión de clonas putativas. La introducción de genes heterólogos ha reportado mayor grado de dificultad debido a su inestabilidad en las clonas transformadas. Los promotores o secuencias génicas utilizadas, la técnica de selección o el silenciamiento de genes pudieran ser los causantes de la baja calidad en los métodos de transformación genética de microalgas.

Actualmente, el utilizar genes foráneos regulados por promotores heterólogos eficaces, en la transformación de microalgas, se torna el paso a seguir. Asimismo es imperativo mejorar la calidad de selección y elevar la tasa de transformación genética.

III- HIPOTESIS

La introducción de genes foráneos con promotores heterólogos y su integración estable al genoma de microalgas, es posible mediante la técnica de transformación genética directa llamada biobalística.

IV-OBJETIVOS

1.-OBJETIVO GENERAL:

Elaborar un protocolo de transformación genética para *Tetraselmis suecica*.

2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Establecer un sistema de selección, basado en el uso de secuencias promotoras y genes heterólogos en el genoma de *Tetraselmis suecica*
- Obtener clonas transgénicas puras de *Tetraselmis suecica*.
- Demostrar la integración y expresión del gen citrato sintasa en el genoma de *Tetraselmis suecica*.

V- METODOLOGIA

1.- DESCRIPCION DEL MATERIAL BIOLOGICO:

Tetraselmis suecica es una microalga silvestre, ancestral; perteneciente al fitoplancton marino. Kylin la describe por primera vez en 1935, a partir de especímenes provenientes de Kristineberg (Costa Oeste de Suecia).

La cepa utilizada para este trabajo, proviene originalmente de la Bahía de Ensenada y ha sido subcultivada durante generaciones en el Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Ensenada. B.C. México.

a) Taxonomía. (ref. 53)

División: Chlorophyta o Chlorophycophyta.

Clase: Chlorophyceae o Prasinophyceae.

Orden: Volvocales.

Familia: Chlamydomonadaceae.

Género: *Tetraselmis*

Subgénero: *Parviselmis*

Especie: *suecica*

b) Características morfológicas (ref.53):

Células verde brillante, fusiformes, con 4 flagelos polares, extremo posterior agudo y extremo anterior de 4 lóbulos. Mide 4 a 9 μ de diámetro y 10-16 μ de longitud.

Es común encontrarlas como:

- células individuales, móviles, con teca o pared y flagelos.
- células individuales o colonias con o sin pedúnculo, carentes de flagelos. Sésiles. Los pedúnculos se componen de restos de pared celular (pedúnculos segmentados) o de otros materiales (sin segmentos). Su forma menos comun es la de quiste o espora.

Posee por lo menos 3 etapas en su ciclo de vida (Provasoli *et al*, 1968; Kobara y Hori, 1975; Tanoue y Aruga, 1975):

(1) Estadio flagelado con pared celular delgada monoestratificada, (2) estadio inmóvil o fase vegetativa, con pared de varios estratos celulares y (3) quiste de pared gruesa, ornamentada y sin flagelos; el cual al germinar se divide en 4 células.

Los flagelos son ligeramente de menor longitud que el cuerpo celular, emergen de una hendidura polar, están conectados al núcleo y se recubren de escamas y de mucílago.

Cada célula contiene un pirenoide, localizado en la región media y embebido en el cloroplasto, el cual abarca la mayor parte del volumen celular y tiene forma de copa. Las mitocondrias son aplanadas y el núcleo se halla en posición central. (Norris *et al*, 1980).

c) Reproducción.

No hay evidencias de reproducción sexual, se considera para fines prácticos una mitosis. *Tetraselmis suecica* pierde sus flagelos y se divide en el estadio inmóvil. La división de organelos ocurre inmediatamente antes de la división nuclear. Las escamas se forman durante la profase en las vesículas del aparato de Golgi y se acumulan progresivamente en orden posteroanterior

en la membrana celular. La teca se forma por la deposición de dichas escamas en la membrana, durante o inmediatamente después de la citocinesis y está compuesta principalmente de material pectinoide: galactosa, ácido galacturónico y arabinosa. (Norris *et al*, 1980., Lewin, 1958., Gooday, 1971).

d) Características fisicoquímicas. (Paniagua *et al*, 1989; ref. 53).

Tetraselmis suecica es una especie eurihalina con un amplio rango de tolerancia a variables físicas. Sus óptimas condiciones de crecimiento son 25-30 ppm de salinidad, 18-27°C de temperatura, pH 8-8.5 y luz continua. En diferentes concentraciones de nutrientes modifica su composición bioquímica celular. Contiene ácidos grasos poliinsaturados: C20:5 (EPA, ácido eicosapentaenoico) y C22:6 (DHA, ácido docosahexaenoico) (Thompson *et al*, 1988).

e) Usos.- Se utiliza como alimento de larvas de moluscos y crustáceos. Presenta actividad antifúngica (Kellam *et al*, 1988).

f) Importancia ecológica.- Como integrante del fitoplancton forma parte del primer eslabón de la cadena trófica en el medio acuático.

2.- DESCRIPCION DE LOS PLASMIDOS UTILIZADOS:

2.1- pBarGUS. Esta constituido por:

- a) El promotor CaMV 35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor).
- b) El gen Bar, proveniente de *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica para la enzima fosfinotricinacetil-transferasa (PAT), la cual inactiva a la fosfinotricina o PPT y permite el crecimiento de células transformadas en presencia de dicho herbicida (Fromm *et al*, 1990).

c) El gen que codifica para la enzima β -Glucoronidasa (GUS), proveniente de *Escherichia coli*. Este es un gen reportero muy utilizado en plantas. Las células que lo expresan se tornan azules en la presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucorónido (X-GLUC). (Fromm *et al.*, 1990)

2.2 - pWRG1515.

Contiene al gen que codifica para la enzima higromicina-fosfotransferasa o HPT (confiere resistencia a higromicina) proveniente de *Escherichia coli* y al gen β -glucoronidasa o GUS; bajo el control del promotor CaMV 35S (Datla *et al.*, 1991) y de la región terminadora 3' de la nopalino-sintetasa (Christou *et al.*, 1991).

2.3- pBI426.

Está basado en el plásmido pUC9. Contiene una fusión génica GUS-NPT II, que proporciona actividad de GUS y resistencia a kanamicina (al codificar para la enzima neomicin-fosfotransferasa II) respectivamente; provenientes de *E. coli*. Se encuentran bajo el control de un doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Datla *et al.*, 1991).

2.4- pB2.

Contiene la secuencia codificadora del gen citrato-sintasa (confiere resistencia a el aluminio en pH ácido) de *Pseudomonas aeruginosa* (Csb) (Donald, 1989) y al gen NPT II (confiere resistencia a kanamicina) proveniente de *Escherichia coli*, fusionados al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia nos 3' terminadora (De la Fuente *et al.*, 1997). La enzima citrato sintasa cataliza la formación de citrato, el cual es un agente quelante para el ion aluminio.

3.-PREPARACION DE MICROALGAS COMPETENTES PARA EL BOMBARDEO.

- Esta preparación se llevó a cabo en el Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Unidad Irapuato, Guanajuato.

3.1- Cultivo celular:

- a) Inocular 30 mL de un cultivo stock de *Tetraselmis suecica* en 450 mL de F2 de Guillard (Apéndice 1).
- b) Incubar a 19°C en condiciones de luz continua, durante 72 horas.
- c) Airear el cultivo, destapándolo en campana de flujo cada 24 horas durante 10 minutos.

3.2- Filtrado celular:

- a) Recortar varios círculos de papel filtro Whatman 3MM de 1 cm de diámetro y colocar cada uno dentro de una unidad de ultrafiltración, envolver en papel aluminio y esterilizar.

Se procede a trabajar en campana de flujo laminar:

- b) Enroscar el aparato de ultrafiltración en la punta de una jeringa.
- c) Filtrar lentamente 10 mL del cultivo celular (25×10^6 células).
- d) Repetir el procedimiento hasta preparar 12 filtros impregnados de microalgas.
- e) Extraer el filtro impregnado de microalgas y cortarlo en 4 partes iguales (2 de ellas se destinan a el bombardeo y las restantes funcionan como controles negativos).

- f) Colocar 2/4 partes de el primer filtro en una caja petri con F₂ de Guillard + agar (5 g/L) pH 8.5. En esta misma caja colocar otras 2/4 partes provenientes de un segundo filtrado bajo las mismas condiciones (Fig 1).
- g) Repetir el procedimiento con cada uno de los filtros, de manera que en cada caja petri se tendrán 2 poblaciones diferentes (o provenientes de filtrados diferentes). Sus homólogas (fracciones idénticas) se encuentran separadas de ellas en otra placa como poblaciones control.
- h) Numerar cada una de las fracciones filtradas en orden progresivo, conforme se vayan obteniendo. En total, se obtienen 12 placas para bombardeo y 12 para control (los controles además de su número se marcan con un apóstrofe). (Tabla II, Parámetros del Bombardeo)

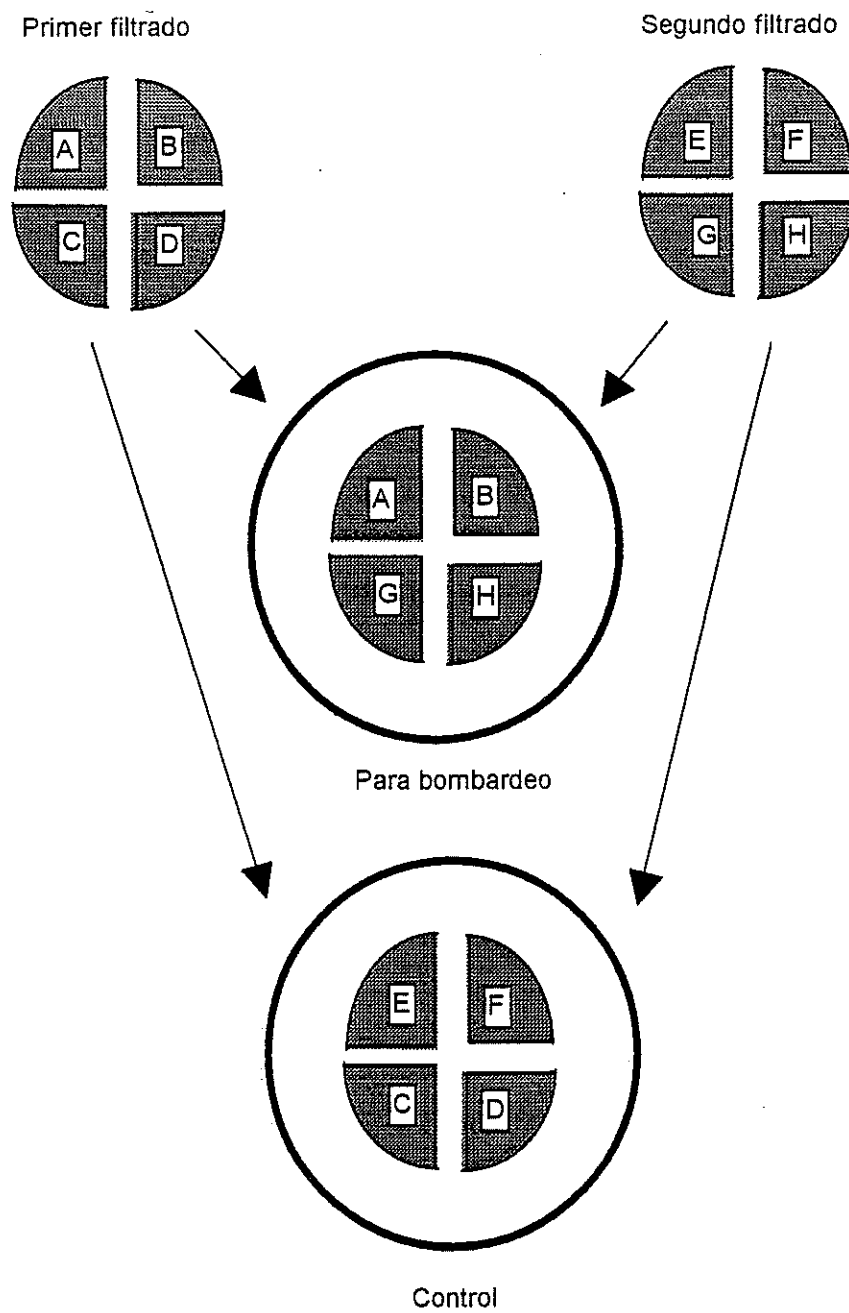


Fig. 1. Fraccionamiento equitativo de la población filtrada

4.-TRANSFORMACION GENETICA MEDIANTE EL BOMBARDEO:

•Se utilizó el Sistema Biolístico de Helio PDS 1000 de alta presión (Bio-Rad).

4.1.-Descripción general del Sistema PDS 1000 (Figura 2):

- a) Su funcionamiento se basa en el envío (hacia células o tejido que se deseen transformar) de micropartículas (microproyectiles o microcargadores) recubiertas de DNA con cierto grado de aceleración, dado por la presión ejercida (450-2200 P.S.I.) de una descarga de helio hacia el sistema.
- b) Para acelerar los microcargadores y que adquieran un momentum (masa x velocidad) suficiente para penetrar a la células blanco, se utilizan macrocargadores (membranas circulares de kapton) que llevan colocados cuidadosamente los microproyectiles sobre su superficie y que son impulsados a velocidades supersónicas. (Sanford, 1990).
- c) El sistema se conecta a un tanque de helio, a una bomba de vacío (regulados por una válvula solenoide) y a una toma de corriente eléctrica.
- d) Se compone de una cámara principal en cuyo interior se lleva a cabo el bombardeo de micropartículas hacia las células blanco.
- e) Se crea cierto vacío (20-30 mm de Hg) previo a cada disparo para lograr una mejor expansión del helio y para minimizar la fuerza de fricción del aire.
- f) En la parte superior de la cámara, se encuentra un tubo de entrada del gas propulsor con su respectivo manómetro. En la parte final del tubo que va en dirección a la cabina se colocan las membranas de ruptura, capaces de soportar cierta presión hasta romperse. Esto indica que se ha llegado a la presión de disparo desada.
- g) Al realizar cada disparo, el helio viaja unos cuantos cm y choca contra el macrocargador, enviándolo hacia una malla de retén. Esta malla de acero

detiene al macrocargador en el momento del disparo. Los microproyectiles que porta dicho cargador, salen impulsados hasta llegar a su destino final que son las células blanco.

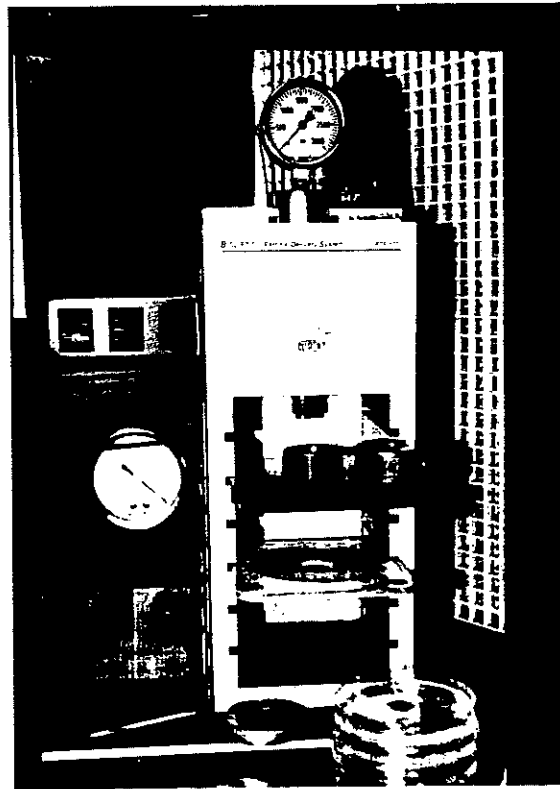


FIGURA 2: Sistema PDS 1000

4.2 - CONDICIONES DEL BOMBARDEO.

4.2.1-PROTOCOLO PARA LA PREPARACION DE PARTICULAS DE TUNGSTENO (Técnica de Tomes *et al*, 1995. Modificada por Cabrera-Ponce, CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato):

- a) Pesar **60 mg de partículas de tungsteno** (GTE Products Corp.) de 1.8μ , colocarlas en un tubo de centrifuga de 15 mL de capacidad.
- b) Agregar 2 mL de HNO_3 (0.1M), sonicar en hielo 20 minutos.
- c) Eliminar el HNO_3 . Agregar 1 mL de agua desionizada estéril y transferir la muestra a un tubo de 2 mL, sonicar brevemente.
- d) Centrifugar las micropartículas 10 a 30 segundos a 10,000 rpm.
- e) Eliminar el agua. Agregar 1mL de etanol al 100%, sonicar brevemente.
- f) Centrifugar las micropartículas 10 a 30 segundos a 10,000 rpm.
- g) Eliminar el etanol. Agregar 1mL de etanol al 100% y sonicar brevemente.
- h) Centrifugar las micropartículas 10 a 30 segundos a 10,000 rpm.
- i) Eliminar el etanol. Agregar 1 mL de agua desionizada estéril, sonicar brevemente.
- j) Colocar 250 μL de la suspensión en tubos eppendorf (Se producen 4 tubos, cada uno con **15 mg de tungsteno**).
- k) Agregar 750 μL de agua desionizada estéril en cada tubo.
- l) Conservarlos a -20°C

4.2.2-RECUBRIMIENTO DE LAS MICROPARTICULAS CON DNA (Tomes *et al*, 1995. Modificado por Cabrera-Ponce, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato).

- a) Sonicar las partículas de tungsteno.
- b) Agregar los siguientes componentes en un tubo eppendorf estéril (1 tubo para cada preparación de DNA (Tabla 1), del cual se obtienen 6 disparos), en el orden indicado a continuación:

- 1.- 50µL de tungsteno (**750 µg**)
- 2.-10µg de DNA total (para el DNA 1, DNA 2 y DNA 3 se agrega 3.5 µg de cada plásmido)
- 3.- 50 µL de CaCl₂ (2.5M)
- 4.- 20µL de espermidina (0.1M)

TABLA I: Preparaciones de DNA para bombardeo

a) DNA 1	b) DNA 2	c) DNA 3
• pWRG1515.	• pWRG1515.	• pWRG1515.
• pBI426	• pBarGUS	• pBarGUS
• pBarGUS.	• pB2	

Se desarrollan 3 mezclas diferentes de plásmidos de acuerdo a las posibles características conferidas por cada DNA.

- c) Sonicar brevemente.
- d) Centrifugar 10 segundos a 10,000 rpm.
- e) Eliminar el sobrenadante.
- f) Agregar 250 µL de etanol al 100%, sonicar.
- g) Centrifugar 10 segundos a 10,000 rpm.
- h) Eliminar el sobrenadante.
- i) Agregar 60 µL de etanol al 100%.
- j) Sonicar hasta observar que el aspecto de las micropartículas sea homogéneo.

k) Colocar en las membranas de kapton (macrocargadores) 10 μ L de la preparación (**125 μ g de tungsteno asociado con 1.6 μ g de DNA por cada disparo**)

4.3- TECNICA DE BOMBARDEO:

- a) Encender el sistema.
- b) Abrir el tanque de helio (1,800 P.S.I. de presión).
- c) Colocar las membranas de ruptura (cada membrana soporta 400 P.S.I de presión) de acuerdo a la presión deseada, en la parte final del tubo propulsor de helio.
- d) Colocar el macrocargador (invertido) dentro de un anillo de acero (de manera que los microcargadores puedan salir disparados en dirección a las microalgas). La distancia de separación (hacia abajo) con respecto a las membranas de ruptura es **1.2 cm.** .
- e) Colocar las células competentes expuestas (caja petri destapada) **5.8 cm** por debajo de la malla retenedora.
- f) Cerrar la cabina herméticamente.
- g) Crear un vacío de **23 pulgadas de mercurio** dentro de dicha cámara.
- h) Mantener el vacío y realizar el primer disparo a **1600 P.S.I** de presión (manejar 1 disparo por placa). Eliminar el vacío.
- i) Abrir la cámara y sacar las microalgas bombardeadas.
- j) Seguir con el procedimiento de bombardeo con las poblaciones subsecuentes Se bombardean en total 3 tipos de DNA: 4 poblaciones microalgales por cada DNA según se muestra en la Tabla II.

- k) Las poblaciones de *Tetraselmis suecica* que funcionan como controles negativos, se mantienen intactas.
- l) Como controles positivos se utilizan callos embriogénicos de la cepa de maíz 560L Hi II. Estos se bombardean a 800 P.S.I.
- m) Incubar las poblaciones microalgales bombardeadas y controles negativos a 19°C en condición de luz continua por un lapso de 24 horas y las poblaciones de maíz, a 25°C en oscuridad.

TABLA II: PARAMETROS DEL BOMBARDEO

POBLACION	VOLUMEN	DNA	PRESION
1	10 mL	1	1600 psi
1'	10 mL	control neg.	
2	10 mL	1	1600 psi
2'	10 mL	control neg.	
3	10 mL	1	1600 psi
3'	10 mL	control neg.	
4	10 mL	1	1600 psi
4'	10 mL	control neg.	
5	10 mL	2	1600 psi
5'	10 mL	control neg.	
6	10 mL	2	1600 psi
6'	10 mL	control neg.	
7	10 mL	2	1600 psi
7'	10 mL	control neg.	
8	10 mL	2	1600 psi
8'	10 mL	control neg.	
9	10 mL	3	1600 psi
9'	10 mL	control neg.	
10	10 mL	3	1600 psi
10'	10 mL	control neg.	
11	10 mL	3	1600 psi
11'	10 mL	control neg.	
12	10 mL	3	1600 psi
12'	10 mL	control neg.	
13		control posit.	800 psi

Se bombardean 12 poblaciones con sus respectivos controles a 1600 psi de presión.

5.-ENSAYO HISTOQUIMICO PARA DETECTAR EXPRESION TRANSITORIA:

Este ensayo se realiza 24 horas después del bombardeo.

- a) Para detectar la integración del gen GUS: incluir en 70 µL de una solución de X-Gluc (5-Bromo-4-cloro-3-indolylβ-D-glucorónido), la octava parte de cada población impregnada en el filtro bombardeado. Igualmente para las poblaciones control negativo.
- b) Para los controles positivos tomar la cuarta parte de cada población bombardeada y colocarla en 70 µL de X-Gluc.
- c) Incubar durante 24 horas en oscuridad a 37°C.

6.-ENSAYOS DE SELECCION

6.1- ESTRATEGIAS DE SELECCION:

- a) Selección en higromicina y bialafos. (para detectar integración de pWRG1515 y pBarGUS).
- b) Selección en bialafos, higromicina y kanamicina. (para detectar integración de pBarGUS, pWRG1515 y pBI426).
- b) Selección en higromicina, bialafos, kanamicina, aluminio y/o pH ácido. (para detectar integración de pWRG1515, pBarGUS, pBI426 y pB2).

6.2 -Selección general.

- a) Inocular la octava parte de cada población filtrada y bombardeada en 500 µL (tubos eppendorf) de F₂ de Guillard líquido + bialafos (3 mg/L) + higromicina (100 mg/L). pH 8.5
- b) Incubar a una temperatura de 19°C con luz continua durante 15 días.
- c) Aplicar vortex diariamente (para integrar las microalgas a la fase líquida)

- d) Airear los tubos durante 5 minutos cada 24 horas, destapándolos en una campana de flujo laminar.
- e) Numerar cada tubo e indicar que DNA les fue bombardeado.
- f) Subcultivar a medio fresco: tomar 50 μ L de cada población e inocular 500 μ L del medio mencionado en inciso a).
- g) Incubar a 19°C con luz continua durante 15 días.

6.3.-Selección específica:

- a) Inocular 50 μ L del volumen total de cada tubo en selección general (tomar células de la parte media superior del tubo), en 500 μ L de medio fresco en el orden indicado a continuación:

Para las poblaciones provenientes del bombardeo con

DNA 1:

- F₂ de Guillard + bialafos (3 mg/L) + kanamicina (150 mg/L)
pH 8.5.
- F₂ de Guillard + bialafos (3 mg/L) + higromicina (100 mg/L) pH 8.5

Para las poblaciones provenientes del bombardeo con

DNA 2:

- F₂ de Guillard + bialafós (3 mg/L) + higromicina (100 mg/L).
pH 5.6 (utilizar HCl como agente acidificante).
- F₂ de Guillard + bialafós (3 mg/L) + kanamicina (150 mg/L). pH 5.6 (utilizar HCl como agente acidificante)

Para las poblaciones provenientes del bombardeo con

DNA 3:

- F₂ de Guillard + bialafós (3 mg/L) + higromicina (100mg/L).

pH 8.5

- b) Incubar a 19°C en condiciones de luz continua durante un periodo de 15 días.

6.4-Administración de un regulador de crecimiento en medio sólido.

- a) Preparar en sólido los medios selectivos de paso 6.2. utilizando fitagar (5 g/L) como agente gelificante.

- b) Agregar BAP (10 mg/L) a cada uno de ellos.

- c) Preparar un medio selectivo sólido con PPT y kanamicina en altas concentraciones:

•F₂ de Guillard + BAP (10 mg/L) + fosfotricina o PPT (8 mg/L) + kanamicina (300 mg/L). pH 6 (acidificado con HCl).

- d) Escoger las poblaciones en selección específica, de mejor calidad.

- e) Homogeneizar cada población.

- f) Tomar una asada y estriar la superficie del medio correspondiente en placa. Contigua a la estría colocar una gota de 60 µL de la misma población (técnica de sembrado por goteo).

- g) Incubar a 19°C, en condiciones de luz continua por un periodo de 5 días.

- h) Observar aparición de colonias, morfología y número de las mismas en cada placa en selección.

i) Tomar la mejor selección proveniente del bombardeo con DNA 2 : 70 colonias color verde brillante que han crecido en el medio selectivo con altas concentraciones de PPT y kanamicina.

j) Resembrar estas colonias por estría:

- Tomar 10-20 colonias por asada y formar una sola estría a lo largo y ancho de una caja petri.
- Se siembra un total de 6 cajas: 3 de ellas contienen el medio F₂ de Guillard + agar (7g/L) + bialafós (3mg/L) + BAP (10 mg/L) + kanamicina (150 mg/L) con un pH 6 (acidificado con HCl) y las restantes, el medio F₂ de Guillard + agar (7 g/L) + bialafós (3 mg/L) + BAP (10 mg/L) + higromicina (100 mg/L). pH 6 (acidificado con HCl).
- Incubar a 19°C en condiciones de luz continua.
- Observar aparición de nuevas colonias en cada estriado.
- Realizar resiembras con esta misma técnica durante 3 generaciones más.

6.5-Administración de un regulador de crecimiento en medio líquido ácido.

- Propagar las mejores selecciones de las poblaciones anteriores, en medio líquido F₂ de Guillard + bialafós (3mg/L) + BAP (10 mg/L) + kanamicina (150 mg/L) pH 5.6 (acidificado con HCl) y F₂ de Guillard + bialafós (3mg/L) + BAP (10 mg/L) + higromicina (100 mg/L) pH 5.6 (acidificado con HCl).
- Tomar 5-10 colonias e inocular 1 mL de medio fresco.
- Incubar a 19°C con luz continua.
- Agregar medio fresco cada 72 horas, hasta llegar a un volumen de 20 mL. Mantener cultivos stock de cada población.

6.6-SELECCION ESTRUCTA EN MEDIO ACIDO CON ALUMINIO

- **Cultivo inicial.**

- a) Tomar 7.5 mL de las mejores poblaciones seleccionadas en medio líquido ácido fitoregulado con BAP e inocular 7.5 mL de F₂ de Guillard fresco.
- b) Agregar AlCl₃ (1mM). Esta concentración de cloruro de aluminio acidifica el medio a pH 5. (El pH de los medios se midió con un eléctrodo calibrado.)
- e) Incubar a 19°C en condiciones de luz continua durante 21 días.
- f) Cuantificar el pH del medio diariamente.
- g) Realizar observaciones al microscopio de las células en selección.
- h) Aumentar el número de controles negativos, añadiendo 5 cepas silvestres provenientes de cultivo stock sin tratamientos selectivos previos y otras 5 sometidas a varios tratamientos.

- **Subcultivos**

- a) Tomar 2 mL de cada población expuesta a aluminio e inocular 5 mL de medio fresco F₂ de Guillard + 1mM de AlCl₃.
- b) Incubar a 19°C en condiciones de luz continua durante 2 semanas.

- **Propagación de clones resistentes a la acidez por aluminio.**

- a) A las poblaciones en selección del cultivo inicial (incluyendo subcultivos) añadir 3 mL de medio de cultivo (F₂ + 1mM de AlCl₃ pH 5) fresco cada 72 horas.
- b) Si se requiere, agregar más AlCl₃ para llevar el pH a 5. Trabajar en rangos de 1 a 1.6 mM de AlCl₃.

- c) Cuantificar el pH de cada población bajo 3 condiciones:
- Inmediatamente antes de agregar medio fresco
 - Inmediatamente después de agregar medio fresco y
 - 24 horas después de agregar el medio
- d) Incubar a 19°C en condiciones de luz continua, manteniendo los cultivos en propagación por un periodo de 15-20 días.

• **Cultivo fitorregulado.**

- a) Agregar BAP (10 mg/L) a todas las poblaciones resistentes a aluminio. Incubar en condiciones estandar durante 2 días.
- b) Agregar un volumen de 3 mL de F₂ de Guillard + 1mM de AlCl₃ + BAP (10mg/L) cada 72 horas, a éstas mismas poblaciones.
- b) Cuantificar el pH bajo las condiciones del inciso c) anterior..
- c) Incubar a 19°C con luz continua por un lapso de 2 semanas.

7.-ANALISIS DEL DNA

7.1-EXTRACCION DE DNA GENOMICO DE *Tetraselmis suecica* (Técnica de Shure *et al* ,1983. Modificada para microalgas por Cabrera-Ponce, CINVESTAV-IPN).

- a) Homogeneizar las poblaciones en selección, mediante agitación leve.
- b) Tomar alícuotas de 2 mL, colocarlas en tubos eppendorf y centrifugar a 10,000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

- c) Repetir el paso b), las veces necesarias hasta obtener una pastilla de microalgas, de 1 mm de grosor aproximadamente. Cada vez que se retiren los tubos de la centrifuga, colocarlos en hielo (para evitar degradación del DNA por nucleasas).
- d) Congelar los tubos (incluyendo controles) en nitrógeno líquido.
- e) Macerar la pastilla utilizando una varilla de vidrio (congelada), la cual forma parte de un sistema homogeneizador.
- f) Mantener la pastilla congelada durante el proceso de macerado.
- g) Agregar a cada tubo, 500 μ L de buffer de extracción de urea e incubar a temperatura ambiente durante 20-60 minutos.
- h) Colocar el tubo eppendorf, de manera que la varilla de vidrio se adhiera a su pared interna. Esto sucede al formarse una capa de hielo dentro del tubo, la cual mantiene la fuerza de unión.
- i) Activar la varilla y homogeneizar cada muestra.
- j) Agregar 500 μ L de fenol-cloroformo para separar los ácidos nucleicos del resto de sustancias celulares.
- k) Invertir los tubos varias veces hasta obtener una sola fase.
- l) Centrifugar durante 7 minutos a 15,000 rpm a temperatura ambiente.
- m) Se forman 2 fases (en el estrato superior se encuentran los ácidos nucleicos). Extraer el estrato superior y colocarlo en tubo eppendorf de 1 mL de capacidad.
- n) Añadir 500 μ L de isopropanol (frío) a cada nuevo tubo. Invertir varias veces hasta observar el precipitado que forman los ácidos nucleicos.
- o) Mantener los tubos a 4°C (mínimo 1 hora).
- p) Centrifugar (6-7 minutos) hasta formar una pastilla de ácidos nucleicos.

- q) Eliminar el sobrenadante y agregar 500 μ L de etanol al 70%. Aplicar vortex (para exponer la pastilla en su totalidad al etanol). El objetivo en esta fase es limpiar los ácidos nucleicos.
- r) Centrifugar (10 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- s) Añadir 500 μ L de etanol 70%. Aplicar vortex. Centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante.
- s) Destapar cada tubo y mantenerlos invertidos sobre una superficie de papel absorbente.
- t) Esperar a que cada tubo seque completamente.
- u) Añadir 60 μ L de agua desionizada estéril a cada tubo.
- v) Almacenar los tubos a 4°C.

7.2.- CUANTIFICACION FLUOROMETRICA DE DNA GENOMICO DE *Tetraselmis suecica* (Gallagher, 1989, con modificaciones).

- a) Encender el fluorómetro (Hoefer Scientific Instruments San Francisco, Modelo TKO 100) por lo menos 30 minutos antes de utilizarse.
- b) Los botones de ajuste deben recorrerse totalmente hacia el extremo derecho.
- c) Preparar en el momento de uso una solución de Hoescht al 0.01% (1mg/mL) en TNE 1X (10 μ L de Hoescht para 100 ml de TNE) (apéndice 5).
- d) Calibrar el aparato con 2 mL de dicha solución.
- e) Añadir 1 μ L de DNA de concentración conocida (plásmido de levadura JS97) a esta misma solución.
- f) Ajustar el aparato a la concentración correspondiente.

- g) Mezclar 1 μL de la muestra no conocida (DNA seleccionado de *Tetraselmis*) + 2 mL de la solución blanco.
- h) Registrar las lecturas fluorométricas y establecer la concentración de DNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- i) Mezclar nuevamente 1 μL de la misma muestra y repetir las lecturas. Esto es para comprobar que la lectura anterior sea correcta y demostrar el grado de eficacia del sistema, evitando así errores tanto del manejador como del fluorómetro. Incluso se pueden realizar todas las lecturas de nuevo con el DNA digerido, demostrando la validez de nuestros datos.

TABLA III: LECTURAS FLUOROMETRICAS DE DNA

MUESTRA	LECTURA 1 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) con 1 μL de muestra	LECTURA 2 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) con 2 μL de muestra
pJS97(control positivo)	500	1014
Clona 3	149	324
Clona 16	195	415
Clona 20	100	203
Clona 21	97	198
Control negativo(Ax 2)	55	100

Se cuantifican por duplicado, 4 clonas transgénicas, un control positivo y un control negativo.

7.3- TRANSFERENCIA DE DNA TRANSGENICO Y TIPO SILVESTRE MEDIANTE LA TECNICA DEL SOUTHERN BLOT

PRIMERA PARTE

7.3.1- DIGESTION DEL DNA GENOMICO (Sambrook *et al*, 1989. Con modificaciones).

- a) Colocar 4 μg de DNA en un tubo eppendorf estéril y mezclar con agua desionizada estéril.
- b) Añadir el buffer de digestión enzimática (10X Reactivo 10. Gibco BRL)
- c) Agregar 1 μl de espermidina 0.1 M.
- d) Agitar con vortex
- e) Centrifugar por 3 segundos.
- f) Agregar 30 unidades de la enzima de restricción **SaI I** (Gibco BRL) (7.5 unidades por μg de DNA de la microalga)
- g) Aplicar vortex
- h) Centrifugar por 3 segundos
- i) Incubar a 37°C por 12 horas.
- j) Agregar 300 μL de etanol (puro de grado analítico), para precipitar el DNA digerido.
- k) Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
- l) Incubar a 4°C por 12 horas para facilitar la precipitación de DNA.
- m) Centrifugar hasta formar pastilla de ácidos nucleicos
- n) Eliminar el sobrenadante.

o) Invertir el tubo sobre la superficie de papel secante, hasta eliminar completamente la humedad en el interior del tubo (60 minutos aproximadamente).

p) Agregar 28µL de agua desionizada estéril a la pastilla y disolverla manualmente. Si se requiere almacenarla a 28°C.

TABLA IV: DIGESTION PARA pB₂ (gen citrato sintasa):

Población	DNA (µg/µL)	DNA (µL)	Buffer (µL)	Espemidina (µL)	Agua desionizada (mL)	Sal I (µL)	Vol. final (µL)
3X	0.149	27	15	3	102	3	150
16x	0.195	21	15	3	108	3	150
20x	0.100	40	15	3	89	3	150
21x	0.097	41	15	3	88	3	150
Ax 2	0.055	73	15	3	56	3	150

Se utilizan 4 poblaciones transgénicas y un control negativo(Ax 2). La enzima de restricción Sal I corta los extremos del gen citrato sintasa.

SEGUNDA PARTE

7.3.2 - ELECTROFORESIS DEL DNA DIGERIDO EN GEL DE AGAROSA

(Sambrook *et al*, 1989. Técnica modificada).

- Se utiliza el Sistema de electroforesis en gel. MaxiCell EC360M. 15x25 cm, con 20 pozos.

a) Preparar 200 mL de agarosa al 1% en buffer TAE. Fundir la agarosa.

b) Esperar a que la solución llegue a una temperatura aproximada de 60°C.

c) Verter esta solución en el molde para gel.

- d) Una vez gelificada la agarosa, sacar el peine cuidadosamente y agregar TAE 1X hasta cubrir completamente la superficie del gel.
- e) A cada tubo de DNA digerido agregar 6 μ L de buffer de carga (10X) y 4 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL).
- f) Cargar cada pozo de la manera siguiente:

TABLA V: DISTRIBUCION DE MUESTRAS EN GEL DE AGAROSA

POZO 1: 4 μ L del marcador de peso molecular de 1Kb +1 μ L de Bromuro de etidio (10 mg/L).
POZO 2: libre
POZO 3: 30 μ L de DNA 2. Clona 1X seleccionada en HCl
POZO 4: 30 μ L de DNA 2. Clona 2X seleccionada en HCl
POZO 5: 30 μ L de DNA 2. Clona 3X seleccionada en HCl
POZO 6: 30 μ L de DNA 2. Clona 4X seleccionada en HCl
POZO 7: 30 μ L de DNA 2 Clona 3X 12(16) seleccionada en AlCl ₃
POZO 8: 30 μ L de DNA 2 Clona 16X 9(16) seleccionada en AlCl ₃
POZO 9: 30 μ L de DNA 2 Clona 21X 9(16) seleccionada en AlCl ₃
POZO 10: 30 μ L de DNA 2 Clona 20X 9(16) seleccionada en AlCl ₃
POZO 11: 30 μ L de DNA 2 Clona 22X 9(16) seleccionada en AlCl ₃
POZO 12: 30 mL de DNA 2 Clona 2B 9(16) seccionada en AlCl ₃
POZO 13: 30 μ L de DNA 2. Clona 1X seleccionda en AlCl ₃
POZO 14: 30 μ L de DNA silvestre de <i>T. suecica</i> .. Clona Axénica 2 (control negativo)
POZO 15: 30 μ L de DNA silvestre de <i>T. suecica</i> Clona 6 (control negativo)
POZO 16: 30 μ L de DNA 2. Clona 2X seleccionada en AlCl ₃
POZO 17: 30 μ L de DNA 2. Clona 3X seleccionada en AlCl ₃
POZO 18: 4 μ L del marcador de peso molecular de 1Kb + 1 μ L de bromuro de etidio
POZO 19: Libre
POZO 20: 3 μ L del marcador de peso molecular de 1 Kb + 1 μ L de bromuro de etidio.

Se utilizan DNAs digeridos provenientes de las siguientes poblaciones: 9 clonas transgénicas seleccionadas en medio acidificado con AlCl_3 , 4 clonas transgénicas seleccionadas en medio acidificado con HCl , y 2 clonas silvestres sin selección (controles negativos).

- g) Agregar TAE 1X hasta cubrir el gel por completo.
- h) Cerrar la cámara y conectar los electrodos a la fuente de poder.
- i) Encender la fuente de poder
- j) Ajustar voltaje (70 V) y amperaje (70 miliamps).
- k) Observar la migración del DNA indicada por el azul de bromofenol (que migra con segmentos de DNA de 300 bp) y el xileno-cianol (con segmentos de 4kb).
- l) Al llegar el azul de bromofenol aproximadamente a 1 cm antes del extremo final de la corrida, apagar el sistema.
- m) Sacar el gel y observar los resultados en el transiluminador (luz UV)
- n) El gel se puede mantener en agua destilada estéril.

7.3.3-TRANSFERENCIA DEL DNA DIGERIDO A UNA MEMBRANA DE NYLON (Técnica de Sambrook *et al.*, 1989; modificada)

- a) Cortar un fragmento de la esquina superior izquierda del gel como referencia de la secuencia de cada una de las muestras.
- b) Desnaturalizar el DNA, sumergiendo el gel durante 30 minutos en el buffer desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH) con agitación leve. Desechar esta solución y agregar buffer fresco, repitiendo el proceso por otros 30 minutos.

c) Enjuagar el gel con agua desionizada estéril y neutralizar sumergiendo éste en solución neutralizante (1M Tris pH 7.4, 1.5M NaCl) a temperatura ambiente en constante y leve agitación; durante 30 minutos. Repetir este paso.

d) Construir un sistema capilar de transferencia:

- Recortar papel filtro Whatman 3MM : 2 hojas de 50 cm de largo por 20 cm de ancho y 2 hojas de 15 x 25 cm (mismas dimensiones que el gel).
- Recortar papel filtro Whatman 3MM : 2 hojas de 50 cm de largo por 20 cm de ancho y 2 hojas de 15 x 25 cm (mismas dimensiones que el gel).
- Recortar 1 hoja de membrana de nylon Amersham's Hybond N⁺ 15 x 25 cm.
- Recortar varias hojas de papel secante Kleenex (15 x 25 cm) de manera que apiladas una sobre otra lleguen a una altura aproximada 40 cm.
- Colocar un soporte, ya sea de vidrio, plexiglas o plástico (de mayor longitud y anchura que el gel) en el interior de una charola grande
- Agregar buffer de transferencia SSC 2X sin cubrir el soporte..
- Colocar las hojas Whatman 3MM (50 x 20 cm) sobre el soporte e impregnarlas de la solución de transferencia.
- Colocar el gel invertido (las muestras se encuentran en la parte inferior del gel) sobre las hojas Whatman 3MM.
- Sobre cada una de las orillas del gel (sin cubrir la dirección de las corridas) colocar un "marco" de película de rayos X, para aislar el gel e impedir derrames de buffer que interfieran con la fiel transferencia de las bandas hacia la membrana.
- Humedecer la membrana de nylon (utilizar guantes) en el buffer de transferencia y colocarla sobre la superficie del gel. Eliminar cualquier burbuja atrapada en la membrana utilizando una varilla de vidrio a manera de rodillo.

Cortar la orilla izquierda de la membrana al igual que el gel, para reconocer los sitios exactos de las muestras aplicadas.

- Colocar una hoja (impregnada de solución de transferencia) Whatman 3MM de 15 x 25 sobre la membrana de nylon. Colocar la segunda hoja con las mismas dimensiones, sobre la anterior. Inmediatamente adyacentes a los filtros, colocar las servilletas Kleenex apiladas.
- Sobre las servilletas se coloca una placa de vidrio y sobre ésta, una pesa para comprimir un poco el sistema de transferencia. Esperar 12 horas y cambiar las servilletas mojadas por secas.

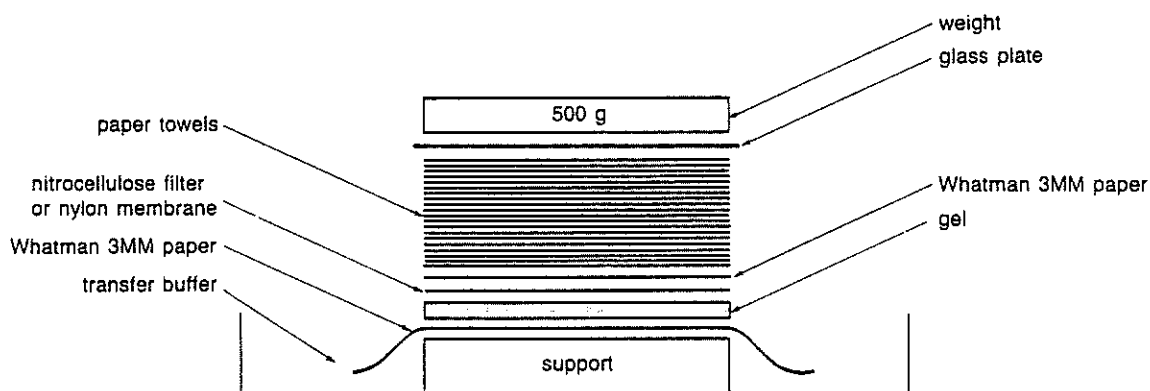


FIGURA 3: SISTEMA CAPILAR DE TRANSFERENCIA

(Figura 7.2 de Sambrook et al., 1989)

- Desprender la membrana del gel, cuidadosamente, marcar con lapiz la posición que ocuparon las muestras del DNA.
- Enguajar la membrana en SSC 2X durante 15 minutos.
- Secar la membrana con toallas de papel filtro.
- Hornear la membrana a 80°C durante 4-5 horas.
- Observar el corrimiento del fragmento en luz U.V.

TERCERA PARTE

7.4-MARCAJE FLUORESCENTE PARA SOUTHERN (Técnica modificada de VISTRA, AMERSHAM).

- Utilizar el módulo de marcaje primario al azar RPN 5751

7.4.1- Preparación de la sonda de marcaje fluorescente

a) Colocar en hielo los siguientes tubos:

- Mezcla de nucleótidos (Apéndice 5)
- Primers (Apéndice 5)
- Agua (Apéndice 5)
- Mantener la enzima de -15 a -30°C, mientras esté en uso. Posteriormente almacenar en congelador.

b) Desnaturalizar 600 ng del DNA que se utilizó como sonda (fragmento de 800 pares de bases del gen de la citrato sintasa), calentándola durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Transferirla a hielo. Es recomendable desnaturalizar un volumen mínimo de 10 µL. El DNA circular cerrado de doble hebra se puede linealizar para evitar que se renaturalice rápidamente, aunque generalmente esto no es necesario.

c) Añadir los siguientes reactivos a un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad colocado en hielo:

- Agua hasta completar un volumen final de reacción de 50µL
- 10 µL de la mezcla de nucleótidos
- 5 µL de primers
- 50 ng de DNA desnaturalizado

- 1 μL de solución enzimática (Klenow) de 5 unidades/ μL (Apéndice 5)
- 50 μL de volumen total
- Si se desea, se pueden utilizar como control 5 μL del DNA sin marca proveniente del kit (Apéndice 5), como sustituto de nuestra muestra de DNA.
- Es factible un volumen de hasta 25 μL de DNA en solución para los fragmentos en agarosa de bajo punto de fusión.

d) Mezclar cuidadosamente los reactivos con ayuda de la micropipeta.

e) Centrifugar hasta formar un sedimento.

f) Incubar a 37° durante 1 a 3 horas

g) Si se desea almacenar la sonda, se añaden 2 μL de 0.5M de EDTA y se colocan en congelador (-15 a -30°C) en oscuridad. Se pueden mantener así por un periodo mínimo de 6 meses. No utilizar un congelador frost-free.

El rendimiento de la sonda después de marcar 25 o 50 ng del templete, será de 6-8 ng/ μL . Con templetos de nivel mayor, la cantidad de templete marcado es inversamente proporcional a la eficiencia de la reacción.

Se recomienda utilizar el ensayo de marcaje rápido para comprobar el éxito en el marcaje de la sonda.

7.4.2- Ensayo de marcaje rápido.

- El DNA marcado con fluorosceína que funciona como control en el kit, está muy diluido para la detección mediante ensayo rápido.

a) Preparar las siguientes diluciones a partir de la mezcla 5X de nucleótidos, en buffer TE:

TABLA VI: Serie de diluciones de la mezcla de nucleótidos

1/5	1/10	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500
-----	------	------	------	-------	-------	-------

b) En una tira de Hybond 1M-N⁺ (colocada sobre la superficie de papel no absorbente) se añaden 5 µL de la sonda marcada + 5 µL de la dilución de 1/5 (control negativo). Se debe permitir la absorción del líquido (mas no su secado). Posteriormente se lava la tira en SSC 2X (precalentado) con agitación leve durante 15 minutos.

c) Preparar una tira Hybond-N+ de referencia colocando en ella 5 µL de cada dilución, excepto para la de 1/5 (en tira separada).

d) Colocar la tira lavada y la de referencia en papel filtro Whatman 3MM (ligeramente humedecido en buffer TE).

e) Observar estas tiras (con la muestra hacia abajo) en transiluminador UV o mediante scanning en el FluorImager (PMT a 550V). La sonda marcada se visualiza como una mancha fluorescente de una intensidad comparable a la de la dilución 1/100 de la tira de referencia. Esto indica que la sonda ha incorporado la marca de fluorosceína. Entre más cercana se encuentre la intensidad de reacción del DNA marcado a la dilución más baja (1/10), indica mayor eficiencia en la reacción de marcaje.

7.4.3- Prehibridación

a) Preparar las siguiente soluciones:

- 5x SSC
- 0.1% (w/v) SDS
- 20 veces la dilución del bloque líquido (proveniente del kit)
- Sulfato de dextrano al 5% (pm 500000)

b) Mezclarlas entre sí al volumen requerido. Disolver mediante agitación o con calor leve si es requerido.

c) Precalentar a 60°C el volumen requerido del buffer de hibridación (0.3mL/cm² para marcajes en pequeña escala y 0.125 mL/cm² o menos para marcajes en gran escala).

d) Colocar la membrana de Nylon Hybond N⁺ Amersham (con el DNA transferido) en el buffer.

e) Prehibridar por lo menos 30 minutos a 60°C en constante y leve agitación:

- Colocar la membrana dentro de una probeta de 500 mL de volumen, enrollada y adherida a las paredes.
- Añadir el buffer precalentado de manera que resbale por las paredes e impregne la membrana.
- Sellar la probeta.
- Colocarla en el interior de horno. Activar el movimiento rotatorio y la temperatura.

7.4.4- Hibridación

a) Desnaturalizar la sonda marcada en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.

b) Transferirla inmediatamente en hielo.

- c) Centrifugar por unos segundos.
- d) Añadirla al buffer de prehibridación (evitando colocarla directamente en la membrana). Mezclar cuidadosamente.
- e) Hibridar por 12 horas a 60°C en agitación leve.

7.4.5- Lavados

- a) Preparar una solución de lavado 5X SSC. 0.1% (p/v) SDS.
- b) Sacar la membrana de la probeta y lavarla durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente.
- c) Llevar a cabo un segundo lavado en la solución precalentada 1X SSC. 0.1% (p/v) SDS. Agitar levemente durante 15 minutos a 60°C.
- d) Lavar por tercera vez en solución SSC 0.5X y SDS 0.1% (p/v)
- e) Enjuagar con agua destilada.

7.4.6- Detección de la hibridación

- a) Enjuagar la membrana en SSC 2X
- b) Colocar la membrana invertida sobre la superficie del FluorImager.
- c) Para evitar que se seque la membrana, se protege con un plástico (Saran Wrap).

2.- "Escanear" el blot utilizando filtros de 530 nm o sin filtro. (Utilizar el filtro de 570 nm solo para la señal amplificada).

7.4.7- Sistema de amplificación de señal (FluorImager RPN 5750)

• Bloqueo, incubación de anticuerpo y lavado.

Todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente y las incubaciones requieren agitación constante de los blots.

- a) Posterior a los lavados de la hibridación, se enjuaga el blot en buffer A (1X) en exceso (2 mL/cm²).
- b) Incubar el blot durante 1 hora (0.75-1.0 mL/cm² de bloqueador líquido diluido 1:10 en buffer A al 1X).
- c) Diluir la antilfluoresceína AP (fosfatasa alcalina) conjugada 5000X en la preparación fresca de albúmina de suero bovino 0.5% (p/v) en 1X de buffer A.
- d) Incubar el blot en el conjugado diluido (0.3 mL/cm²) durante 1 hora.
- e) Eliminar el conjugado libre, lavando de 3 a 10 minutos con Tween 20 al 0.3%(v/v) en buffer A 1X (2-5 mL/cm²).

7.4.8- Generación y detección de la señal.

- a) Eliminar el exceso de buffer de la membrana y colocarla en una bolsa de plástico (con una orilla sellada).
- b) Añadir inmediatamente el reactivo de detección con la ayuda de una pipeta. Solo añadir lo necesario (~25µL/cm²) para que en el momento de cerrar la bolsa se impregne la totalidad de la superficie de la membrana.
- c) Cerrar la bolsa y homogenizar el reactivo sobre la membrana utilizando una pipeta a manera de rodillo.
- d) Colocar la membrana humedecida en una bolsa nueva, sellarla en 2 extremos y agregarle reactivo de detección fresco. Sellarla completamente.
- e) Después de 1 hora, escanear la membrana. Si la imagen es débil todavía, se deja por mas tiempo (hasta 24 horas) y se revisa, escaneando varias veces durante dicho intervalo. El escaneo se lleva a cabo, colocando la bolsa con la cara dorsal del blot hacia arriba en el FluorImager. Se puede utilizar etanol o agua y colocarlo entre la superficie de la bolsa y el vidrio. Esto mejora la imagen.

8.-REPETICION DE LA TECNICA DE TRANSFORMACION

8.1.-Preparación de microalgas competentes para el bombardeo.

a) A partir de un cultivo unialgal de *Tetraselmis suecica* {F₂ de Guillard + BAP (10 mg/L) pH 8.5} en fase log temprana de crecimiento, preparar filtros Whatman 3MM y filtros milipore hidrofílicos de 1mm de diámetro, impregnados cada uno con 5 mL de dicho cultivo y transferirlos a los siguientes medios:

- F₂ de Guillard + agar (7g/l) pH 8.5.
- F₂ de Guillard + agar (7g/L) + Manitol (0.5 M) pH 8.5. (medio osmótico)
- F₂ de Guillard + agar (7 g/L) + BAP (10 mg/L) pH 8.5
- F₂ de Guillard + agar (7g/L) + BAP (10 mg/L) + Manitol (0.5M) pH 8.5. (medio osmótico)

b) Numerar cada población filtrada.

c) **Parámetros:**

- Se filtran 160,000 células/mL.

Considerando una pérdida del 50% durante el proceso de filtrado, tenemos que cada filtro (5mL) posee 400,000 microalgas (*Tetraselmis suecica*) en su superficie.

- Cada placa contiene de 2 a 3 filtros.
- La distribución de filtros Whatman y milipore se realiza al azar en las cajas petri. Asimismo se utiliza en forma indistinta el agua de mar artificial y natural en la preparación de los medios.

•Las poblaciones expuestas a medio osmótico, se mantienen en éste durante 2 horas.

8.2.-Segundo bombardeo:

a) Siguiendo los mismos protocolos correspondientes al primer bombardeo, se realiza un solo disparo por placa y se manejan presiones de 1100 a 1350 p.s.i. como se muestra en la tabla VII de parámetros del segundo bombardeo.

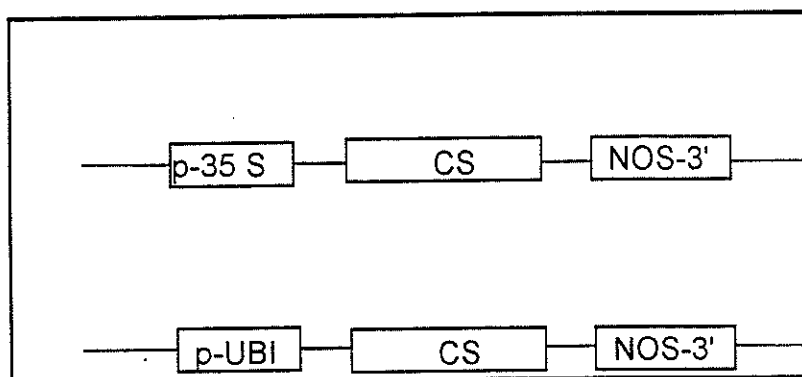
b) Se utilizan 2 tipos de DNA para el bombardeo (figura 4):

- Gen citrato-sintasa regulado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

- Gen citrato sintasa regulado por el promotor de ubiquitina proveniente de arroz.

c) Incubar las células bombardeadas a 19°C en condiciones de luz continua durante 24 horas

FIGURA 4: DNAs utilizados en el segundo bombardeo



Se utilizan tanto el promotor 35 S como el promotor de ubiquitina. El gen citrato-sintasa mide 940 pb.

TABLA VII: SEGUNDO BOMBARDEO Y SELECCION

PLACA	MEDIO DE CULTIVO pH 8.5	PROMOTOR	PRESION (P.S.I.)	MEDIO DE SELECCION pH 5
1	F2+agar (7g/L)	ubiquitina	1350	F2 + AICI3 (1.24 mM)
2	F2+agar+BAP (10 mg/L)	ubiquitina	1200	F2 + AICI3 + BAP (10 mg/L)
3	F2+agar+manitol (0.4M)	ubiquitina	1200	F2 + AICI3
4	F2+agar+BAP+manitol (0.4M)	ubiquitina	1350	F2 + AICI3 + BAP
5	F2+agar	ubiquitina	1300	F2 + AICI3
6	F2+BAP+agar	ubiquitina	1300	F2 + AICI3 + BAP
7	F2+agar+manitol	ubiquitina	1250	F2 + AICI3
8	F2+BAP+agar+manitol	ubiquitina	1200	F2 + AICI3 + BAP
9	F2+agar	35S	1200	F2 + AICI3
10	F2+BAP+agar	35S	1200	F2 + AICI3 + BAP
11	F2+agar+manitol	35S	1300	F2 + AICI3
12	F2+BAP+agar+manitol	35S	1250	F2 + AICI3 + BAP
13	F2+agar	35S	1300	F2 + AICI3
14	F2+BAP+agar	35S	1100	F2 + AICI3 + BAP
15	F2+BAP+agar+manitol	35S	1200	F2 + AICI3 + BAP
16	F2+agar+manitol	35S	1100	F2 + AICI3
17	F2+agar	control neg.	----	F2 + AICI3 F2 pH 8.5
18	F2+agar	control neg.	----	F2 + AICI3 + BAP F2 + BAP pH 8.5
19	F2+agar+manitol	control neg.	----	F2 + AICI3 F2 pH 8.5
20	F2+agar+BAP+manitol	control neg.	----	F2 + AICI3 + BAP F2 + BAP pH 8.5

Las poblaciones 1 a 8 se bombardean con el gen CS regulado por el promotor de ubiquitina y las poblaciones 9 a 16, con el gen CS regulado por el promotor 35S. Se utilizan 4 controles negativos, los cuales no son bombardeados.

8.3.-SELECCION EN ALUMINIO:

- **Medio líquido:**

- a) Colocar cada filtro bombardeado en 1mL de medio selectivo líquido como se indica en la tabla de bombardeo y selección.
- b) Incubar durante 24 horas a 19°C en condiciones de luz continua.

- **Medio sólido: Sembrar por goteo la totalidad de 1 mL.**

- a) Tomar una alícuota de 50µL de la población en tubo (elegir las de mayor densidad de población) y colocarla sobre un pequeño segmento de la superficie del medio en placa (técnica de goteo), hasta completar 8 a 10 gotas por placa.
- b) Incubar a 19°C con luz continua durante 3 semanas.
- c) Cuantificar el número de clones transgénicos.
- d) Calcular el % de transformación.

VI- RESULTADOS

METODOS DE SELECCION.

Los métodos selectivos utilizados para detectar actividad de los genes marcadores Bar, NPT II, HPT y el gen reportero GUS; no fueron exitosos. Por ello, se consideran irrelevantes los datos obtenidos con ellos y no se mencionarán en esta sección.

Solamente se detecta la actuación del gen que codifica para la enzima citrato-sintasa en cultivos transgénicos de *Tetraselmis suecica* a pH acidificado con $AlCl_3$. Dicha estrategia permite seleccionar de una manera clara y precisa las microalgas transformadas; de forma tal que se obtiene un método selectivo funcional a partir de varios fallidos.

Eliminación de contaminantes:

Uno de los problemas técnicos encontrados fué la contaminación de las cepas stock de *Tetraselmis suecica*. Conforme se fueron desarrollando las diferentes estrategias selectivas, se descubre lo siguiente:

La administración de BAP (10 mg/L), PPT (8 mg/L) y kanamicina (300 mg/L) a pH 6 (acidificado con HCl); en el medio sólido F2 de Guillard; elimina rastros de contaminación que crecen a la par de las microalgas.

Administración de un fitorregulador:

Debido a la lentitud inicial de los procesos selectivos, se decide probar el efecto de un fitorregulador de crecimiento:

La administración de BAP (10 mg/L) en medio sólido y líquido F2 de Guillard duplica la velocidad de crecimiento de las poblaciones silvestres y transgénicas. Este fitorregulador agiliza aproximadamente en un 100% el

proceso de selección, al agregarlo en el medio selectivo ácido. Sin la aplicación de BAP, los cultivos transgénicos tardan hasta 30 días en crecer en el medio acidificado con AlCl_3 , mientras que al agregar esta citocinina a dichos cultivos, la tasa de crecimiento se eleva de sobremanera y se llega a una saturación del medio en un periodo de 7 a 14 días.

Selección en medio ácido:

La estrategia selectiva para detectar la expresión del gen citrato sintasa, utilizando el medio F2 de Guillard acidificado con HCl, no es funcional puesto que la enzima solamente actúa sobre los iones aluminio. A falta de ellos en el medio selectivo no es factible observar ningún mecanismo selectivo. En cambio, al agregar AlCl_3 a este mismo medio, se obtiene una verdadera selección.

El medio selectivo de mayor grado de eficacia para detectar la expresión del gen citrato sintasa en *Tetraselmis suecica*, es F2 de Guillard + BAP (10 mg/L) + AlCl_3 (1 mM) a pH 5, tanto sólido como líquido. Dicha concentración de AlCl_3 acidifica el medio F2 de Guillard de pH 8.5 hasta 5. Por ello no utilizamos concentraciones menores a 1 mM.

La mejor forma de propagar las clonas transgénicas en medio líquido es agregando medio fresco a la totalidad del cultivo en crecimiento. Si realizamos los subcultivos tradicionales de propagación de microalgas en escala creciente tomando una alícuota de un cultivo y transferirla a un medio de mayor volumen, parece gran parte de la población; cosa que no sucede si le agregamos medio fresco paulatinamente a un cultivo inicial sin cambiar de recipiente.

La técnica de sembrado por goteo (aplicación de gotas de 50 μ L de un cultivo líquido sobre la superficie en placa) es la más adecuada para la propagación de las colonias transgénicas en medio sólido, así como para su cuantificación. La técnica de sembrado por estría dificulta o nulifica el crecimiento de las colonias. Esto tal vez se deba a que una gota permite mayor movilidad e hidratación a las microalgas, mientras que en la estría difícilmente pueden moverse, tienen un espacio reducido y de cierta profundidad que no las favorece.

METODO DE TRANSFORMACION

El método elaborado en el presente trabajo para transformar genéticamente a *T. suecica*, se realiza dos veces, para demostrar que la técnica utilizada es repetible.

Las presiones de disparo de 1,100 a 1,600 p.s.i. permiten introducir el DNA de interés en un cultivo celular de *Tetraselmis suecica*.

El porcentaje de transformación obtenido es de 1.4 a 8%, esto es 6.8 a 38.5 colonias/ng de DNA bombardeado (Tablas VIII y IX).

EFICIENCIA DE TRANSFORMACION*

TABLA VIII: PROMOTOR DE UBIQUITINA

POBLACION	VECTOR	COLONIAS/mL	% DE TRANSFORMACION	COLONIAS/ng de DNA
1	ubiquitina-CS	8,000	2	14.4
2	ubiquitina-CS	5,600	1.4	6.8
3	ubiquitina-CS	16,000	4	29
4	ubiquitina-CS	10,000	2.5	18
5	ubiquitina-CS	30,400	7.6	55
6	ubiquitina-CS	32,000	8	38.5
7	ubiquitina-CS	21,600	5.4	39
8	ubiquitina-CS	10,800	2.7	19.5
TOTAL		134,000	X = 4.2	220.2

TABLA IX: PROMOTOR 35 S

POBLACION	VECTOR	COLONIAS/mL	% DE TRANSFORMACION	COLONIAS/ng de DNA
9	35S-CS	0	0	0
10	35S-CS	24,000	6	29
11	35S-CS	8,000	2	14.5
12	35S-CS	8,000	2	14.5
13	35S-CS	5,600	1.4	6.8
14	35S-CS	5,600	1.4	6.8
15	35S-CS	14,000	3.5	25.3
16	35S-CS	6,000	1.5	11
TOTAL		71,200	X = 2.25	107.9

*Cada filtro impregnado con células bombardeadas (400,000 céls./filtro), se coloca en 1 mL de medio selectivo durante 24 horas. Este pequeño volumen se subcultiva a medio sólido selectivo. A partir de la totalidad de colonias que crecen en placa por cada mL sembrado, se calcula el % de transformación. Ej: para la población 1: 400,000=100% y 8,000=2%.

En cuanto a las colonias/ng de DNA, se calculan de la manera siguiente: se bombardean de 2 a 3 filtros por placa. 1 disparo equivale a 1660 ng de DNA. Las colonias/mL se dividen entre 1660/# de filtros. Ej: 8,000 colonias/mL se dividen entre 1660/3, debido a que se bombardean 3 filtros, dando como resultado 14.4 colonias/ng de DNA.

5,600 colonias/mL se dividen entre 1660/2, debido a que se bombardean 2 filtros por placa, dando como resultado 6.8 colonias/ng de DNA.

EFICIENCIA DE PROMOTORES

A partir del segundo experimento de bombardeo (gen CS) y selección en placa, se cuantifica el % de transformación obtenido y se comparan los promotores ubiquitina y 35S. El primero duplica la actividad del segundo (Tablas XIII y IX).

CARACTERISTICAS DE LAS CLONAS TRANSGENICAS:

Observaciones macroscópicas (Figuras 5, 6 y 7):

- Las clonas bombardeadas (pB2) sufren un proceso de aglutinación, formando agregados celulares de coloración verde brillante, de los cuales la mayoría sedimentan.
- Las clonas control negativo se dispersan en el medio líquido y finalmente sedimentan. Su coloración original verde brillante disminuye hasta llegar a la aclorosis total.



Figura 5: aspecto de las clonas en medio selectivo líquido



Figura 6: aspecto de las clonas en medio selectivo líquido. La última clona de la derecha es el control negativo.

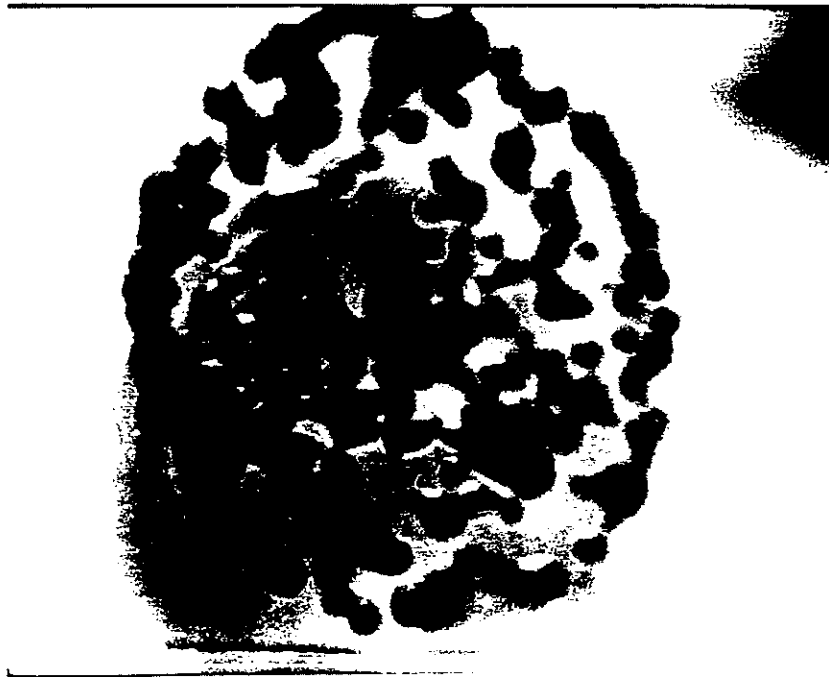


Figura 7: aspecto de las clonas en medio selectivo sólido.

Observaciones microscópicas (Figura 8):

- En las clonas bombardeadas se presentan células individuales móviles, fusiformes, flageladas, color verde brillante. También existen conglomerados celulares color verde brillante, inmersos en una matriz transparente. Asimismo aparecen células en fase de mitosis y otras de forma esférica con pared gruesa.
- En los controles negativos se observan células carentes de pigmento, inmóviles, con pared adelgazada y distorsionada.

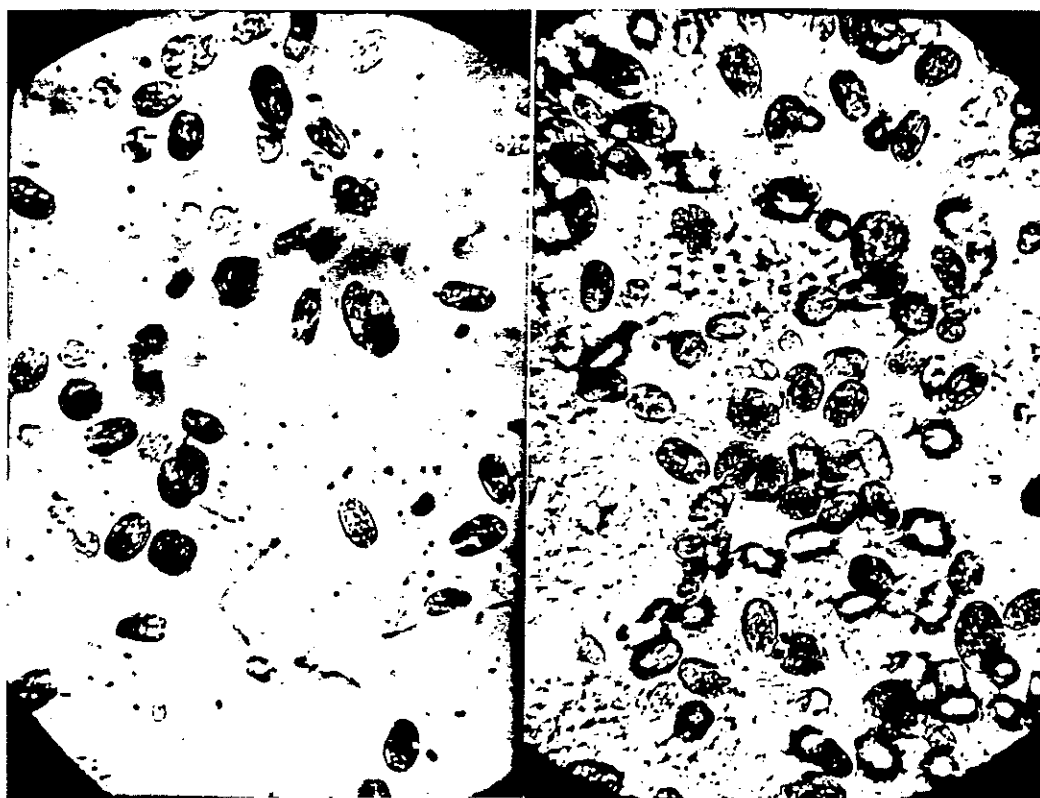


Figura 8: aspecto microscópico de las clonas transgénicas en selección.

El protocolo de transformación elaborado en el presente trabajo, para la transformación genética de *Tetraselmis suecica* mediante la biobalística, utilizando al gen de la citrato-sintasa; se resume en el siguiente diagrama:

FIGURA 9: PROTOCOLO DE TRANSFORMACION GENETICA DE
Tetraselmis suecica

PREPARACION DE MICROALGAS COMPETENTES:

- 1) Obtener cultivos en fase logarítmica de crecimiento
- 2) Realizar varios filtrados celulares (5-10 mL)
- 3) Colocar los filtros en medio sólido F2 de Guillard. pH 8.5



BOMBARDEO:

- 1) DNA: gen citrato-sintasa, regulado por el promotor de ubiquitina
- 2) Utilizar el sistema de Helio PDS/1000 de alta presión
- 3) Realizar un disparo único a la presión deseada (1100-1600 psi)



SELECCION:

- 1) Colocar filtros bombardeados en F₂ de Guillard líquido + BAP(10 mg/L) + AlCl₃ (1mM) pH 5.
- 2) Incubar durante 24-48 horas en condiciones de luz continua y temperatura de 19°C.
- 3) Subcultivar en placa mediante técnica de goteo.
- 4) Incubar hasta obtener colonias.
- 5) Cuantificar clonas transgénicas.



ANALISIS DE DNA:

- 1) Extracción de DNA genómico
- 2) Cuantificación fluorométrica
- 3) Digestión enzimática (Sal I)
- 4) Electroforesis en gel de agarosa 1%
- 5) Transferencia del fragmento correspondiente a la secuencia del gen citrato-sintasa.
- 6) Detección del fragmento correspondiente mediante técnica no radiactiva, VISTRA.

ANÁLISIS MOLECULAR

De acuerdo al análisis del DNA, se comprueba que el gen citrato sintasa se integra en forma estable al genoma de *Tetraselmis suecica*. Los carriles E, F, G, H, I, J, K, N y O contienen DNA digerido de clonas microalgales transgénicas seleccionadas en medio acidificado con $AlCl_3$. Los carriles A, B, C y D contienen DNA digerido de clonas microalgales transgénicas seleccionadas en medio acidificado con HCl. Los carriles L y M contienen DNA silvestre de *Tetraselmis suecica* ..

El carril O que pertenece al DNA digerido de una clona microalgal transgénica, muestra claramente la integración del gen citrato-sintasa (940 pb). Los patrones de hibridación del resto de las clonas transgénicas, nos sugiere que el DNA plasmídico se integra al azar en uno o mas sitios del genoma original de la microalga. La débil señal de las bandas sugiere un baja fidelidad en cuanto al número de copias del gen cs. Los controles negativos no muestran banda alguna.

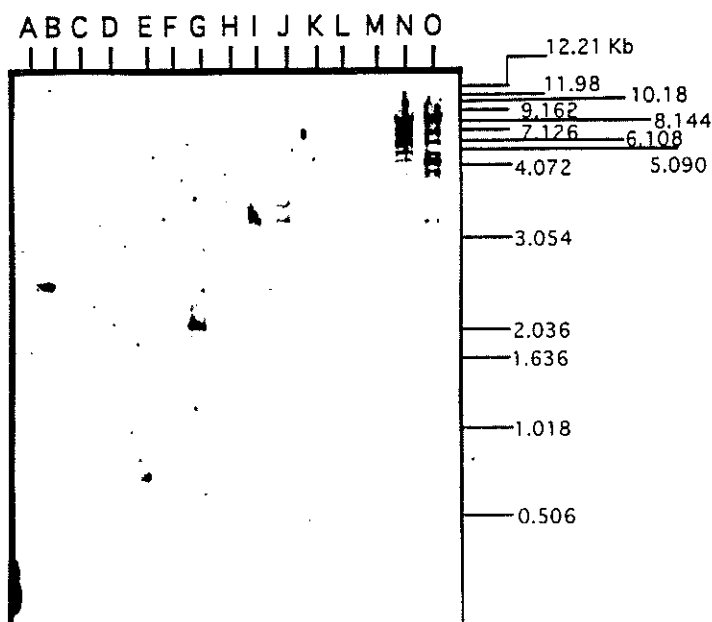


Figura 10: Southern blot mostrando los patrones de integración del gen citrato sintasa en el genoma de *Tetraselmis suecica*

Figura 10: Southern blot mostrando los patrones de integración del gen citrato sintasa en el genoma de *Tetraselmis suecica*

EFFECTO SOBRE pH

Las microalgas transgénicas no solamente son capaces de crecer y reproducirse en el medio ácido conteniendo AlCl_3 , sino que poseen una clara tendencia a amortiguar este medio acidificado artificialmente:

- El pH del medio F2 acidificado con AlCl_3 inicialmente es de 5, sin embargo la tendencia de las poblaciones transgénicas es, alcalinizar el medio: la clona #16 logra aumentar 2 unidades en escala logarítmica, el pH original. En un lapso aproximado de 48 horas cambian el pH 5 a pH 7. Lo mantienen en 7, durante 1 semana hasta llegar a pH 6. Posteriormente, fluctúa entre pH 6 y 7 hasta el día 21. Las clonas 3, 20 y 21 también aumentan el pH del medio y tratan de mantenerlo alcalino. La población control, mantiene el pH de 5 (Figura 11). Las mediciones de pH fueron realizadas durante más de 20 generaciones de microalgas.

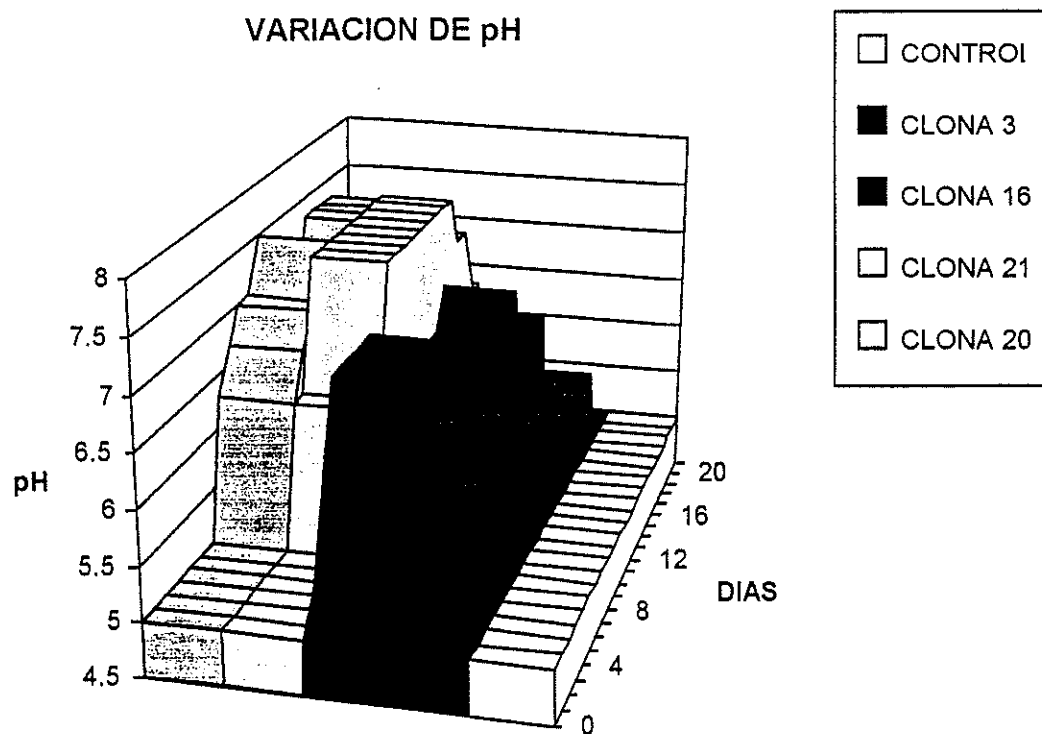


Figura 11. Capacidad amortiguadora de las clonas transgénicas

VII-DISCUSSION

La integración estable de un gen heterólogo en el núcleo de una microalga ancestral, *Tetraselmis suecica*, se logra al utilizar la secuencia codificadora del gen citrato-sintasa proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante el bombardeo de dicho gen hacia un cultivo de *T. suecica*, se lleva a cabo la transformación génica. Paralelamente, se intenta integrar otros genes foráneos como son el gen Bar, NPT II, HPT; así como el gen reportero GUS. Estos no tuvieron tan clara expresión como el citrato-sintasa, por lo cual no se les aplicó la técnica de Southern Blot. Aunque cabe la posibilidad de que dichos genes se hallan integrado al genoma de *Tetraselmis suecica* y que exista un silenciamiento de los mismos, tal como lo exponen Cerutti y cols. (1997b), para *Chlamydomonas*.

El bombardeo con el gen de la citrato-sintasa rinde tasas de transformación de hasta un 8%. Este es un buen porcentaje pero pudiera llegar a mejorarse de acuerdo a las condiciones de bombardeo y de cultivo microalgal. El mayor porcentaje de transformación alcanzado para microalgas anterior al presente trabajo es de 2.5×10^{-5} . Este fue llevado a cabo por Schiedlemeier y cols. en 1994, utilizando el gen homólogo Nit A⁺ de *Volvox carteri*.

Al utilizar 2 promotores diferentes en la regulación de dicho gen: ubiquitina (proveniente de arroz) y 35S (proveniente del virus del mosaico de la coliflor), tenemos que el promotor de ubiquitina es doblemente eficaz comparado con el 35S. Esto sugiere que la microalga reconoce al promotor proveniente de *Oryza sativa* y lo integra a su propio genoma con mayor

facilidad que el originario del virus del mosaico de la coliflor. De gran interés sería estudiar este mecanismo a nivel molecular.

La elaboración del protocolo de transformación de *Tetraselmis suecica*, implica no solamente el bombardeo del gen CS, sino también un sistema de selección *ad hoc*. Para ello se probaron varias estrategias de selección, resultando la de mejor calidad, el aplicar BAP(10 mg/L) y $AlCl_3$ (1mM) al medio de cultivo F2 de Guillard, a un pH de 5. La administración al medio selectivo de un fitorregulador de crecimiento, como lo es la 6-bencilaminopurina o BAP, ayuda de sobremanera al proceso de selección, lo agiliza y clarifica. Se utiliza solamente una concentración de BAP durante todo el experimento. Una buena opción sería probar con varias concentraciones de BAP y con otros fitorreguladores.

A partir de la selección se obtienen clonas transgénicas puras que logran sobrevivir y reproducirse en ambientes ácidos, con la capacidad de regular el pH del medio. Esto es, las microalgas transformadas poseen la capacidad de amortiguar el pH ácido del medio líquido selectivo hasta en 2 unidades en escala logarítmica, como proceso de adaptación a un medio ácido. No solamente eso, sino que cambian su morfología y estadios de su ciclo biológico normal, incluso secretan una matriz mucilaginosa que las une entre sí y les permite realizar sus funciones vitales bajo circunstancias tales como la acidez en presencia de aluminio. Se sugiere el siguiente razonamiento para explicar la variación del pH en el medio selectivo: el $AlCl_3$ que se añade al medio F2 de Guillard se disgrega, forma iones aluminio que se une a iones hidroxilo y se liberan protones provenientes de moléculas de H_2O . Esto trae como consecuencia la acidificación del medio. Ahora, si agregamos al medio

las microalgas transgénicas, ¿que sucede? ellas tiene integrado en su genoma a la enzima citrato sintasa, la cual cataliza la síntesis de citrato. Este es un agente quelante del aluminio. Al atrapar al aluminio, disgrega las moléculas $AlOH$ y deja libres radicales OH . Con ello se puede explicar la tendencia a alcalinizar el medio. Entonces es el citrato secretado por las células transgénicas, el que atrapa iones aluminio y aumenta el pH del medio.

El protocolo de transformación genética elaborado aquí, no es excluyente para otras especies microalgales. Modificando algunos aspectos inherentes a la especie con la cual se decida trabajar, se puede aplicar a ella en forma adecuada.

El medio marino posee una mayor complejidad en cuanto a composición química que el medio dulceacuícola. Las microalgas que habitan este último, deben realizar un número restringido de funciones metabólicas comparadas con las marinas. Por lo tanto su maquinaria génica pudiera ser menos sofisticada. Además, los pH para los cuales son aptas fluctúan entre 6 y 7, mientras que los marinos son 8 y 9. No se debe olvidar que la escala de pH es logarítmica por lo que una unidad es mayor o menor 10 veces que el valor de la siguiente.

¿Acaso sería menos complicado transformar microalgas con el gen de la citrato sintasa, pertenecientes a ambientes lacustres, y adaptarlas a pH ácidos?

Como gen de utilidad práctica, sabemos que el gen citrato-sintasa confiere características en microalgas que les permite adaptarse a un medio ácido en presencia de aluminio. Un medio precisamente con estas

características es el de un lago muerto debido a la lluvia ácida y a la forma tóxica del aluminio que lo acompaña.

Si consideramos que la base de la cadena trófica en un lago, es el fitoplancton y que las especies dañadas inicialmente debido a los estragos de la precipitación ácida y del aluminio, son las microalgas integrantes de dicha comunidad; se entiende que al morir el fitoplancton, a la posteridad sucumben los demás eslabones de la cadena hasta el perecimiento total de sus integrantes.

Una forma práctica de solventar este fenómeno es con la "fitorremediación génica": crear organismos resistentes ante dicho medio hostil mediante ingeniería genética, tal cual se realizó mediante la biobalística en *Tetraselmis suecica*. Como precursores, se proponen a las microalgas transformadas a través de ingeniería genética, utilizando el gen de la citrato sintasa como el agente causal de la característica de resistencia a el aluminio y a pH ácidos provocados por la contaminación industrial.

La adaptación de un organismo a un medio ambiente específico, implica la modificación de ciertas características, con la finalidad de mejorar sus habilidades para sobrevivir y reproducirse en dicho ambiente. Precisamente esto es lo que se ha logrado al crear microalgas transgénicas con el gen CS. La biobalística es la valiosa herramienta utilizada para dicho fin y el protocolo de transformación para microalgas el resultado de éste.

VIII-CONCLUSIONES

- 1.- La integración estable del gen citrato sintasa en el núcleo de *Tetraselmis suecica* se logra a través de la biobalística.
- 2.- Los promotores 35S y ubiquitina son capaces de controlar la transcripción del gen citrato sintasa en *Tetraselmis suecica*. El segundo es doblemente eficaz en dicha función.
- 3.- La estrategia de selección que permite la expresión del gen CS en clones transgénicos de *T. suecica*, es la acidez (pH 5) debida a $AlCl_3$ (1 mM) en el medio de cultivo F2 de Guillard + BAP (10 mg/L).
- 4.- La cepa transgénica de *T. suecica*, además de lograr sobrevivir y reproducirse en el medio acidificado con $AlCl_3$, posee la capacidad de amortiguar el pH, como mecanismo de adaptación adquirido durante el proceso de transformación.
- 5.- Se elabora un nuevo protocolo para transformación génica de microalgas a través de la biobalística, utilizando un gen heterólogo.

IX-PERSPECTIVAS

- 1.- El protocolo de transformación genética para *Tetraselmis suecica* es aplicable a otras especies microalgales, inclusive en macroalgas.
- 2.- El gen de la citrato-sintasa posee características específicas que le permiten funcionar como marcador de selección en la transformación genética de microalgas. Si en un futuro se desea introducir otro gen en una microalga, se recomienda hacerlo de manera conjunta con el gen CS, ya que éste último permite seleccionar las células transgénicas de acuerdo al formato explicado en el presente trabajo.
- 3.- La repoblación de los lagos muertos es una alternativa aplicativa para los integrantes del fitoplancton transformados con el gen citrato-sintasa. A la vanguardia de ello, se encuentra la especie transgénica: *Tetraselmis suecica*. Ello se lograría solamente mediante un equipo interdisciplinario de trabajo y de una manera gradual, ya que precisamente con el paso de los años es como el ser humano ha logrado el perecimiento de miles de lagos en este planeta.
- 4.- A través de la potencialidad de genes silvestres microalgales involucrados en el proceso de quelar metales pesados, es posible utilizar cepas de estos microorganismos en el tratamiento adecuado de aguas contaminadas por metales pesados altamente tóxicos; tal como son el plomo, mercurio, cobre, cobalto, etc.. Todo ello mediante la manipulación génica microalgal y sobre todo con la ayuda de la técnica de transformación denominada biobalística.

X.-LITERATURA CONSULTADA:

- 1.-Blankenship J.E., Kindle K.L. 1992. Expression of Chimeric Genes by the Light-Regulated cab II-1 Promoter in *Chlamydomonas reinhardtii* : A cab II-1/nit 1 Gene Functions as a Dominant Selectable Marker in a nit 1⁻ nit 2⁻ Strain. *Molecular and Cellular Biology*. 12(11): 5268-5279.
- 2.- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sandford J.C. 1988. Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. *Science*. 240: 1534-1537
- 3.-Brown L.E., Sprecher S.L., Keller L.R. 1991. Introduction of Exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Molecular and Cellular Biology*. 11(4):2328-2332.
- 4.-Cañizarez V.R.O. 1992. Biotecnología de Microalgas. Avance y Perspectiva. 11:345-352 .
- 5.-Cerutti H., Johnson A.M., Gillham N.W., Boynton J.E. 1997a. A Eubacterial Gene Conferring Spectinomycin Resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration Into the Nuclear Genome and Gene Expression. *Genetics*. 145:97-110.

- 6.-Cerutti H., Johnson A.M., Gillham N.W., Boynton J.E. 1997b. Epigenetic Silencing of a Foreign Gene in Nuclear Transformants of *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*. 9:925-945.
- 7.-Christou P., Ford T.L., Kofron M. 1991. Production of Transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties Via Electric Discharge Particle Acceleration of Exogenous DNA Into Immature Zygotic Embryos. *Biotechnology*. 9:957-962.
- 8.-Cunningham S.D., Berti W.R. 1993. Remediation of Contaminated Soils with Green Plants: An Overview. en *In Vitro Cellular and Plant Developmental Biology*. 29P(4):207-212.
- 9.-Datla Raju S.S., Hammerlindl J.K., Pelcher L.E., Crosby W.L., Selvaraj G. 1991. A bifunctional fusion between β -glucoronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene*. 101: 239-246.
- 10.- Day A., Debuchy R., Dillewijn J.V., Purton S., Rochaix J.D. 1990. Studies on the maintenance and expression of cloned DNA fragments in the nuclear genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* 78:254-260.
- 11.- Debuchy R., Purton S., Rochaix J.D. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear

transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. The EMBO Journal. 8 (10): 2803-2809.

12.- De la Fuente J.M., Ramírez-Rodríguez V., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-Estrella L. 1997. Aluminium Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. Science. 276:1566-1568.

13.- Donald J.L. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* CS gene and antiserum. Journal of Bacteriology. 171: 5542.

14.- Dunahay T.G. 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with Silicon Carbide Whiskers. BioTechniques. 15(3):452-460.

15.-Dunahay T.G., Jarvis E.E., Dais S.S., Roessler P.G. 1996. Manipulation of Microalgal Lipid Production Using Genetic Engineering. Applied Biochemistry and Biotechnology. 57/58:223-231.

16.- Dunahay T.G., Adler S.A., Jarvik J.W. 1997. Transformation of Microalgae using Silicon Carbide Whiskers. Methods Mol. Biol. 62:503-509.

17.- Fromm M.E., Morrish F., Armstrong Ch., Williams R., Thomas J., Klein T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/technology. 8:833-839.

- 18.-Gallagher S.R. 1989. Spectrophotometric and fluorometric quantitation of DNA and RNA in solution, en "Current Protocols in Molecular Biology". Ausubel F.A., Brent R., Kingston, E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (Eds.). Ed. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Supplement 8: A.3.9-A.3.12
- 19.- Gooday G.W. 1971. A biochemical and autoradiographic study of the role of the Golgi bodies in the thecal formation in *Platymonas tetrathele*. J. Exp. Bot. 22:959-971
- 20.-Guillard R.R.L. y Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- 21.-Guillard R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. en "Culture of Marine Invertebrate Animals". Smith W.L. y Chanley M.H. (Eds.) Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.
- 22.- Hall L.M., Taylor K.B., Jones D.D. 1993. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Gene. 124:75-81.
- 23.- Kellam S.J., Cannell R.J.P., Owsianka A.M., Walker J.M. 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. Br. Phycol. J. 23:45-7.

- 24.-Keller L.R. 1995. Electroporation of DNA into the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods in Molecular Biology*. 55:73-79 (1995).
- 25.- Kindle K.L., Schnell R.A., Fernández E., Lefebvre P.A. 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* Gene for Nitrate Reductase. *The Journal of Cell Biology*. 109 (6): 2589-2601
- 26.- Kindle L. K. 1990. High-Frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 87:1228-1232.
- 27.- Kylin H. 1935. Über Rhodomonas *Platymonas* und *Prasinocladus*. *K. Fysiogr. Sällsk. Lund Förh.* 5 (22): 1-13.
- 28.- Kobara T., Hori T. 1975. On the formation and germination of cyst in *Platymonas* and *Prasinocladus* (Prasinophyceae). *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 23:111-115
- 29.-Lewin, R.A. 1958. The cell walls of *Platymonas*. *J. Gen. Microbiol.* 19:87-90
- 30.- Mayfield S.P., Kindle K.L. 1990. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 87: 2087-2091.

- 31.-Mohnen V.A. 1988. The Challenge of Acid Rain. Scientific American. 259 (2):14-21
- 32.-Norris R.E., Hori T., Chihara M. 1980. Revision of the Genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). Bot. Mag. Tokyo. 93:317-339.
- 33.-Ning-Sun Yang y Christou Paul (Eds.). 1994. Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Cap.1: Birch R.G. y Bower R. Ed. Oxford University Press. New York. p. 1-29
- 34.-Oswald W.J. 1978. New wastewater treatment method yields a harvest saleable algae. WHO Chron. 32(9),348-350.
- 35.-Paniagua M.J., Buckle R.L.F., Granados M.C., Loya.S.D.H. 1989. Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. 2a. Edición. CICESE, Acuicultura. 57 p.
- 36.- Provasoli L., Yamasu T., Manton B. 1968. Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. J.Mar.Biol. Ass. U.K. 48:465-479.
- 37.- Randolph-Anderson B.L., Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Johnson A.M., Dorthu M.P., Matagne R.F. 1993. Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. Mol. Gen Genet. 236:235-244.

- 38.- Rochaix J.D, van Dillewijn J. 1982. Transformation of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* with Yeast DNA. *Nature*. 296:70-72.
- 39.-Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2a. Edición. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 5.31-5.32 pp.
- 40.- Sanford, J.C. 1990. Biolistic Plant Transformation. *Physiologia Plantarum*. 79:206-209.
- 41.-Sanford, J.C., Devit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K., Johnston, S.A. 1991. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* 3:3-16.
- 42.-Sanford, J.C., Smith, F.D., Russel, J.A. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In *Methods in Enzymology*. Wu, R., ed. 217:483-509.
- 43.-Schiedlmeier B., Schmitt R., Muller W., Kirk M.M., Gruber H., Mages W., Kirk D.L. 1994. Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 5080-5084.
- 44.-Shure M., Wessler S., Fedoroff N. 1983. Molecular Identification and Isolation of the Waxy Locus in Maize. *Cell*. 35:225-233.

- 45.-Sizova I.A., Lapina T.V., Frolova O.N., Alexandrova N.N., Akopiants K.E., Danilenko V.N. 1996. Stable Nuclear Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker. *Gene* 181:13-18.
- 46.-Stevens D.R., Rochaix J.D., Purton S. 1996. The Bacterial Phleomycin Resistance Gene *ble* as a Dominant Selectable Marker in *Chlamydomonas*. *Molecular and General Genetics*. 251:23-30.
- 47.-Tang D.K., Qiao Sy, Yu M. 1995. Insertion Mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation and Heterologous DNA. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36(5):1025-1035.
- 48.- Tanoue E., Aruga Y. 1975. Studies on the life cycle and growth of *Platymonas* sp. in culture. *Jap. J. Bot.* 20:439-460.
- 49.- Thompson A.S., Rhodes J.C., Pettman I. (Eds.). 1988. Culture Collection of Algae and Protozoa, Catalogue of Strains. 5a. Edición. 164 pp.
- 50.- Tomes D.T., Ross M.C., Songstsad D.D. 1995. Capítulo 16: Direct DNA Transfer Into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture en Fundamental Methods*. Gamborg O.L., G.C. Phillips (Eds.). Ed. Springer. New York. 197-213 pp.

51.-Acid Rain and the Acuatic Environment. Internet. ENFO Briefing Sheet 14. 1993. Reference Number 50822 49721. UDC Number: 003.24:628.53.

Programa de búsqueda en Internet: Infoseek.

Dirección: <http://www.enfo.ie/Library/Leaflets.htm> #Briefing

52.-Introduction to acid rain and acid lakes. Internet.

Programa de búsqueda en Internet: Infoseek.

Dirección:

<http://www.schoolsucks.com/papers/science/environm/acid80.txt>

Base bibliográfica: a) Pearce Fred. 1987. Acid Rain. What is it and what is doing to us? Penguin Publishing House.

b)William Stone. 1989. Acid Rain. Fiend or Foe? New York Publishers.

c)Steward Gail. 1990. Acid Rain San Diego: Luncent books, Inc.

53.- Tetraselmis. Internet.

Programa de búsqueda en Internet: Lycos.

Dirección:

<http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/tets/summary.html>

XI-APENDICE

1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO F₂ (Guillard y Ryther 1962, Guillard 1975)

Añadir los siguientes componentes en 950 mL de agua de mar filtrada:

CANTIDAD	COMPUESTO	SOLUCION STOCK
1 mL	NaNO ₃	75 g/L H ₂ O destilada
1 mL	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g/L H ₂ O destilada
1 mL		Sln. de metales traza
0.5 mL		Sln. de vitaminas

Aforar a 1L con agua de mar filtrada. Esterilizar en autoclave.

2.-SOLUCION DE METALES TRAZA PARA MEDIO F₂ (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975).

Añadir a 950 mL de H₂O destilada los siguientes compuestos:

CANTIDAD	COMPUESTO	SOLUCION STOCK
31.5 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	
4.36 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	
1 mL	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8 g/L H ₂ O dest.
1 mL	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.0 g/L H ₂ Odest
1 mL	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0 g/L H ₂ O dest
1 mL	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180 g/L H ₂ O dest.

Aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar en autoclave

3.- SOLUCION DE VITAMINAS PARA MEDIO F₂ (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975).

Añadir a 950 mL de agua destilada los siguientes compuestos:

CANTIDAD	COMPUESTO	SOLUCION STOCK
1 mL	vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	1 g/L H ₂ O destilada
10 mL	Biotina	0.1g/L H ₂ O destilada
200 mg	Tiamina HCl	

Aforar a 1L con H₂O destilada. Esterilizar mediante ultrafiltración y almacenar en refrigerador.

4.-SOLUCIONES PARA DNA:

•**TRIS 1M** (Tris-hidroximetil-amino-metano): 121.1 g/L

Ajustar el pH al valor deseado con aproximadamente:

70 mL de HCl concentrado (pH 7.4)

60 mL de HCl concentrado (pH 7.6)

42 mL de HCl concentrado (pH 8.0)

distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave.

•EDTA 0.5M pH 8.0:

Na ₂ EDTA. H ₂ O	186.1 g/L	46.525 g/250mL
--	-----------	----------------

Ajustar el pH a 8.0 con

NaOH aprox (g): 20 g 5 g

Distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave.

•Cloruro de sodio 5M:

292.2 g/L o 73.05 g/250 mL de NaCl

distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave

•Cloruro de magnesio 1M.

203.3g/L ó 50.8 g/250 mL de MgCl₂.6H₂O

distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave.

•Acetato de sodio 3M.

408.1 g/L ó 102.025 g/250 mL de NaOAc.3H₂O pH 5.2

Ajustar el pH con ácido acético glacial, distribuir en alícuotas y esterilizar en autoclave

•Acetato de potasio 5M.

Agregar 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua a 60 mL de acetato de potasio 5M. La solución resultante será 3M con respecto a potasio y 5M con respecto a acetato.

•SDS 20%.

Disolver 20 g de SDS en 90 mL de agua, calentar a 68°C para ayudar a su disolución. Ajustar el pH a 7.2 agregando unas gotas de HCl concentrado, aforar a 100 mL y guardar en alícuotas. No es necesario esterilizar esta solución.

•**SSC 20X.**

Disolver 175 g de NaCl, 88.2 g de citrato de sodio en 800 mL de agua.

Ajustar el pH a 7.

Esterilizar en autoclave.

Aforar a 1L.

•**COMPOSICION DEL BUFFER DE EXTRACCION DE UREA.**

168 g de Urea
25 mL de NaCl (5M)
20 mL de Tris-HCl (1M) pH 8.
16 mL de EDTA (0.5M) pH 8
20 mL de sarcosina (lauril-sarcosinato de sodio) al 20%
190 mL de agua desionizada estéril.
El volumen total es de 400 mL.

La urea es el único componente del buffer que no es esterilizado en autoclave.

• TECNICA DE PREPARACION DEL FENOL-CLOFORMO.

Cloroformo.- Cuando se hable de cloroformo, se referirá a la mezcla de 24 partes de cloroformo y una de alcohol isoamílico (v/v).

Fenol.-

- a) Fundir el fenol a 65°C, agregar 8-hidroxi-quinoleína a una concentración final de 0.1%.
- b) Agregar un volumen igual de Tris 0.5M pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar durante 15 minutos a 4°C. Separar la fase acuosa (Tris) del fenol en embudo de separación (trabajar en campana de extracción).
- c) Agregar al fenol un volumen igual de Tris 0.1M pH 8.0. Repetir la extracción hasta que el pH de la fase acuosa sea mayor de 7.8.
- d) Cuando se haya alcanzado ese pH, se agregan 0.1 volúmenes de Tris 0.1M pH 8, que contenga 0.2% de 2-mercaptoetanol.

Esta solución puede almacenarse a 4°C en frasco ámbar.

Fenol-Cloroformo.-

- a) Mezclar cantidades iguales de fenol y cloroformo(25:24:1).
- b) Equilibrar la mezcla extrayendo varias veces con Tris.Cl 0.1M pH 7.6.
- c) Almacenar la mezcla equilibrada bajo un volumen igual de Tris 0.01M pH 7.6 en un frasco ámbar.

•REACTIVO DE HOECHST: Solución stock (1 mg/mL).

- a) Disolver 10 mg de colorante (fluorescente) Hoechst 33258 en 10 mL de agua destilada.

b) Almacenar en refrigerador y proteger de la luz.

El reactivo caduca en 6 meses aproximadamente.

•BUFFER TNE 10X.

a) Mezclar en 800 mL de agua desionizada estéril los siguientes reactivos:

12.1 g de base Tris

3.7g de EDTA- Na_2

58.4 g de NaCl

b) Ajustar pH a 7.4 con HCl concentrado y aforar a 1L con agua desionizada estéril.

•COMPOSICION DEL BUFFER 10X Reactivo 10 PARA DIGERIR CON Sal I

0.1 M de Tris-HCl (pH 7.6)

MgCl_2 al 10 mM

NaCl al 0.15 M

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 37°C.

•COMPOSICION DEL BUFFER TAE 50X (Sin. Stock):

a) Mezclar en 800 mL de agua desionizada estéril los siguientes reactivos:

242 g de Tris base

57.1 mL de ácido acético glacial

100 mL de 0.5M de EDTA (pH 8).

b) Aforar a 1L de agua desionizada estéril.

- **TAE 1X (Sin. de trabajo):**

0.04 M de Tris-acetato

0.001 M de EDTA

- **COMPOSICION DEL BUFFER DE CARGA 6X (Sin. stock):**

0.025% de cianol-xileno FF

0.025% de azul de bromofenol

30% de glicerol en agua

- **COMPOSICION DE LA SOLUCION DE BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL).**

a) Añadir 1 g de bromuro de etidio a 100 mL de agua.

b) Mezclar mediante agitador magnético durante varias horas para asegurar la disolución del colorante.

c) Envolver el contenedor en aluminio o colocar en frasco oscuro.

d) Almacenar a temperatura ambiente.

- **SOLUCION STOCK SSC 20X (BUFFER DE TRANSFERENCIA):**

a) Disolver 175g de NaCl y 88.2g de citrato de sodio en 800 mL de agua.

b) Aforar a 1 L. Ajustar el pH a 7.

c) Esterilizar en autoclave

5.-COMPONENTES DEL MODULO DE MARCAJE PRIMARIO AL AZAR. (RANDOM PRIME LABELLING MODULE. RPN 5751) DE VISTRA FLUORESCENCE KIT. AMERSHAM & LIFE SCIENCE.

• MEZCLA DE NUCLEOTIDOS: 300 μ L

5X de solución stock de fluorosceína-11-dUTP

(FI-dUTP), dATP, dCTP, dGTP y dTTP en TRIS-HCl, pH 7.8

2-mercaptoetanol y $MgCl_2$

• PRIMERS: 150 μ L. Nonámeros al azar en solución acuosa.

• SOLUCION ENZIMATICA: 30 μ L

5 unidades/ μ L de Klenow sin exonucleasas en solución amortiguadora, pH 6.5

• AGUA: 1 mL de agua desionizada

• DNA control, sin marca: 50 μ L

10 ng/ μ L de DNA lambda digerido con Hind III

• DNA control marcado con fluorosceína: 50 μ L

50 pg/ μ L marcado con fluorosceína de DNA lambda y digerido con Hind III en

50 ng/ μ L de DNA de esperma de *Clupea harengus harengus*.

• Bloque líquido: 50 mL para uso en el buffer de hibridación recomendado.

**6.- COMPONENTES DEL MODULO DE AMPLIFICACION DE SEÑAL RPN
5750. VISTRA FLUORESCENCE KIT. AMERSHAM & LIFE SCIENCE:**

- **Conjugado de antifluoroscein-fosfatasa alcalina (AP):** 150 μ L, stock 5000X.
- **Bloque líquido:** 100 mL 2X, para uso en bloqueo de anticuerpo.
- **Bolsas de detección:** 16 bolsas para uso durante la aplicación del reactivo de detección y la subsecuente exposición al FluorImager.
- **Reactivo de detección:** 36 mg, conteniendo AttoPhos®.
- **Buffer de detección:** 60 mL, conteniendo dietanolamina al 2.4 M en agua