



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Establecimiento de un Sistema de Transformación Genética de
la Microalga *Dunaliella tertiolecta* a través de *Agrobacterium
tumefaciens***

TESIS

Que presenta

IBT. KARLA DENISSE LUNA AVELAR

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DRA. LOURDES JANETH GERMÁN BÁEZ

DR. ANGEL VALDEZ ORTIZ

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2016

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética, del programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Estuvo bajo la dirección de los Doctores Lourdes Janeth Germán Báez y Angel Valdez Ortiz, y contó con la asesoría de la MC. Claudia Desireé Norzagaray Valenzuela.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 18 del mes diciembre del año 2015, el (la) que suscribe Karla Denisse Luna Avelar alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Tecnología de Alimentos con número de cuenta 1375604-4, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Angel Valdez Ortiz y cede los derechos del trabajo titulado “Establecimiento de un sistema de transformación genética de la microalga *Dunaliella tertiolecta* a través de *Agrobacterium tumefaciens*”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Karla Denisse Luna Avelar

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Autónoma de Sinaloa, en especial a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y a la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por permitirme ser parte del programa de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

A los Doctores y Maestros de la MCTA por compartir sus conocimientos con el fin de emplearlos durante la realización de la maestría, así como el apoyo por parte de todos ellos para resolver dudas y comentarios.

A mis directores de tesis, la Dra. Lourdes Janeth Germán Báez y el Dr. Angel Valdez Ortiz, por su apoyo para realizar de manera acertada el proyecto de maestría y sobre todo por la oportunidad de permitirme formar parte del equipo de trabajo del Lab Big.

A mis compañeros de generación, a todos y cada uno de ellos agradezco las experiencias vividas a lo largo de toda la maestría, haciendo mi estancia en Culiacán más amena.

A mis compañeros del Lab Big: Jenni, Ana, Cindy, Claudia, Karelía, David, Junio, Cristian y otras personitas más que no forman parte de él, pero como si lo fueran, Marielita y el Chalio; sin duda alguna, chicos, hicieron de mi estancia en el laboratorio una de las mejores experiencias en lo que va de mi vida, gracias por su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A mis mejores amigas que desde lejos y por temporadas cerca, siempre me apoyaron incondicionalmente, las adoro Karely, Kenia y Maricruz, a las tres gracias, y felicidades por sus hermosos retoños, me hicieron tía muy joven.

A Giovani, por su cariño y comprensión, y que a pesar de la distancia siempre se mostró firme, apoyándome y animándome, gracias por estar conmigo tanto en las buenas como en las malas, haciéndome el camino al éxito más ligero andando de tu mano. Te amo bby ;*

A mi familia por todo su apoyo, porque vivir lejos de ellos no resulta tan fácil, sin embargo, han sabido estar presentes a pesar de la distancia. Gracias abuelo por recibirme siempre a mi llegada con los brazos abiertos.

A mi madre y mi hermana, mis pilares en la vida y quienes me inspiran seguir siempre firme y no dejarme caer. Gracias madre por darme la vida y gracias también por darme la mejor hermana del mundo. Las amo mami y Ceci.

Al ángel que desde hace tres años me acompaña, no alcanzaste a ver este logro más abuela, esos que tanto presumías a quien sea que preguntara por tus nietos. Siempre estarás presente en mis pensamientos y en mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	8
A MICROALGAS	8
1 Estructura celular de las microalgas	9
a Fotosíntesis	12
b Pigmentos fotosintéticos	14
2 Reproducción de las microalgas	15
3 Genética de microalgas	21
4 Clasificación de microalgas	29
5 Importancia mundial	31
6 <i>Dunaliella tertiolecta</i>	35
B BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS	37
1 Aplicaciones biotecnológicas	39
2 Ingeniería Genética	41
a Transformación genética en microalgas	44
1) Métodos de transformación genética	47
a) Conjugación	47
b) Electroporación	49
c) Biobalística o bombardeo de partículas	51

d) Agitación con esferas de cristal	53
e) Microinyección	54
f) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
2) Genes reporteros	60
3) Genes marcadores de selección	61
IV JUSTIFICACIÓN	63
V OBJETIVOS	64
A OBJETIVO GENERAL	64
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
VI MATERIALES Y MÉTODOS	65
A MATERIALES	65
1 Material celular	65
2 Vectores de transferencia genética	65
3 Medios de cultivos	65
B MÉTODOS	67
1 Cultivos de microalgas	67
2 Curva de crecimiento	68
a Medición por conteo celular en hemocitómetro	68
1) Tasa de crecimiento celular específico (μ)	69
2) Tiempo de duplicación (<i>dt</i>)	69
b Determinación de viabilidad celular	71
3 Determinación de la dosis letal mínima de higromicina	71
4 Transformación genética del cultivo de microalgas	72
5 Análisis bioquímico de células transformadas	73

a	Expresión transitoria del gen <i>gus</i>	73
b	Viabilidad celular	73
6	Determinación del Índice de Eficiencia de Transformación	74
7	Diseño de experimentos	75
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
A	CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO CELULAR DE LA MICROALGA <i>Dunaliella tertiolecta</i>	76
1	Establecimiento de la curva de crecimiento	76
a	Tasa de crecimiento celular específico (μ) y tiempo de duplicación (<i>dt</i>)	78
b	Viabilidad celular del cultivo	78
2	Dosis letal mínima de higromicina	81
B	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE <i>Dunaliella tertiolecta</i>	83
1	Análisis histoquímico de la expresión transitoria del gen <i>gus</i> en las células transformadas de <i>D. tertiolecta</i>	83
2	Viabilidad celular del cultivo de <i>D. tertiolecta</i> transformada	84
3	Análisis estadístico del Índice de Eficiencia de Transformación (IET)	86
VIII	CONCLUSIONES	90
IX	BIBLIOGRAFÍA	91
	ABREVIATURAS	118
	ANEXOS	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Estructura típica de una cianobacteria	10
2	Esquema de una célula eucariota, la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
3	Reproducción sexual en microalgas	18
4	Tipos de ciclos de vida exhibidos en las algas	20
5	Origen y propagación de plástidos en células eucariotas	28
6	Características del plasmido Ti perteneciente a <i>Agrobacterium</i>	59
7	Mapa genético del vector de transformación genética pCAMBIA1304	66
8	Cálculo del número celular utilizando el hemátocitometro	70
9	Curva de crecimiento del cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	77
10	Determinación de la viabilidad celular del cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> mediante el método por colorante de exclusión con azul de tripán	80
11	Efecto de la concentración de higromicina (mg/L) sobre el crecimiento de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	82
12	Análisis histoquímico de la expresión del gen <i>gus</i> en células de <i>D. tertiolecta</i>	85
13	Índice de Eficiencia de Transformación en <i>Dunaliella tertiolecta</i>	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Genomas de microalgas secuenciados y proyectos de secuenciación en curso.	23
2	Clasificación taxonómica de las microalgas de acuerdo a su pigmentación y otras características.	30
3	Especies clorófitas transformadas genéticamente y características del proceso de transformación.	46
4	Métodos de transformación genética empleados en diversas especies de microalgas.	48

I RESUMEN

La biotecnología de microalgas es una nueva área surgida en años recientes, interesada en el uso de estos microorganismos como biorreactores para la obtención de compuestos de alto valor como proteínas, pigmentos y ácidos grasos, entre otros, que tienen un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas. Dentro de esta nueva área, se han manipulado genéticamente diversas especies para producir una mayor cantidad de lípidos y ácidos grasos, así como la sobreexpresión de pigmentos, útiles tanto en la industria alimentaria y cosmética como en la industria de los biocombustibles, además, una aplicación un tanto más importante, ha sido la expresión de proteínas recombinantes, destinadas principalmente al área terapéutica y de la salud. *Chlamydomonas reinhardtii* fue la primera microalga verde modificada exitosamente, hasta la fecha, son pocas las microalgas del grupo de las clorófitas que han logrado ser manipuladas de manera exitosa. *Dunaliella tertiolecta* es una microalga verde que posee características peculiares para funcionar como un buen sistema de expresión de proteínas, esta especie carece de pared celular, lo que podría permitir la inserción del ADN exógeno al interior de la célula de una manera más fácil durante el proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El objetivo de esta investigación fue establecer un sistema de transformación genética de la microalga *D. tertiolecta* mediado por *A. tumefaciens* utilizando el vector de transferencia pCAMBIA 1304. Para ello se realizaron curvas de crecimiento y de viabilidad celular del cultivo de *D. tertiolecta*, obteniéndose al día 4 alrededor de 1×10^6 cel/mL y una viabilidad celular del 86 %, por lo que se fijó este día para determinar la dosis letal mínima de higromicina y establecer el sistema de

transformación. La dosis letal mínima de higromicina para la microalga resultó de 110 mg/L en medio TAP sólido. Durante la transformación de las microalgas se emplearon medio de infección sólido y líquido, DO_{600} de *Agrobacterium* de 0.5, 1.0 y 1.5, y tiempos de co-cultivo de 24, 48 y 72 h. Los valores de IET resultaron de la ponderación de la viabilidad celular y la eficiencia de transformación respecto a la expresión transitoria del gen *gus*, posterior a la transformación, dichos datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de tres factores y prueba de Fisher (LSD, $p \leq 0.05$), obteniendo diferencias significativas en los tratamientos con el método de infección en medio sólido: (1) $DO_{Agro} = 1.0$, $T_{co-cult} = 48$ h; (2) $DO_{Agro} = 1.5$, $T_{co-cult} = 48$ h; (3) $DO_{Agro} = 0.5$, $T_{co-cult} = 72$ h; (4) $DO_{Agro} = 1.0$, $T_{co-cult} = 72$ h y (5) $DO_{Agro} = 1.5$, $T_{co-cult} = 72$ h, con respecto a los demás. El protocolo de transferencia genética mediado por *Agrobacterium* presentado en esta investigación, podría ser de gran utilidad para la posterior obtención de microalgas transgénicas de *Dunaliella tertiolecta*, que expresen diversas proteínas recombinantes de interés nutricional, nutracéutico y terapéutico.

ABSTRACT

Biotechnology microalgae is a new field emerged in recent years, interested in using these organisms as bioreactors for the extraction of high value compounds such as proteins, pigments, fatty acids, and others, which have a wide range of biotechnological applications. In this new area, various species of microalgae have been genetically manipulated in order to increase the production of lipids and fatty acids, used in the biofuel industry, as well as the overexpression of pigments, useful in both the food, cosmetic industry. Also, recently it has achieved an important application, such as the expression of recombinant proteins, primarily destined for therapeutic and health areas. *Chlamydomonas reinhardtii* was the first genetically modified green microalgae successfully, to date there are few chlorophytes microalgae that have been successfully manipulated. Within this group, *Dunaliella tertiolecta* is a green microalgae that has interesting features which proposed them as an attractive protein expression system. This species lacks of cell wall, which could allow the insertion of exogenous DNA into the cell in an easier way during the genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The objective of this research was to establish a genetic transformation system of *D. tertiolecta* mediated by *A. tumefaciens* using the transfer vector pCAMBIA 1304. For this purpose, growth curves were made, and cell viability of *D. tertiolecta* culture was evaluated, finding the highest cell viability at day 4 of culture (86%) with cellular density of 1×10^6 cells/mL, choosing this day to perform the minimum lethal dose assay with hygromycin, and to realize the genetic transformation assays. The minimum lethal dose hygromycin for the microalga was found at the concentration of 110 mg/L in TAP solid medium. To establish the genetic transformation

system, different conditions were tested such as infection medium (solid or liquid), density of *A. Tumefaciens* OD₆₀₀ of 0.5, 1.0 and 1.5, and co-culture time (24, 48 and 72 h). To determine the best transformation conditions, a Transformation Efficiency Index (TEI) was established, combining the variables: cell viability and transient expression of the *gus* gene (number of *gus* cells positive). Data were statistically analyzed by three factors ANOVA and Fisher test (LSD, $p \leq 0.05$), obtaining significant differences the TEI of treatments using solid infection medium. The statistical showed five treatments with the higher TEI: ([1] DO_{Agro} = 1.0, T_{co-cult} = 48 h; [2] = 1.5 DO_{Agro} T_{co-cult} = 48 h; [3] DO_{Agro} = 0.5, T_{co-cult} = 72 h; [4] DO_{Agro} = 1.0, T_{co-cult} = 72 h and [5] DO_{Agro} = 1.5, T_{co-cult} = 72 h). The protocol for *Agrobacterium*-mediated gene transfer presented in this study could be useful for subsequent production of transgenic microalgae *Dunaliella tertiolecta*, which express recombinant proteins of various nutritional, nutraceutical and therapeutic interest.

II INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha surgido gran interés en las microalgas como biorreactores para obtener compuestos de alto valor como proteínas, pigmentos, ácidos grasos y polisacáridos, que tienen un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas. Dando lugar al desarrollo de una nueva área denominada biotecnología de microalgas, interesada principalmente en el cultivo de éstas, bajo condiciones controladas, con objeto de usar posteriormente la biomasa producida.

Dentro de esta nueva área, se han manipulado genéticamente diversas especies para producir una mayor cantidad de lípidos y ácidos grasos, aprovechados en la industria alimentaria y de los biocombustibles, pues se ha demostrado que el metabolismo de las microalgas puede ser ampliamente explotado para la producción de diversos tipos de biocombustibles (Radakovits y col 2010). Por otra parte, se ha logrado la sobreexpresión de pigmentos en especies de microalgas que normalmente los sintetizan en niveles moderados, y la producción de los mismos en microalgas incapaces de producirlos de manera natural, los cuales resultan de utilidad en la industria tanto alimentaria como cosmética; además, una aplicación mayormente importante, es la expresión de proteínas recombinantes, tales como proteínas complejas de origen humano, destinadas principalmente al área terapéutica y de la salud (Mayfield y Franklin 2005; León y col 2007). Por lo anterior y considerando las características del cultivo de las microalgas; poco costoso, tiempos cortos de producción, libre de patógenos humanos, y la capacidad de estos organismos de realizar modificaciones post-traduccionales, podría aseverarse que las microalgas funcionan como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, como

el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, primera microalga manipulada genéticamente de manera exitosa, considerándose como el punto de partida en esta área (Kumar y col 2004; Griesbeck y col 2006).

Una especie en particular, perteneciente al grupo de las clorófitas, al igual que *Chlamydomonas*, y que además posee características peculiares para funcionar como un buen sistema de expresión de proteínas, se encuentra dentro del género *Dunaliella*; la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* carece de pared celular, lo que podría permitir la inserción del ADN exógeno al interior de la célula de una manera más fácil durante el proceso de transformación genética.

Dentro de los procesos de transformación genética efectivos para la modificación de diversas especies de microalgas se encuentran la agitación con esferas de vidrio (Kindle 1990), biobalística (Dunahay y col 1995; Apt y col 1996; Falciatore y col 1999; Fischer y col 1999), electroporación (Maruyama y col 1994; Chen y col 2001; Sun y col 2005), y la transferencia mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar 2004; Kathiresan y col 2009; Cha y col 2011). Destacando este último por ser un método simple y eficiente en comparación con los demás.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria ampliamente utilizada para transformar células vegetales (Gelvin 1998). La capacidad de transferir genes posiciona a *A. tumefaciens* como un vector de transferencia, ya que virtualmente cualquier ADN de interés puede ser transferido a las células huéspedes (Zupan y col 2000).

El plásmido Ti, en el cual se encuentra el ADN que *Agrobacterium* transfiere a la célula huésped, posee un origen de replicación, una región *vir*, una región de transferencia (ADN-T) y genes que codifican enzimas para la síntesis y catabolismo de las opinas (fuente de energía) (Bolton y col 1986).

Recientemente, ha sido mostrado que un amplio rango de células huésped de tipo no vegetal ha sido transformado genéticamente por *A. Tumefaciens*, extendiéndose a más de 80 microorganismos, principalmente hongos que incluyen levaduras, además de células animales, microalgas y células procariotas (Kunik y col 2001; Kumar y col 2004; Soltani y col 2008; Kathiresan y col 2009).

Hasta ahora, solo se ha reportado la transformación exitosa, mediada por *A. Tumefaciens*, de tres especies de microalgas de agua dulce, entre ellas *Chlamydomonas reinhardtii* (Kumar y col 2004), *Haematococcus pluvialis* (Kathiresan y col 2009), *Chlorella vulgaris* (Cha y col 2012); y tres especies marinas: *Nannochloropsis* sp. (Cha y col 2011), *Dunaliella bardawil* (Anila y col 2011) y *Schizochytrium* sp. (Cheng y col 2012).

En la presente investigación se propone el establecimiento de un sistema de transformación genética de la microalga *D. tertiolecta* mediado por *A. tumefaciens* utilizando el vector de transferencia pCAMBIA 1304, el cual contiene el gen reportero de β -glucoranidasa (*gus*), además, cuenta con genes de resistencia a higromicina, para la selección de las células transformadas (Wilson y col 1999).

III REVISIÓN DE LITERATURA

A MICROALGAS

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotas o eucariotas que pueden crecer rápidamente y vivir en condiciones muy duras, debido a sus estructuras multicelulares o unicelulares simples (Radmer 1996).

Las microalgas son especies ubicuas; están presentes en todos los ecosistemas terrestres existentes, no sólo en acuáticos, lo que representa una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales, habitando en océanos, cuerpos de agua, rocas, suelos e incluso árboles. Comprenden arriba de 50 mil especies y representan una gran diversidad genética y metabólica; sólo un número limitado, de alrededor de 40 mil especies se han estudiado y analizado (Radmer 1996; Richmond 2004). Las microalgas representan el grupo de microorganismos más grande y poblado de la Tierra, estos pueden existir individualmente o en grupos y son consideradas los organismos vivientes más antiguos. Las microalgas forman parte de la base nutricional y recurso primario de nutrientes de la cadena alimentaria en los sistemas acuáticos, formando el fitoplancton (Guedes y col 2011).

Tradicionalmente las microalgas son consideradas organismos fotosintéticos que requieren dióxido de carbono como recurso de carbono, y luz solar como fuente de energía. Se consideran las responsables de más del 50 % de la productividad fotosintética primaria en la tierra, representando fábricas solares para un amplio rango de productos potencialmente benéficos (Milledge 2011). El interés por este grupo de microorganismos autotróficos, recae en su potencial empleo para la producción de

biomasa usando energía solar, para la obtención de alimentos, productos químicos y nutraceuticos (Lee 1989).

Debido a la estructura celular sencilla de las microalgas, la acumulación de energía química después del proceso fotosintético no se desperdicia en la construcción de estructuras complejas, sino que se orienta a un uso más eficiente de formación de nuevas células y por consecuencia un aumento en la producción de biomasa (Satyanarayana y col 2011).

1 Estructura celular de las microalgas

Existen dos tipos de microalgas: procariotas y eucariotas. Las primeras carecen de organelos rodeados por membranas (plástidos, mitocondrias, núcleo y aparato de Golgi) como ocurre en las cianobacterias (Fig 1) y las proclorófitas (Lee 1989). El ADN de las células procariotas no se organiza en cromosomas, radica libre en el citoplasma junto con las membranas fotosintéticas (Richmond 2004).

El resto de las microalgas son eucariotas y tienen organelos. Una célula eucariota típica (Fig 2) está rodeada por una pared celular compuesta de polisacáridos que son particularmente producidos y secretados por el aparato de Golgi, posee una membrana que rodea al núcleo, el cual contiene la mayor parte del genoma distribuido en un conjunto de cromosomas, y el nucléolo. La membrana plasmática rodea el resto de las partes de la célula, la cual es la estructura responsable de controlar el flujo externo e interno de sustancias en el protoplasma (Lee 1989).

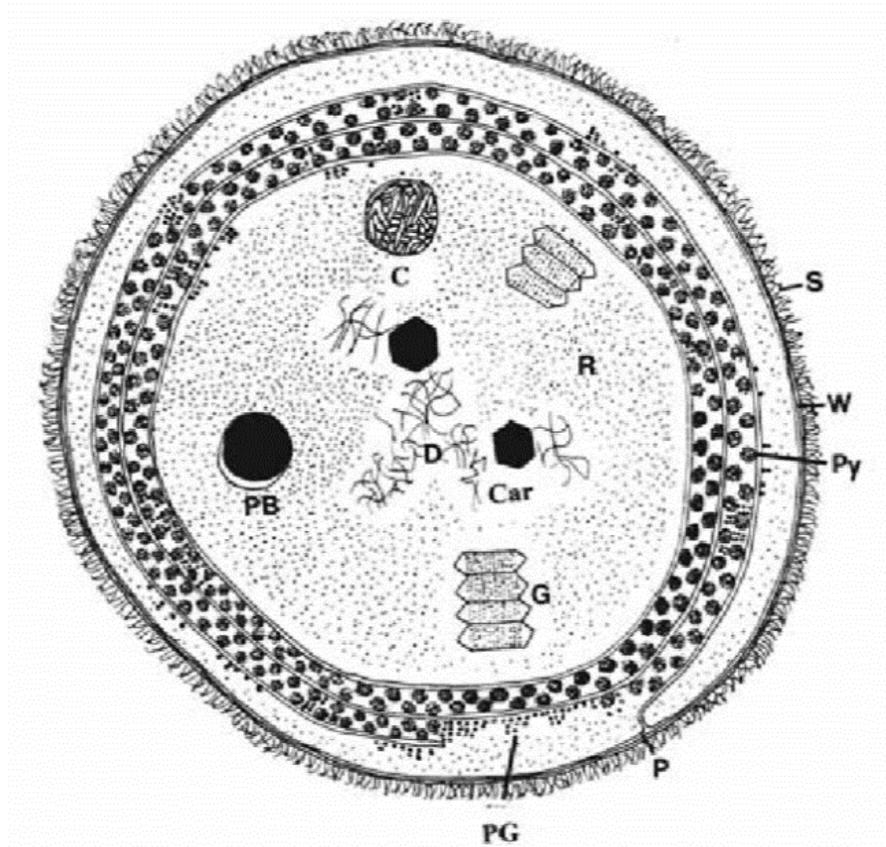


Figura 1. Estructura típica de una cianobacteria. (C) cuerpos de cianoficina (gránulos estructurados); (Car) carboxisomas (cuerpos polihédricos); (D) fibrillas de ADN; (PG) gránulos de poliglucano; (Py) ficobilisomas; (R) ribosomas; (S) cubierta; (W) pared celular. Tomado de Lee (1989).

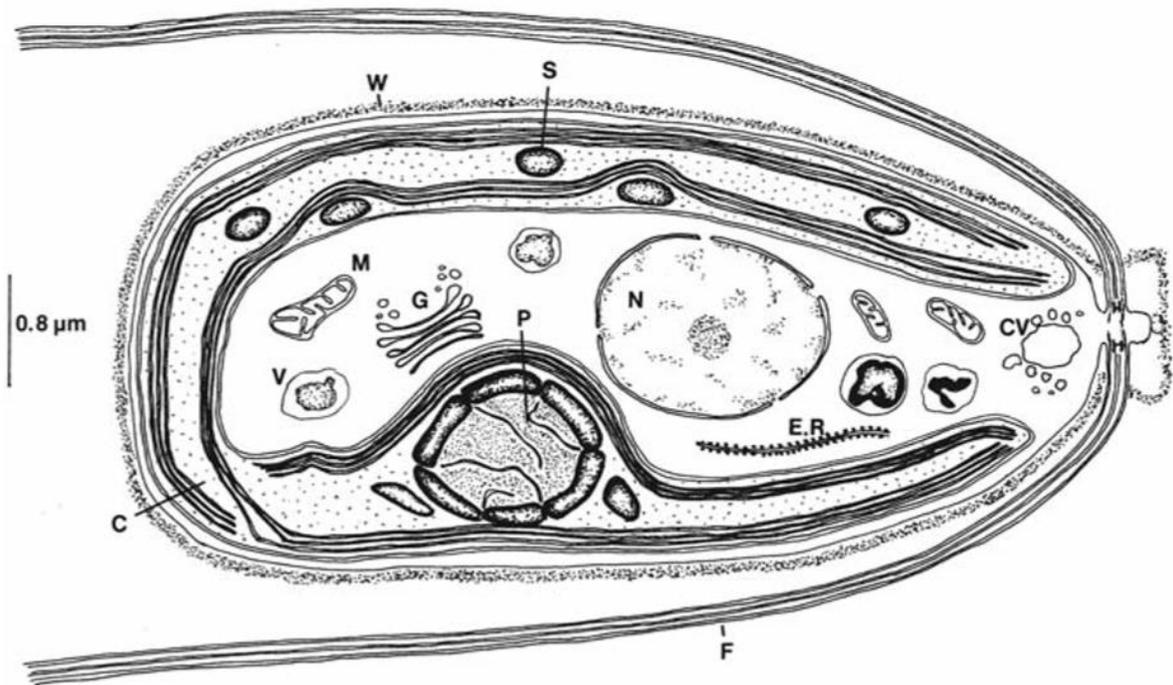


Figura 2. Esquema de una célula eucariota, la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* mostrando los organelos presentes en las células eucariotas. (C) cloroplasto; (CV) vacuolas contráctiles; (E.R.) retículo endoplásmico; (F) flagelo; (G) aparato de Golgi; (M) mitocondria; (N) núcleo; (P) pirenoide; (S) almidón; (V) vacuola; (W) pared celular. Tomada de Lee (1989).

El citoplasma está dividido en compartimentos y organelos ligados a membranas (aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas, centriolos y plástidos) con funciones específicas (Richmond 2004).

Los flagelos (órganos locomotores) ayudan a impulsar a la célula en el medio mediante su golpeteo, están situados en la membrana plasmática y tienen un número y orientación específico de microtúbulos. El núcleo, el cual contiene el material genético de la célula, está rodeado por una doble membrana con poros. Los cloroplastos están rodeados por dos membranas; algunas veces los cloroplastos contienen un área densa proteínica, el pirenoide, el cual se asocia con la formación de productos de almacenamiento. Los cloroplastos poseen sacos de membrana llamados tilacoides, que llevan a cabo la reacción de fotosíntesis. Los tilacoides están incrustados en el estroma, donde toman lugar las reacciones de fijación de CO₂ de la fase oscura. El estroma tiene pequeños ribosomas de 70S, ADN, y en algunos casos, productos de almacenamiento (Lee 1989; Richmond 2004).

a Fotosíntesis

Durante el proceso de fotosíntesis llevado a cabo en los cloroplastos de las microalgas, éstas aprovechan la energía luminosa para extraer protones y electrones de una variedad de moléculas donadoras, tales como H₂S, para reducir el CO₂ y formar moléculas orgánicas (Richmond 2004).

La biomasa de microalgas que forman parte del fitoplancton en el océano, equivale al 1-2 % del carbono vegetal total en el mundo, pero estos organismos fijan alrededor de 40 x 10⁹ toneladas de carbono por año, lo cual representa aproximadamente el 40

% del total mundial. Por lo que, la fotosíntesis del fitoplancton es significativa para los ciclos biogeoquímicos globales. Se cree que los primeros organismos fotoautótrofos evolucionaron hace 3.5 billones de años. Posteriormente, emergieron los microorganismos fotosintéticos productores de oxígeno, que crearon el oxígeno de la atmósfera del planeta Tierra, las microalgas procariontas (cianobacterias) y eucariotas (Berger y col 1989; Falkowski 1994; Bo-Ping, 2001; Richmond 2004).

Las cianobacterias (algas verde azules), forman filamentos o agregados. Su organización interna, consta de una región central (nucleoplasma), la cual es rica en ADN, y una región periférica (cromoplasto), que contiene membranas fotosintéticas organizadas usualmente en paralelo, cerca de la superficie celular (Richmond 2004). Los microorganismos eucariotas autotróficos se dividen usualmente de acuerdo a sus pigmentos fotosintéticos: rodófitas (algas rojas), crisófitas (algas doradas), feofíceas (algas cafés) y clorófitas (algas verdes). Sus aparatos fotosintéticos se organizan en organelos especiales, los cloroplastos, los cuales contienen capas alternas de membranas de lipoproteínas (tilacoides) y una fase acuosa, el estroma (Staehelein 1986).

La fotosíntesis oxigénica puede ser expresada como una reacción redox conducida por la energía lumínica (captada por moléculas de clorofila) en la cual el dióxido de carbono y agua son convertidos a carbohidratos y oxígeno (Richmond 2004).

La conversión tradicionalmente se divide en dos etapas, en las llamadas reacciones de luz y de oscuridad. En la reacción de luz, la cual tiene lugar sobre las membranas fotosintéticas, la luz capturada por los complejos antena periféricos, es

transferida eficientemente al centro de reacción de los complejos antena del fotosistema II y fotosistema I, donde ocurre la separación primaria de las cargas, de tal manera que la energía lumínica es convertida a energía química proveyendo un reductor bioquímico NADPH_2 y un compuesto de alta energía ATP (Gokhale 2009). Las reacciones de oscuridad, toman lugar en el estroma, el NADPH_2 y el ATP son utilizados en la reducción secuencial bioquímica del dióxido de carbono a carbohidratos (Richmond 2004).

b Pigmentos fotosintéticos

Todos los organismos fotosintéticos contienen pigmentos orgánicos para captar la energía luminosa. Hay tres grupos mayores de clases de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas. Las clorofilas (pigmentos verdes) y carotenoides (pigmentos amarillos o naranjas) son lipofílicos y están asociados en complejos pigmento-proteína, mientras que las ficobilinas son hidrofílicas (Lee 1989; Richmond 2004).

Las moléculas de clorofila consisten en un anillo tetrapirrol (cabeza polar, cromóforo) que contiene un átomo central de magnesio, y un alcohol terpenoide de cadena larga (excepto la clorofila *c*). Estas moléculas están enlazadas no covalentemente a apoproteínas. Estructuralmente, los varios tipos de moléculas de clorofila *a*, *b*, *c*, y *d* difieren en la ubicación de sus sustituyentes en el anillo tetrapirrol. Todas las clorofilas tienen dos bandas de absorción: azul o verde-azul (450 - 475 nm) y rojo (630 - 675 nm). La clorofila *a* esta presente en todos los fotoautótrofos oxigénicos como parte del centro de reacción de los complejos pigmento-proteína, y las antenas (pigmentos accesorios) que captan la luz presentan clorofila *b* o *c* (Richmond 2004).

Los carotenoides representan un gran grupo de cromóforos naturales con un rango de absorción entre 400 y 550 nm. Los elementos básicos estructurales de los carotenoides son dos anillos de seis carbonos unidos por una cadena de 18 carbonos conjugados de doble enlace. Éstos, usualmente son hidrocarburos (carotenos, por ejemplo, α -caroteno o β -caroteno) o hidrocarburos oxigenados (xantófilas, por ejemplo, luteína, violaxantina, zeaxantina, fucoxantina o perinidina). Los carotenoides cumplen diversos roles en el aparato fotosintético, funcionan como (i) pigmentos accesorios que captan la luz y transfieren excitación a la clorofila *a* (ii) entidades estructurales en el interior del centro de reacción del complejo pigmento-proteína que captan la luz; y (iii) moléculas requeridas en la protección contra del exceso de irradiancia, tripletes de clorofila y especies reactivas de oxígeno. En las cianobacterias y algas rojas, la antena mayor contiene ficobilinas (ficoeritrobilina, ficocianobilina y ficourobilina), las cuales son tetrapirroles lineales, no asociados a un átomo de magnesio. Estos pigmentos accesorios absorben la luz verde-azul, verde, amarilla, o naranja (500 – 650 nm). En contraste a las clorofilas y carotenoides, las ficobiliproteínas son solubles en agua y los pigmentos se unen covalentemente a la apoproteína (Richmond 2004).

2 Reproducción de las microalgas

Las microalgas se propagan y multiplican generalmente por tres vías: vegetativa, asexual y sexual (Reddy 1996). En muchas especies unicelulares, la división celular o fisión binaria es el único mecanismo para la reproducción asexual. Esta puede ser extendida a las especies multicelulares, las cuales pueden reproducirse por fragmentación, o bien, mediante la producción de estructuras denominadas gemas o propágulos. Este proceso a menudo se denomina reproducción vegetativa y la

reproducción asexual se reserva para eventos que incluyen la formación de esporas especializadas (South y Whittick 2009).

La reproducción vegetativa no implica el rejuvenecimiento de los protoplastos y las paredes celulares de las unidades reproducidas son, ya sea total o parcialmente parentales. Mientras que la reproducción asexual sí implica el rejuvenecimiento de los protoplastos y los cuerpos reproducidos están desnudos o provistos de una nueva pared sintetizada por ellos mismos. Esto es posible gracias a la acción de células especializadas en la diferenciación que son capaces de multiplicar directamente a las microalgas (Reddy 1996).

La formación de esporas tiene lugar mediante la reproducción asexual, se distinguen funcionalmente de los gametos en que estas se desarrollan sin singamia o fecundación, es decir, no ocurre fusión de células para producir un cigoto. Las esporas o células vegetativas deben ser capaces de sobrevivir bajo condiciones adversas del medio ambiente. Estas usualmente engrosan su pared celular y reducen su actividad metabólica. Las esporas motiles poseen flagelos y son denominadas zoosporas, sus homólogas no-motiles, son las aplanosporas. Las exosporas y endoesporas se forman respectivamente por abstricción del contenido celular o internamente en la célula parental (South 1996).

La reproducción sexual en microalgas fue demostrada por primera vez en el siglo XIX en microalgas verdes filamentosas (*Spirogyra*) mediante conjugación (Gastineau 2001).

La reproducción sexual (Fig 3), involucra dos procesos funcionalmente opuestos: singamia y meiosis. El primero, es un proceso de dos etapas que involucra la fusión citoplasmática de gametos (plasmogamia) seguida por el apareamiento de cromosomas (cariogamia) (South 1996). Hay diferentes tipos de reproducción sexual, que dependen del tipo de estructura y función de los gametos (Reddy 1996).

En isogamia, ocurre la fusión de gametos morfológica y fisiológicamente similares, debido a esto, los gametos que se fusionan para formar un cigoto presentan la misma apariencia y comportamiento; sin embargo, difieren en sus atributos sexuales, pues el gameto hembra se fija y produce feromonas que atraen al gameto macho (Muller 1981).

En anisogamia, los gametos fusionados son similares en estructura, pero difieren en tamaño. El gameto más pequeño es el macho o microgameto, mientras que el gameto más grande es llamado hembra o macrogameto, usualmente el gameto macho es más activo que la hembra. En oogamia, los gametos fusionados son de diferente tamaño y comportamiento. Uno de los gametos es pequeño y móvil (esperma), el cual se une a la hembra, un gameto inmóvil o no-flagelado. El producto es llamado oospora o cigoto (Fig 3) (Reddy 1996).

El segundo proceso es la meiosis, el aspecto más importante de la reproducción sexual. Se refiere al intercambio genético de información (en sinapsis) y la selección independiente de cromosomas en las células resultantes (South 1996).

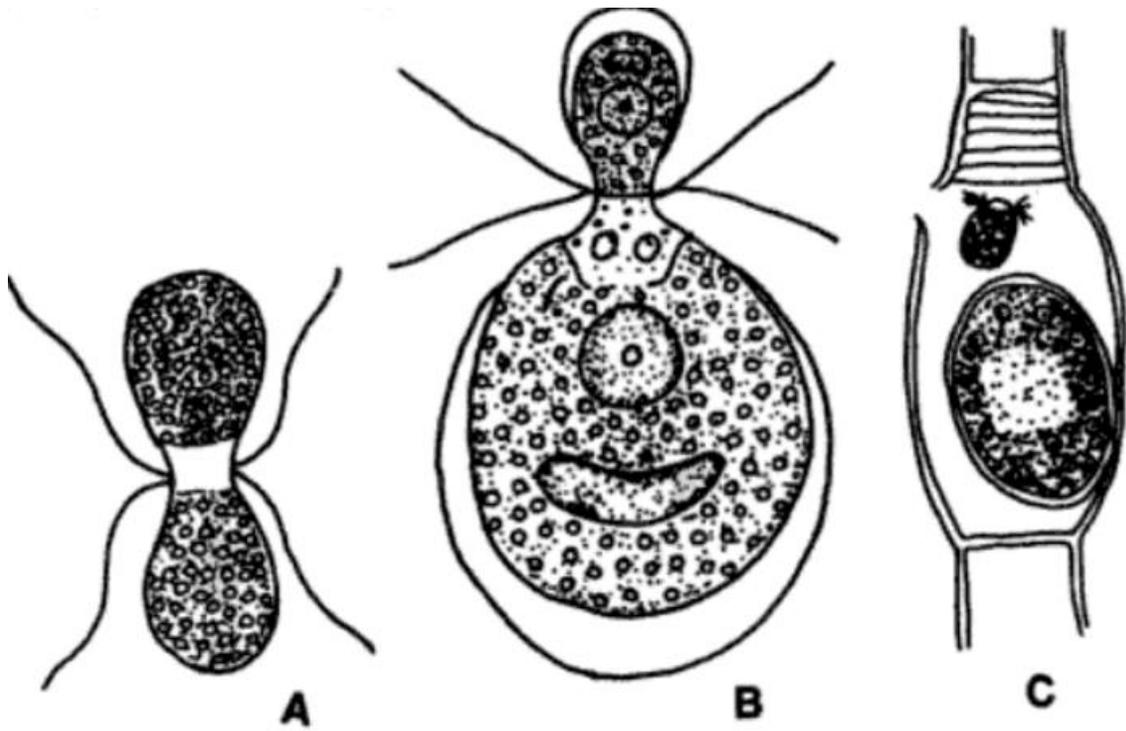


Figura 3. Reproduccion sexual en microalgas: A, Isogamia; B, Anisogamia; C, Oogamia. Tomada de Reddy (1996).

En las algas pueden ser distinguidos 4 sitios de meiosis:

1. Durante la germinación del cigoto, el cual ocurre en una sola fase diploide; denominada meiosis cigótica.
2. Durante la formación de la espora, que posteriormente germina para formar una célula haploide, la cual producirá gametos por mitosis; denominada meiosis espórica.
3. Durante la formación de gametos, la cual ocurre en una sola fase haploide; denominada meiosis gamética.
4. Durante la división celular vegetativa, la cual es seguida por la formación de una espora o un gameto. Una parte del tallo es haploide y la otra diploide; denominada meiosis somática.

El crecimiento y desarrollo de una microalga procede a lo largo de un número de distintas etapas morfológicas y citológicas, la secuencia ordenada de estos cambios se denomina ciclo de vida o historia de vida (Fig 4) (Reddy 1996).

Los ciclos de vida cigóticos son generalmente considerados como primitivos y ocurren en su mayoría en algas unicelulares. Los ciclos de vida espóricos tienen una fase de producción de esporas y una fase de producción de gametos, la esporófito usualmente es diploide y el gametófito es haploide; a las secuencias periódicas de esporófito y gametófito se les llama alteraciones de generación. Los ciclos de vida gaméticos no son muy comunes en las algas, sin embargo, han surgido en algunos grupos. Por último, la meiosis somática se ha presentado en ciertas especies clorófitas y rodófitas de agua dulce (South 1996).

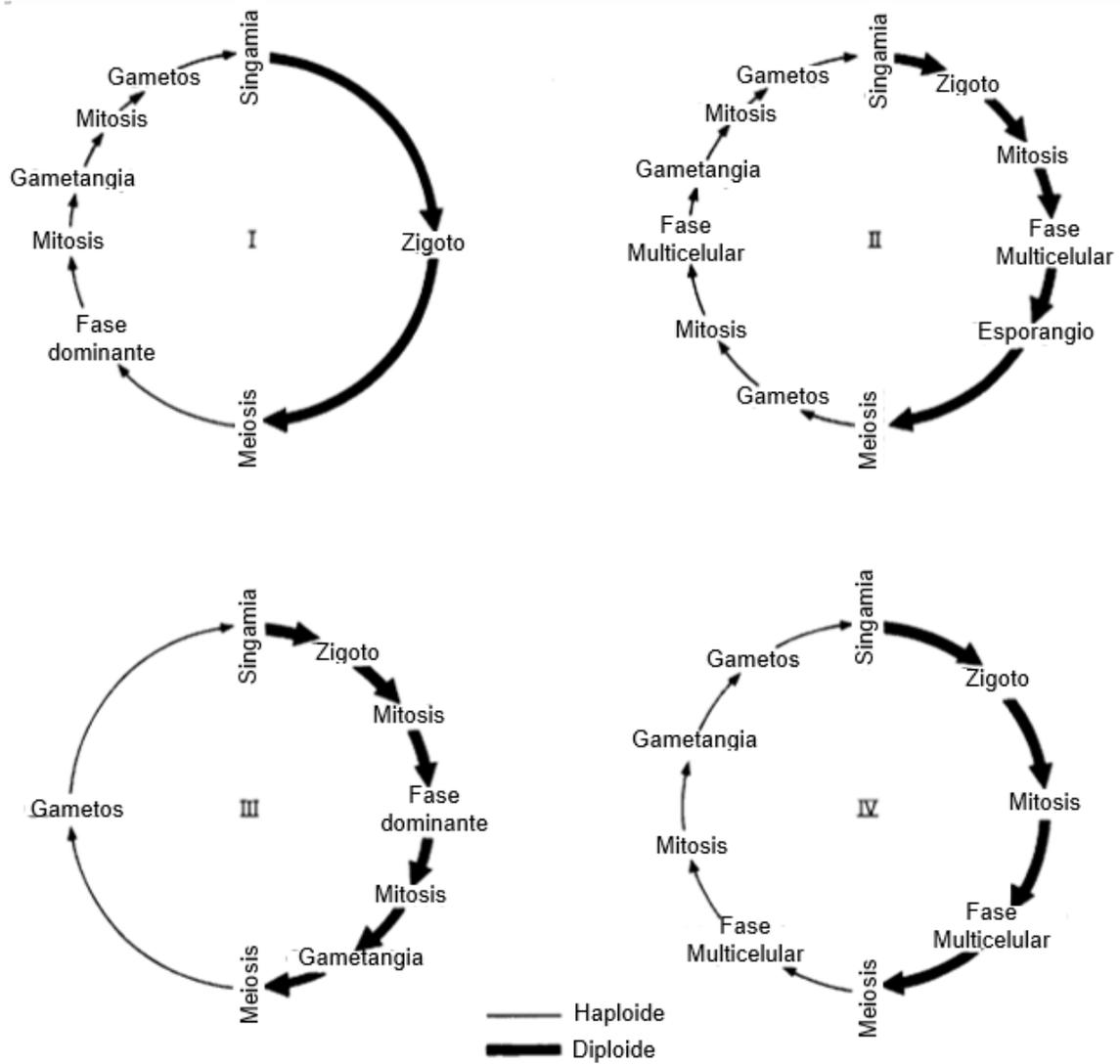


Figura 4. Ciclos de vida exhibidos en algas. I, cigótico; II, esporogénico; III, gamético; IV, somático. La fase dominante en I y III puede ser multicelular. Tomada de Reddy (1996).

3 Genética de microalgas

La diversidad genética de las microalgas es un tema de gran importancia, pues muchas de ellas ocupan posiciones clave en el árbol de la vida y pueden proveer información sobre los eventos ocurridos durante su evolución. Dicha diversidad filogenética es también de interés con respecto a la biología general de estos organismos. Como resultado de sus historias evolutivas divergentes, los diferentes grupos de algas a menudo exhiben nueva información en términos de su metabolismo, biología celular, morfología, historias de vida, etc.

Estas características resultan de interés desde un punto de vista fundamental, como recurso potencial de moléculas y novedosos procedimientos con un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas (Cock y Coelho 2011).

En años recientes, la aplicación del enfoque genómico ha permitido el avance significativo en muchas áreas de investigación de algas. Lo poco de secuenciación genómica disponible en microalgas, ha provisto importante conocimiento sobre el funcionamiento de estos microorganismos en su medio ambiente. Este enfoque combina métodos que permiten el análisis de expresión de genes, tales como secuenciación de ADNc o análisis de microarreglos. Una de las consecuencias de la amplia distribución filogenética de las microalgas a lo largo de muchos grupos eucariotas, es que representan un enorme potencial para el descubrimiento de nuevos procesos biológicos que incluyen rutas metabólicas, rutas de señalización, procesos celulares, regulación del crecimiento, etc (Coelho y col 2007; Cock y Coelho 2011).

Los genomas son fundamentales para la manipulación genética y más para la ingeniería genética, pues no solo proveen la ubicación y la distribución de enzimas y rutas metabólicas, sino que también ayudan en la identificación de algunos elementos, como factores que actúan en *cis* y *trans*, y otros elementos regulatorios, utilizados para hacer mejoras en ingeniería genética (Qin y col 2012).

El campo de la genómica en cianobacterias marinas empezó con la publicación de tres genomas de los autótrofos *Prochlorococcus* más pequeños (Dufresne y col 2003; Rocap y col 2003). A la fecha, han sido liberados cerca de 20 genomas de cianobacterias. Estas poseen muchas características en su genoma que son diferentes de otras algas, ejemplos de estas diferencias, incluyen una antena captadora de luz en su membrana externa, un sistema de dos componentes de transducción de señales (genes *hik* y *rer*), y su metabolismo autotrófico. En términos evolutivos, los cloroplastos son considerados como los antecesores de las cianobacterias (Allen y col 2011).

El auge de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), aunado a un alto descenso en su coste, ha llevado a la adquisición de importantes datos genómicos en microalgas a partir de la década de los 90's (Cadoret y col 2012). Referente a la genómica en microalgas marinas eucariotas, esta empezó con la dilucidación de las secuencias completas de los tres cromosomas nucleomorfos remanentes de la criptomonada *Guillardia theta* (Douglas y col 2001). Desde entonces, numerosos genomas han sido secuenciados o sus proyectos de secuenciación están en proceso, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Genomas de microalgas y proyectos en secuenciación

Espece	Cepa	Grupo Filogenético	Marina	Tamaño del genoma (Mpb)	Status de la secuenciación	Referencia
<i>Bathycoccus prasinus</i>	Bban7	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si		Completo	Moreau y col 2012
<i>Ostreococcus tauri</i>	OTH95	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si	12.6	Completo	Derelle y col 2006
<i>Ostreococcus "lucimarinus"</i>	CC9901	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si	13.2	Completo	Palenick y col 2007
<i>Ostreococcus</i> sp.	RCC809	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si		En proceso	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC827	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si	15	Completo	Worden y col 2009
<i>Micromonas pusilla</i>	CCMP1545	Plantae, Prasinophyceae (alga verde)	Si	15	Completo	Worden y col 2009
<i>Duanliella salina</i>	CCAP 19/18	Plantae, Chlorophyceae (alga verde)	No	130	En proceso	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Chlorella vulgaris</i>	C-169	Plantae, Trebouxiophyceae (alga verde)	No	40	En proceso	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/

Cuadro 1. Continuación

Especie	Cepa	Grupo Filogenético	Marina	Tamaño del genoma (Mpb)	Status de la secuenciación	Referencia
<i>Chlorella</i> sp.	NC64A	Plantae, Chlorellaceae (alga verde)	No	46.2	Completo	Blanc y col 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC-503 cw92 mt+	Plantae, Chlorophyceae (alga verde)	No	120	Completo	Merchant y col 2007
<i>Volvox carteri</i>		Plantae, Chlorophyceae (alga verde)	No	140	Completo	Prochnik y col 2010
<i>Cyanophora paradoxa</i>		Plantae, Glaucophyta	No		En proceso	http://www.biology.uiowa.edu/cyanophora_home.html
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	10D	Rhodophyta, Cyanidiaceae (alga roja)	No	16.5	Completo	Matsuzaki y col 2004
<i>Galdieria sulphuraria</i>		Rhodophyta, Cyanidiaceae (alga roja)	No		En proceso	http://genomics.msu.edu/galdieria
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP1335	Heterokonta, Bacillariophyceae (diatomea)	Si	34.5	Completo	Armbrust y col 2004
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	CCAP1055/ 1	Heterokonta, Bacillariophyceae (diatomea)	Si	20	Completo	Browler y col 2008

Cuadro 1. Continuación

Especie	Cepa	Grupo Filogenético	Marina	Tamaño del genoma (Mpb)	Status de la secuenciación	Referencia
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	CLN-47	Heterokonta, Bacillariophyceae (diatomea)	Si	250	En proceso	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Fragilariopsis cylindrus</i>	CCMP 1102	Heterokonta, Bacillariophyceae (diatomea)	Si	35	En proceso	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	CCMP 1984	Heterokonta, Pelagophyceae	Si	32	Completo	Gobler y col 2011
<i>Ochromonas</i>	CCMP1393	Heterokonta, Chrysophyceae	No		En proceso	http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/nanoflagellates.html
<i>Phaeocystis globosa</i>		Haptophyta, Prymnesiophyceae	Si		Pendiente	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Phaeocystis antarctica</i>		Haptophyta, Prymnesiophyceae	Si		Pendiente	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Emiliana huxleyi</i>	CCMP1516	Haptophyta, Prymnesiophyceae	Si	220	Disponible	http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/
<i>Guillardia theta</i>	CCMP2712	Cryptophyta, Cryptophyceae	Si		Completo	Douglas y col 2001
<i>Bigelowiella natans</i>	CCMP2755	Rhizaria, Chlorarachniophyceae	Si		Completo	Gilson y col 2006

Debido a su proximidad filogenética a las plantas terrestres y porque muchas de las herramientas moleculares son idóneas, la clorófito *Chlamydomonas reinhardtii* fue elegida como modelo entre los organismos fotosintéticos y la secuenciación completa de su genoma nuclear fue consumado en el 2007 (Merchant y col 2007). Las otras especies de algas secuenciadas fueron elegidas debido a sus roles ecológicos, distribución filogenética o por su naturaleza nociva, proveyendo información extensa de la evolución de estas especies (Cadoret y col 2012).

Los genomas de las microalgas pueden ser estructuralmente complejos y de un rango de tamaños que van desde los 12.6 Mpb para la clorófito *Ostreococcus tauri*, y 168 Mpb para la haptófito *Emiliania huxleyi*, hasta un estimado de 10,000 Mpb para la dinófito *Karenia brevis* (Derelle y col 2006; Cadoret y col 2012).

Los genomas de las microalgas eucariotas fueron formados principalmente por las fuerzas de transferencia endosimbiótica de genes y la transferencia horizontal de genes. Los fotoautótrofos eucariotas aparecieron hace al menos 1.2 billones de años cuando las eucariotas unicelulares no fotosintéticas acogieron exitosamente una cianobacteria, lo cual dio como resultado un plástido fotosintético de dos membranas que contenía un genoma derivado de cianobacterias (Reyes-Prieto y Bhattacharya 2007). Los genomas de plástidos varían ampliamente en tamaño y contenido de genes (Grzebyk y col 2003; Green 2011).

Los análisis con métodos filogenéticos de probabilidad máxima y Bayesiana, respaldan el origen de los eucariotas fotosintéticos con un evento de endosimbiosis primaria en algún momento antes de hace 1558 billones de años (Yoon y col 2004)

(Fig 5). Este evento primario endosimbiótico produjo tres linajes principales en las microalgas eucariotas: las verdes (clorofila *a* y *b*), las rojas y las glaucófitas (clorofila *a* y ficobilinas) (Parker y col 2008).

La división de las algas rojas y verdes ocurrió hace aproximadamente 1.5 billones de años (Yoon y col 2004). Los eventos secundarios endosimbióticos generaron más diversidad entre los eucariotas fotosintéticos. Las diatomeas, dinoflagelados, haptófitas y las criptomónadas fueron derivadas de la endosimbiosis secundaria, adquiriendo plástidos derivados de la invasión de las microalgas rojas, se calcula que este evento secundario ocurrió hace aproximadamente 1.3 billones de años (Yoon y col 2004). Mientras que un evento de endosimbiosis terciaria generó una gran diversidad entre los dinoflagelados.

La transferencia de genes horizontal (TGH) ocurre independientemente de los eventos endosimbióticos. El primer trabajo importante que describe el amplio impacto de la TGH sobre los eucariotas fotosintéticos fue realizado de manera completa en las cloracniófitas, encontrando que los genes diana de los plástidos, que representan el 21% del genoma nuclear de la cloracniófitas, *Bigeloviella natans*, fueron adquiridos por TGH a partir de numerosas otras fuentes como algas estreptófitas, algas rojas, así como de bacterias (Archibald y col 2003).

A la fecha, un incremento en los trabajos filogenéticos, han encontrado que este mecanismo juega un papel clave en los genes de eucariotas fotosintéticos y en su evolución genómica (Keeling y Palmer 2008; Chan y col 2011).

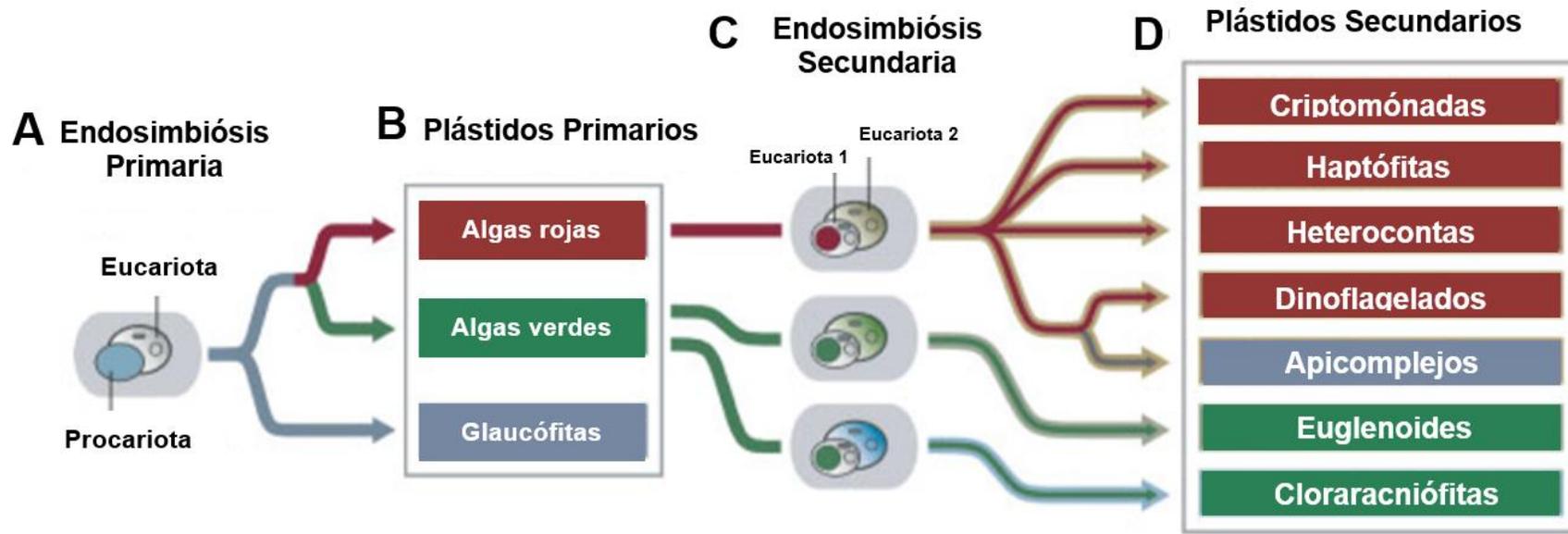


Figura 5. Origen y propagación de plástidos en células eucariotas. **A:** Endosimbiosis primaria entre una eucariota heterótrofa y una procariota fotosintética. **B:** Los tres linajes eucariotas de hoy en día, algas rojas, verdes y glaucófitas, poseen plástidos “primarios”. **C:** Tres endosimbiosis secundarias independientes entre células huéspedes y algas endosimbiontes rojas y verdes. **D:** Diversidad de eucariotas poseedoras de plástidos secundarios. Tomada de Archibald (2007).

4 Clasificación de microalgas

La historia evolutiva de las microalgas se puede categorizar por la pigmentación, ciclo de vida y estructura celular (Brennan y Owende 2010). Así, las microalgas procariotas se clasifican en dos divisiones: *Cyanophyta* y *Prochlorophyta*, y las eucariotas en nueve: *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* y *Chlorophyta* (Mutanda y col 2011).

Según Khan y col (2009), la clasificación de las microalgas se realiza en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas doradas.

Sin embargo, la clasificación taxonómica de las microalgas sigue siendo motivo de desacuerdos; Bold and Wynne (1985) resumen 12 clasificaciones de grupos mayores de microalgas (Cuadro 2). Se clasifican primariamente en base a su pigmentación, almacenamiento de productos, y una variedad de características ultraestructurales.

Más recientemente, las técnicas de biología molecular han sido usadas para determinar afiliaciones de los varios grupos de microalgas y su relación a otros grupos taxonómicos. El grupo verde-azul (cianobacterias) son procariotas cercanamente relacionadas a muchas bacterias comunes. Estas algas son consideradas progenitoras de los cloroplastos de algunas algas o plantas superiores (Gibbs 1992).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de microalgas de acuerdo a su pigmentación, almacenamiento de productos, y características ultraestructurales

Clasificación	Características celulares	Tipo de Clorofila	Presencia de Ficobiliproteínas	Producto de almacenamiento
Algas verde-azules	Procariota	a	Si	Glicógeno
Algas rojas	Eucariota	a, d	Si	Glicógeno
Algas verdes	Eucariota	a, b	No	Amilosa
Euglenoides	Mesocariota	a, b	No	Paramilona
Dinoflagelados	Mesocariota	a, c2	No	Amilosa
Criptófitas	Eucariota	a, c2	Si	Amilosa
Algas doradas	Eucariota	a, c1, c2	No	Crisolaminarina, Aceite
Haptófitas	Eucariota	a, c1, c2	No	Crisolaminarina
Diatomeas	Eucariota	a, c1, c2	No	Crisolaminarina, aceite
Algas verde-amarillas	Eucariota	a, c	No	Crisolaminarina
Cloromonadas	Eucariota	a, c	No	Aceite
Algas cafés	Eucariota	a, c1, c2	No	Laminarina

Lee (1989).

Las algas verdes están cercanamente relacionadas con las plantas superiores. Dinoflageladas y Euglenoides tienen ciertas características que las hacen intermediarias entre procariotas y eucariotas, y pueden ser denominadas mesocariotas; éstos pueden estar más relacionadas a las algas rojas y mohos que a otros grupos de algas. Aunque los métodos moleculares de análisis filogenético son nuevos y controversiales, dato a dato indican que las algas son heterogéneas a nivel molecular (Lee 1989).

Esta amplia diversidad muestra un gran potencial de explotación de estos microorganismos para la producción de productos de alto valor agregado y biocombustibles (Chisti 2007).

5 Importancia Mundial

La diversidad filogenética de las microalgas se refleja en un amplio rango de metabolismos y propiedades químicas, así como en una amplia diversidad bioquímica de pigmentos, productos de almacenamiento fotosintéticos, paredes celulares, mucílagos, ácidos grasos, lípidos, aceites, esteroides e hidrocarburos; así como compuestos bioactivos que incluyen metabolitos secundarios (Metting 1996).

Las microalgas se han usado por poblaciones indígenas por varios siglos. Incluso, las microalgas verde-azules comestibles, que incluyen a las especies *Nostoc*, *Arthrospira* (*Spirulina*) y *Aphanizomenon*, han sido utilizadas como alimento humano por miles de años (Jensen y col 2001). El mercado de las microalgas como alimentos y suplementos alimenticios está dominado por la cianobacteria *Spirulina platensis* (también llamada *Arthrospira platensis*), la clorófito *Chlorella* sp., la cianobacteria

Aphanizomenon flos-aquae, y, en Francia, la diatomea *Odontella aurita*. Además, la microalga verde *Dunaliella salina* es usada por su β -caroteno y *Haematococcus pluvialis* por la astaxantina (Cadoret y col 2012). Los pigmentos de las microalgas son utilizados principalmente por la industria alimentaria, cosmética y textil. Además de la clorofila, el principal pigmento fotosintético, las microalgas contienen una gran diversidad de pigmentos que están asociados con la incidencia de luz, estos mejoran la eficiencia en la utilización de la energía luminosa (ficobiliproteínas) y brindan protección contra la radiación solar (carotenoides) y sus efectos relacionados. Las ficobiliproteínas, ficocianinas y ficoeritrinas, son únicas de las algas y algunas preparaciones están siendo desarrolladas para cosméticos y alimentos (Hirata y col 2001; Pulz y Gross 2004). La investigación continúa siendo necesaria para el uso de otras microalgas como alimento, requiriendo gran esfuerzo para lograr la aceptación de estos recursos alternativos. Por ejemplo, las galletas ricas en Omega-3, hechas a partir de la haptófita *Isochrysis galbana*, que presenta alto contenido de omega-3 en su composición, las cuales ya han sido producidas (Gouveia y col 2008; Cadoret y col 2012).

A pesar de que las microalgas han sido usadas por los humanos como alimentos a lo largo de miles de años, el cultivo de las microalgas es una aplicación de la biotecnología moderna (Milledge 2011). Los cultivos algales de una sola especie fueron logrados por primera vez en 1890 con *Chlorella vulgaris* y la implementación de este tipo de cultivos fue utilizado para el estudio fisiológico de las plantas en 1990 (Borowitzka 2006).

El cultivo comercial a gran escala de *Chlorella* empezó a inicios de 1960 en Japón. Posteriormente, se estableció el cultivo y cosecha de *Arthrospira* a inicios de 1970 en el Lago de Texcoco por Sosa Texcoco S.A. (Ciudad de México). Para 1980, ya había 46 fábricas a gran escala en Asia produciendo más de 1000 kg de microalgas (principalmente *Chlorella*) por mes (Borowitzka 1999; Spolaore y col 2006). Hasta ahora, en un corto periodo de 30 años, la industria biotecnológica de microalgas ha crecido y se ha diversificado significativamente. Actualmente, el mercado de la biomasa microalgal produce cerca de 5000 toneladas de materia seca por año y genera aproximadamente 1.25×10^9 dólares por año (Pulz y Gross 2004; Spolaore y col 2006).

El área en el cual las microalgas fueron producidas en grandes masas fue la acuicultura. Los organismos del fitoplancton son el alimento esencial para la crianza de moluscos y peces, especialmente para alimentar a los bivalvos en sus etapas iniciales de vida, a los cuales, se les deben proveer microalgas vivas como alimento (Cadoret y col 2012).

Mientras que las microalgas proveen alimento para el zooplancton, estas también ayudan a estabilizar y mejorar la calidad del medio de cultivo. Efectivamente, para numerosas especies marinas y de agua dulce, la introducción de fitoplancton a estanques de cultivo (técnica de agua verde) conduce a mejores resultados en términos de sobrevivencia, crecimiento e índice de transformación que aquellas crecidas por la técnica de agua clara (Chuntapa y col 2003). Esto debido a que las microalgas, como recurso biológico renovable, contribuyen a la remoción de contaminantes en las aguas residuales (Kaštánek y col 2010).

Dicha capacidad permite considerar a las microalgas como principales componentes biológicos para el tratamiento de efluentes de diversos sistemas municipales e industriales. Siendo el oxígeno de la fotosíntesis, la contribución principal de las microalgas al tratamiento de las aguas residuales municipales en estanques o cuerpos de agua abiertos. Por otra parte, las microalgas son empleadas como biofertilizantes, pues presentan la capacidad de fijar N_2 , y como acondicionadores de suelos contribuyendo en el control de la erosión (Metting 1996).

El cultivo de las microalgas, además de tener un impacto ambiental favorable al reducir la concentración de gases de efecto invernadero, debido a que utiliza grandes cantidades de CO_2 durante su cultivo, provee materia prima para la producción de biocombustibles (Demirbas 2010). Actualmente hay un gran interés por la producción de grandes cantidades de éstos como alternativa a los combustibles fósiles en todo el mundo. Los biocombustibles como: bioetanol, butanol, biodiesel, hidrógeno y metano, son sintetizados a partir de fuentes biológicas (Stephanopoulos 2007). Particularmente, el biodiesel es una interesante alternativa para cubrir parte de la demanda energética de combustibles derivados de petróleo destinados al transporte (Chisti y Yan 2011). El uso de las microalgas para la producción de biodiesel ha surgido como una opción promisorio, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO_2 y otros nutrientes con respecto a las plantas, acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos (Chisti y Yan 2011), no requieren tierras cultivables, demandan menor consumo de agua renovable y pueden cultivarse en agua salobre (Amaro y col 2011; Chisti 2007; Demirbas 2010). La composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento de las microalgas tienen un efecto

importante en el rendimiento de biomasa y en el contenido de lípidos (Sims y Christenson 2011). Se ha demostrado que la limitación de nitrógeno y fósforo, incrementan el contenido lipídico en microalgas (Beer y col 2009; Scott y col 2010).

El biodiesel tiene las principales ventajas de ser una fuente de energía potencialmente renovable y biodegradable, durante su combustión produce menos emisiones nocivas de sulfuros, hidrocarburos aromáticos y partículas de hollín (Balat y Balat 2010). Dentro de los países con mayor producción de biodiesel se encuentran Estados Unidos de Norteamérica (4050 millones de litros por año), así como Alemania con una producción de 4655 millones de litros por año, seguido de España con 4194 millones de litros por año (National Biodiesel Board 2012; European Biodiesel Board 2014;). Países emergentes como Malasia, China, Brasil, Colombia, Argentina e Indonesia, desarrollan tecnologías promisorias en la industria del biodiesel (Li y col 2008). Y se estima que la producción mundial del biocombustible incrementará considerablemente con un mercado de 168,206 millones de litros para el 2016 (Li y col 2008; Timilsina y Mevel 2013).

6 *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta es una microalga verde que produce una gran cantidad de lípidos, debido a ésto se encuentra bajo consideración por ser una especie potencialmente productora de biodiesel; ya que además, crece en una gran variedad de ambientes (Georgiana 2013). *D. tertiolecta* pertenece a la división de las eucariotas que evolucionó hace aproximadamente 1.6 billones de años. Es una microalga unicelular de agua salada que presenta movilidad y una forma de varilla que puede

medir entre 9-18 μm , tiene una alta tolerancia a la sal, la temperatura y la luz. La célula se divide por fisión binaria simple y no hay evidencia de lisis celular, enquistamiento, o formación de esporas (Segovia y col 2003).

D. tertiolecta crece suficientemente rápido para medir con precisión el número de células después de 72 horas de cultivo. Esta microalga es relativamente fácil de cultivar. Ha sido utilizada para la remediación de aguas residuales, pues tiene la capacidad de utilizar los nutrientes inorgánicos presentes en las aguas residuales y la energía solar para producir biomasa a partir de dióxido de carbono. Se ha utilizado en ambientes marinos para determinar la toxicidad de efluentes. Las especies de estas microalgas son moderadamente sensibles a las sustancias tóxicas; una inhibición del crecimiento es un indicador clave de la toxicidad (Lipps 1993; Bhattacharya y Medlin 1998).

Esta microalga verde carece de una pared celular rígida y acumula grandes cantidades de glicerol como respuesta osmótica. La célula está delimitada por una membrana plasmática o periplasma, la cual permite los cambios rápidos en su forma y volumen celular en respuesta a los cambios osmóticos (Ben-Amotz y col 1973). La capacidad de las células para sobrevivir y crecer en ambientes salinos bajo la influencia del estrés osmótico ha recibido considerable atención. Las células desarrollan estrategias de adaptación en respuesta a los diferentes estréses abióticos tales como alta salinidad, deshidratación, bajas temperaturas, calor y presión osmótica excesiva. Contra estas tensiones, la célula se adapta sometiéndose a diferentes mecanismos, incluyendo cambios en el patrón morfológico y de desarrollo, así como en los procesos fisiológicos y bioquímicos (Bohnert y col 1995). La adaptación al estrés

está asociada con ajustes metabólicos que conducen a la acumulación de varios solutos orgánicos y osmolitos. La presión osmótica extracelular se combate en *Dunaliella* por la producción de glicerol intracelular (Avron 1986). El glicerol es metabolizado por la secuencia de dos reacciones interrelacionadas pero distintas; la concentración intracelular de glicerol es proporcional a la concentración de NaCl extracelular (Katz y Avron 1985).

B BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS

El desarrollo de la Biotecnología de las microalgas ha ido avanzando lentamente por el limitado rendimiento en el crecimiento de estos organismos en fotobiorreactores industriales. Actualmente la mayoría de la producción de las microalgas se lleva a cabo en cultivos al exterior (Spolaore y col 2006). Uno de los aspectos principales a lo largo de muchos años de la biotecnología de microalgas, ha sido el desarrollo de suplementos nutricionales producidos a partir de microalgas e incluso el uso de las mismas células, la biomasa microalgal, como alimento para la salud humana, la cual es el producto predominante dentro de esta área y es de gran importancia en el mercado (Radmer 1996; Apt 1999).

En un futuro se espera que las tendencias biotecnológicas en las microalgas permitan el empleo de diversas soluciones técnicas para el cultivo de estos organismos en fotobiorreactores, los cuáles sean adaptados a las demandas autoecológicas de cepas y a las aplicaciones de las mismas para la producción de biomasa en gran rendimiento, productos valiosos y para aplicaciones ecológicas.

Hay algunos indicios para suponer que las aplicaciones acuícolas serán un campo rentable para las microalgas en el futuro. Además, las aplicaciones ecológicas como el tratamiento de aguas residuales y el uso agrícola de microalgas para la fijación de nitrógeno o como acondicionadores de suelos tienen un potencial económico promisorio. Mientras que su aplicación farmacéutica y terapéutica en el área de la salud parece extenderse más a futuro. Sin embargo, ya existen algunos candidatos prometedores (Pulz y Gross 2004; Spolaore y col 2006).

Las microalgas ofrecen muchas ventajas sobre los sistemas de expresión de proteínas convencionales debido a su rápido crecimiento, tiempos más cortos de transformación y por su fácil escalamiento. Algunas microalgas como *Chlorella*, *Haematococcus* y *Dunaliella*, se utilizan para la fabricación de productos naturales y se caracterizan por no contener toxinas o patógenos humanos, lo cual las hacen más atractivas para la producción de compuestos farmacéuticos, tales como vacunas comestibles (Griesbeck 2006).

Un conjunto de herramientas genéticas están siendo desarrolladas para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Incluso aún con este conjunto incompleto de herramientas, esta célula fotosintética ha demostrado la promesa de ser una plataforma para la expresión de proteínas recombinantes. Con estos avances muchos investigadores han examinado la flexibilidad de ésta y otras especies de microalgas como máquinas biológicas capaces de producir péptidos y proteínas recombinantes de interés (Specht y col 2010).

1 Aplicaciones biotecnológicas

Recientemente las microalgas han conseguido mayor atención por su potencial aplicación biotecnológica e industrial. *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga de agua dulce considerada como una plataforma para la producción de proteínas terapéuticas humanas. Los tres genomas (nuclear, plastídico y mitocondrial) de esta especie han sido secuenciados y los métodos de transformación genética están bien establecidos. El cloroplasto de esta especie ha sido transformado y ha mostrado la expresión de proteínas recombinantes, así como la expresión de genes reporteros tales como *gus*, luciferasa y la proteína verde fluorescente, además de vacunas y enzimas industriales. Cabe mencionar que la transformación ha sido realizada tanto en el núcleo como en el cloroplasto de la microalga, presentando una expresión más alta en este último (Beth y Stephen 2010).

Numerosas especies de microalgas pueden sintetizar naturalmente compuestos valiosos, haciéndolos un recurso potencialmente importante de productos químicos que son aplicados en la alimentación, nutrición, cosméticos e industria farmacéutica (Gong 2011). Además, algunas especies de microalgas pueden ser eficientemente transformadas, lo que hace posible realizar mejoras en la productividad de compuestos naturales a través de la ingeniería metabólica (Cordero y col 2011). Por ejemplo la sobreexpresión del gen de la fitoeno sintasa de la microalga verde *Chlorella zofingiensis* en *Chlamydomonas reinhardtii*, permitió un incremento al doble del contenido de los carotenoides violaxantina y luteína (Cordero y col 2011); o la expresión de la β -caroteno cetolasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* para la síntesis de astaxantina en *C. reinhardtii* (León y col 2007).

Las microalgas también pueden ser modificadas genéticamente para la expresión de genes heterólogos para la producción de proteínas recombinantes que tienen un valor importante en aplicaciones industriales y farmacéuticas. A la fecha, algunas proteínas de origen animal, tales como anticuerpos, hormonas y vacunas, han sido expresadas en microalgas en un nivel económicamente rentable. Por ejemplo, la primera proteína terapéutica que se expresó en *Chlamydomonas* fue HSV8-Isc que contenía la proteína de cadena pesada IgA fusionada a una región variable de la cadena ligera (Mayfield y col 2003). Este anticuerpo de cadena larga simple (Lsc) fue ensamblado a un dímero en el cloroplasto y se acumuló como proteína soluble con la habilidad de unirse a las proteínas del virus del herpes (Mayfield y Franklin 2004). Más recientemente, un anticuerpo monoclonal humano, fue sintetizado y propiamente ensamblado en los cloroplastos *Chlamydomonas* (Tran y col 2009). Las microalgas transgénicas son realmente una plataforma robusta para la producción de proteínas terapéuticas humanas, lo cual está evidenciado por la expresión de siete proteínas con potencial o valor terapéutico (Rasala y col 2010).

En adición a lo anterior, mucha atención significativa se ha enfocado en las microalgas como materia prima de nueva generación para la producción de biodiesel, pues poseen un metabolismo capaz de ser explotado para la producción de lípidos en grandes cantidades (Chisti 2007; Yu 2011).

La mayoría de los lípidos de las microalgas son lípidos de membrana, con una contribución menor en el contenido total de lípidos de los triacilgliceroles (TAG), ceras esterificadas, hidrocarburos y esteroides. Las reservas de TAG acumulan grandes cantidades de lípidos en respuesta a diferentes tipos de estrés o deficiencia de

nutrientes. Los TAG representan > 50 % del peso seco de las microalgas y sirven para la síntesis de las membranas o como reserva de carbono (Hu y col 2008). Lo que hace posible una obtención de aceite 10 veces mayor que la obtenida de otras especies vegetales (Cadoret y col 2012).

Los mecanismos moleculares que desencadenan y controlan la acumulación de lípidos en las microalgas son poco entendidos. Sin embargo, los datos genómicos han permitido la identificación de nuevas enzimas y ayudan a mostrar como las rutas de lípidos se interrelacionan con la energía y con el metabolismo de los carbohidratos (Wallis y Browse 2010). En *Chlamydomonas reinhardtii* se ha demostrado que modificando las rutas de síntesis de ácidos grasos mejora la producción de TAG (Li y col 2010). Además, manipulando genéticamente la expresión de genes involucrados en el incremento de la absorción solar y en la fijación del CO₂, y bloqueando otros genes para la síntesis de almidón, se logra un cambio en el balance de la cantidad de lípidos en una célula de microalgas, promoviendo una mayor producción de éstos (Korkhovy y Blume 2013).

2 Ingeniería genética

La aplicación de Ingeniería Genética en las microalgas es una idea tentadora; por ejemplo, para lograr el incremento en su contenido de compuestos de interés. Debido a que la diferenciación celular está ausente en las microalgas, estas representan un sistema simple para la manipulación genética comparado con las plantas superiores. Sin embargo, los métodos exitosos usados para la transformación en otros sistemas han fallado regularmente al tratar de aplicarse en las algas, esto podría deberse a la

distancia evolutiva entre las algas y otros organismos. Es por esto que el sistema de transformación tiene que ser desarrollado casi desde el principio, incluyendo técnicas para introducir ADN en las células (Kindle 1990), promotores adecuados, nuevos genes marcadores de selección y vectores de expresión (Apt y Behrens 1999).

La transformación genética es la transferencia de un fragmento de ADN de un genoma donador, a través de la membrana celular de la célula receptora, y la incorporación del fragmento en el genoma de esta célula. La transformación solo se puede detectar cuando el ADN recién incorporado da lugar a un nuevo fenotipo. Por ejemplo, una especie sensible a un antibiótico puede desarrollar resistencia al mismo. La transformación de una célula de un genotipo a otro requiere algo más que la interacción física entre el ADN donador y la célula receptora. La célula receptora debe ser fisiológicamente competente, es decir, debe estar en un estado fisiológico tal que no solo haga posible el movimiento del ADN a través de la membrana sino que lo favorezca, hasta la incorporación de este ADN en su genoma (Jenkins 1986).

Básicamente, la técnica de transferencia de ADN a células de organismos superiores no difiere demasiado de la ya utilizada en bacterias. Sin embargo, los genes eucarióticos presentan importantes características, una de las principales es que las secuencias reguladoras eucarióticas son un tanto diferentes de las procariontas. Además, la regulación de la transcripción incluye unas secuencias llamadas estimuladores que influyen sobre el promotor. Por otra parte, en cuanto a la estructura interna de los genes, existe la presencia de intrones, regiones de ADN que no se expresarán en la proteína (Feito 1999).

Con las metodologías del ADN recombinante ahora es posible la producción de organismos modificados genéticamente o transgénicos, en los que se han insertado genes heterólogos mediante su manipulación. Particularmente en plantas, el poder introducir nueva información genética requiere que se cumpla con los siguientes dos requisitos: a) contar con un método de transformación eficiente de la especie de interés, y b) disponer de un método para la regeneración *in vitro* para la misma (Muñoz y col 2004).

Puesto que las técnicas de cultivo hacen posible que a partir de cualquier célula o tejido se puedan regenerar plantas completas, su uso resulta indispensable para la regeneración de individuos transgénicos que contengan la nueva información genética. En cuanto a la transformación se refiere, es necesario contar con un método que permita tanto la introducción del material genético que se pretende incorporar, como su integración estable, funcional y heredable en el genoma vegetal (Muñoz y col 2004).

La producción de proteínas recombinantes en modelos vegetales provee considerables ventajas no encontradas en otras plataformas de producción. Primero, la ventaja mayor que todos los sistemas de producción de proteínas en plantas tienen sobre otros sistemas de cultivo (incluyendo bacterias, levaduras, y cultivos celulares animales), es la significativa reducción en los costos. En segundo lugar, las proteínas producidas en plantas no son susceptibles a la contaminación por virus o priones que puedan afectar a los humanos, como en el caso de las células animales (Chebolu y Daniell 2009). En tercer lugar, como eucariotas, las algas y otras plantas poseen los

chaperones y maquinaria celular requerida para doblar proteínas humanas complejas que las bacterias y levaduras no son capaces de procesar (Franklin y Mayfield 2004).

Por su parte, las microalgas poseen un número de ventajas sobre los sistemas que emplean plantas transgénicas para la producción de proteínas recombinantes. Ellas pueden crecer en biorreactores, reduciendo el riesgo de contaminación de los sistemas de producción por contaminantes aéreos, y también protegiéndose del flujo de transgénicos hacia los ecosistemas de su alrededor. El crecimiento en contenedores también reducen ampliamente las pérdidas del cultivo por la depredación o ataques de patógenos. El progreso en el crecimiento de las microalgas desde una transformación inicial a la producción de proteínas a gran escala, puede lograrse en semanas, comparado con los tiempos de escala de meses o años en plantas superiores, tales como el maíz o tabaco (Franklin y Mayfield 2004).

Finalmente, muchas especies de algas verdes se consideran GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros) (Rosenberg y col 2008), lo que significa que las proteínas pueden ser biodisponibles evitando los pasos posteriores de purificación (Specht 2010).

a Transformación genética de microalgas

Debido a la complejidad de las microalgas y al esquema único genético y evolutivo, la ingeniería genética de estas debe considerar aplicar ambas metodologías de organismos procariotas y plantas. Desde finales de los 70's, la ingeniería genética en algas marinas empezó a ser implementada en el sistema modelo cianobacterial de la cepa *Synechococcus* 7002, la cual puede ser transformada por la adición exógena de

ADN homólogo portador de un marcador selectivo (Stevens y Porter 1980; Buzby y col 1985; Matsunaga y Takeyama 1995).

A finales de los 80's, muchas microalgas marinas eucarióticas y algas fueron transformadas exitosamente por diferentes métodos de transformación, por ejemplo micro-inyección en la macroalga marina verde *Acetabularia* sp. (Neuhaus y col 1986), vectores plasmídicos en diatomea marina *Cyclotella cryptic* (Dunahay y col 1995), y biobalística en la macroalga roja *Eucheuma* sp. (Kurtzman y Cheney 1991) y alga café *Laminaria japonica* (Qin y col 1998).

A principios de los 90's la tendencia de la ingeniería genética de microalgas marinas ha sido utilizarlas como fábricas de células y biorreactores marinos (Zaslavskaja y col 2001; León-Bañares y col 2004; Qin y col 2005).

A la fecha, el sistema de transformación genética más exitoso sigue siendo el sistema modelo de la alga verde de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* (Grossman 2000), cuya transformación a nivel de núcleo y cloroplasto ha alcanzado relevancia comercial prometedora (Franklin y Mayfield 2004, 2005). La transformación de esta especie se ha logrado por diferentes métodos, bombardeo de partículas (Debuchy y col 1989; Kindle 1989; Mayfield 2004), agitación por esferas de cristal (Kindle 1990), y electroporación (Shimogawara 1998). Desde entonces, se han producido importantes avances en relación a los marcadores selectivos, promotores y técnicas de transformación. Actualmente se puede disponer de más de treinta especies de algas de diferentes grupos taxonómicos que han sido transformadas con éxito (Radakovits 2010). En el cuadro 3 se muestran algunas especies clorófitas que han sido

Cuadro 3. Especies clorófitas transformadas genéticamente y características del proceso de transformación.

Especie	Método	Genoma	Transferencia
	Biobalística	Nuclear	Estable
	Biobalística	Cloroplasto	Transitoria
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Esferas de cristal	Nuclear	Transitoria
	Electroporación	Nuclear	Estable
	<i>A. tumefaciens</i>	Nuclear	Estable
<i>Volvox carteri</i>	Biobalística	Nuclear	Estable
	Biobalística	Nuclear	Estable
<i>Dunaliella salina</i>	Electroporación	Nuclear	Estable
	Electroporación	Nuclear	Estable
<i>Dunaliella viridis</i>	Electroporación	Nuclear	Estable
	Biobalística	Nuclear	Estable
<i>Haematococcus pluviales</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Nuclear	Estable
	Biobalística	Nuclear	Estable
<i>Chlorella sorokimiana</i>	Biobalística	Nuclear	Estable
<i>Chlorella kessleri</i>	Biobalística	Nuclear	Estable
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Biobalística	Nuclear	Transitoria
<i>Chlorella saccharophila</i>	Electroporación	Nuclear	Transitoria
<i>Chlorella vulgaris</i>	Electroporación	Nuclear	Transitoria

Ikaran (2011).

transformadas genéticamente, mismo grupo al que pertenece la microalga verde *Dunalliella tertiolecta*.

Los procesos biotecnológicos para la obtención de microalgas transgénicas aún están en sus etapas iniciales, pero el creciente interés de las aplicaciones industriales que esta tecnología ha despertado ha permitido un rápido desarrollo durante la última década.

Mediante modificaciones genéticas que incluyen la inserción de un gen concreto alterando rutas metabólicas fundamentales, se ha conseguido convertir especies con el fin de que estas produzcan alimentos funcionales y nutracéuticos, así como ingredientes que serán extraídos posteriormente para funcionar como aditivos en los alimentos (Radakovits 2010).

1) Métodos de transformación genética en microalgas

A la fecha, más de 30 diferentes tipos de algas marinas han sido transformadas exitosamente con varios métodos de transformación. En el cuadro 4 se resumen los métodos de transformación utilizados, así como las especies transformadas en su momento. En algunos casos, la transformación dió como resultado la expresión estable y exitosa de los transgénos incorporados, pero en muchos casos, solo se observó la expresión transitoria.

a) Conjugación

La conjugación es la transferencia de ADN entre una cianobacteria y una célula bacteriana (*Escherichi coli*) por contacto directo célula a célula, o por una conexión

Cuadro 4. Métodos de transformación genética empleados en diversas especies de microalgas

Método	Características
Conjugación	Es el principal en cianobacterias y rara vez usado en el presente.
Electroporación	El procedimiento es simple, y es usado universalmente para diferentes géneros, obligatorio en algas cafés.
Biobalística	El ADN exógeno puede introducirse en varias células y tejidos. Diversos vectores pueden ser aplicados para superar el fondo genético insuficiente de las especies. La manipulación es controlable y madura, pero requiere equipo especializado y de alto costo.
Esferas de vidrio	El procedimiento es simple y este no necesita equipo transgénico de alto costo. Es obligatorio en macroalgas debido a la tecnología de regeneración de protoplasto inmaduro.
Microinyección	Altamente eficiente y bajos costos, pero es un procedimiento complicado y delicado.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Es un método sencillo y eficiente, aunque a eficiencia depende altamente de muchos elementos. Diversas especies ya han sido transformadas por esta bacteria.

Qin (2012).

entre las dos células. Aunque este método es más frecuentemente usado en la manipulación genética de cianobacterias de agua dulce, la versatilidad de genes transferidos por conjugación en cianobacterias fue demostrada primero en cinco tipos de *Synechococcus* marinas, uno de *Synechocystis* y *Pseudanabaena* (Sode y col 1992).

La conjugación también puede ser implementada usando transposones movilizados y receptores de amplia gama (Brahamsa 1996). Un plásmido de ADN conteniendo el gen de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) fue trasferido a *Prochlorococcus* por conjugación interespecífica con *E. coli*, y la expresión de esta proteína fue detectada por Western Blot y fluorescencia celular. Este es el primer informe de la expresión de GFP en las cianobacterias marinas (Tolonen y col 2006).

b) Electroporación

En la electroporación, se forman agujeros transitorios en la membrana celular cuando se aplican pulsos de una corriente eléctrica. La transferencia de genes por electroporación ha sido aplicada en diversos tipos de células, animales, vegetales y bacterias por más de 30 años debido a la simplicidad del procedimiento y han mostrado una alta eficiencia con una pequeña cantidad de ADN (Zimmermann y col 1975; Neumann y col 1982).

Este método permite transferir genes extrínsecos independientemente de la habilidad y universalidad de la célula (Matsunaga y col 1995; Qin 2012). Es importante tomar en cuenta la influencia de la resistencia y osmolaridad en el medio usado para

la electroporación, el cual influye en la sobrevivencia celular; así como la concentración de iones divalentes que afectan la estructura del ADN y la estabilidad de la membrana, y la composición general del medio, ya que algunos medios penetran las células permeabilizadas eléctricamente, dañándolas considerablemente.

Diversos factores influyen en el éxito de la electroporación, estos incluyen la potencia del campo eléctrico, la duración del pulso, la composición y temperatura del medio y las características de la membrana del tipo de célula en particular (Zimmermann y col 1975).

La potencia del campo eléctrico necesario para transformar cianobacterias marinas, es regularmente más baja que para microalgas de agua dulce; sin embargo, la disminución en la eficiencia debido a la potencia del campo eléctrico puede ser compensada con un pre-tratamiento con CaCl_2 de las microalgas marinas (Brown y col 1991).

Generalmente antes de la aplicación de los pulsos eléctricos, se implementa un paso de pre-incubación para permitir al ADN exógeno entrar en contacto con la membrana microalgal. Este contacto es acentuado durante la transformación de mutantes que carecen de pared celular (Brown y col 1991; Butanaev 1994; Shimogawara y col 1998).

Se han obtenido transformantes estables de ambas cepas, con pared y sin pared celular de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella ellipsoidea*, y *Dunaliella salina* a través de este método. La alta eficiencia de transformación alcanzada en *Chlamydomonas* de 2×10^5 transformantes, por célula y μg de ADN, es

aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor a la obtenida con el método de agitación con esferas de cristal estándar para introducir ADN exógeno (León y col 2007).

A la fecha, la electroporación ha sido establecida en muchos géneros marinos desde células procariotas hasta algas eucariotas rojas, algas verdes y diatomeas. Recientemente, *Nannochloropsis* sp, la microalga marina “estrella” para la producción de biocombustibles, fue exitosamente transformada por electroporación y varios genes envueltos en el metabolismo del nitrógeno fueron silenciados por sus homólogos en el método de recombinación (Kilian y col 2011).

Esta tecnología avanzará rápidamente, conforme avance la investigación en el campo de la genómica funcional y la aplicación en biotecnología, particularmente en la producción de bioenergía a partir de algas marinas. Como sea, la aplicación de la tecnología de electroporación es, al menos, obligatoria en algas cafés por el poco desarrollo de tecnologías de preparación y regeneración (Pan y col 2011).

c) Biobalística o bombardeo de partículas

La transferencia directa de genes por el método físico de bombardeo de micropartículas, ha demostrado ser el método más eficiente y altamente reproducible para la introducción de ADN exógeno en las células de algas. Este método ha sido empleado exitosamente para la transformación de muchas microalgas en sistemas de expresión nuclear y de cloroplastos. No es sorprendente que la transformación por biobalística permanezca como la herramienta más usada para estudios transgénicos

de macroalgas marinas sin tomar en cuenta sus paredes celular y su ciclo de vida (Qin 2012).

El método de transformación por biobalística tiene las siguientes ventajas:

1) El ADN exógeno puede introducirse en diversas células y tejidos, incluyendo plantas, animales, microbios, e incluso el polen y otros aceptores peculiares. Es el único método eficaz que puede transformar repetidamente cloroplastos, mitocondrias y otros organelos.

2) Diversos vectores se pueden aplicar en la transformación, debido a la limitada comprensión de la estructura y función de las sustancias genéticas de la mayoría de las algas, a veces es difícil construir vectores endógenos de algas útiles. Los vectores de *E. coli* son usualmente útiles en transformaciones por biobalísticas de algas. Teóricamente hablando, el tamaño del plásmido de una *E. coli* es adecuado para la manipulación por biobalística para evitar la ruptura y la pérdida del plásmido. Además, los diversos vectores desarrollados de plantas superiores proporcionan un repertorio para el futuro diseño de la manipulación transgénica (Qin 2012).

3) Aunque el bombardeo de partículas requiere un alto costo y equipo especializado, el procedimiento de manipulación de la transformación biobalística es controlable. Casi la totalidad de los parámetros físicos y químicos: presión de ruptura, concentración de ADN, distancia recorrida por la partícula y grado de vacío, en la pistola de genes, pueden ser ajustados a diferentes materiales de algas y aceptores (Qin 2012).

La cianobacteria marina *Synechococcus* sp. NKBG15041c se transformó con éxito utilizando bombardeo con partículas bacterianas magnéticas (PBM) purificadas a partir de una bacteria magnética conocida como *Magnetospirillum* sp. AMB-1. Las partículas fueron cubiertas con una delgada capa fosfolípida y unían cantidades más grandes de ADN que las partículas de oro o tungsteno (Matsunaga y col 1991).

Hasta la fecha, las herramientas disponibles para la ingeniería genética de las diatomeas marinas permanecen escasas. La transformación por biobalística es la única herramienta eficaz para la manipulación genética de diatomeas marinas. Un sistema de transformación nuclear estable fue desarrollado para varias diatomeas utilizando el bombardeo de partículas en la década de 1990 (Dunahay y col 1995; Apt y col 1996; Falciatore y col 1999).

Un sistema de transformación ha sido establecido en el género *Porphyra* (Kuang y col 1998; Zhang y col 2010) cuyo cultivo provee anualmente aproximadamente 1000 millones de dólares, y produce algas maduras para la industria de alimentos, cosméticos, y otros productos de alto valor (Pulz y Gross 2004).

d) Agitación con esferas de cristal

La agitación con esferas de cristal ha sido usada para introducir eficientemente ADN foráneo en las microalgas. Es uno de los primeros métodos usados para la transformación de *C. reinhardtii* en muchos laboratorios por su simplicidad y reproducibilidad (Kindle 1990).

Actualmente se ha encontrado que la adición de un agente de fusión de la membrana, el polietilenglicol (PEG), durante la agitación aumenta de 5 a 12 el número de transformantes producidos (Kindle 1990).

Las ventajas de las esferas de cristal son su simplicidad, bajos costos y no requiere equipo especializado comparado con la biobalística. El sistema de transformación genética para *Dunaliella salina*, la cual carece de una pared celular, se ha sido establecido exitosamente. El método de las esferas de cristal es más eficiente y repetible, controlado de una manera más fácil y es menos destructivo físicamente para las células, en comparación con la electroporación y el bombardeo de partículas en la transformación de *D. salina*, cuando estos fueron comparados al mismo tiempo (Feng y col 2009). La desventaja principal de este método, es la incapacidad para transferir ADN dentro de las células con paredes celulares gruesas (Coll 2006); las cuales deben ser pre-tratadas para digerir las paredes con una enzima y producir protoplastos; posteriormente, estas pueden ser mezcladas y agitadas con las esferas de cristal y el agente de fusión de membranas PEG, sin embargo, en algunas algas, la viabilidad de las células disminuye cuando las paredes celulares son removidas y el mejoramiento y la diferenciación de callos tiende a complicar el aislamiento de transformantes (Polnefuller y Gibor 1984).

e) Microinyección

Es un método físico directo capaz de penetrar las paredes celulares intactas, el método de microinyección no requiere necesariamente un sistema de regeneración de protoplastos. Adicionalmente, la microinyección permite la introducción de ADN (u

otras sustancias) bajo control microscópico en objetivos específicos (Schnorf y col 1991).

Teóricamente hablando, las células receptoras de microinyección podrían ser definidas como cualquier compartimento de una célula simple o como células sin una estructura multicelular, de plantas, animales, u otros microorganismos. Debido a la dificultad de inmovilización de células de microalgas, la complicada tecnología de manipulación tecnológica, y el bajo número de células microinyectadas en un tiempo dado, el método de microinyección es raramente usado en la transformación de algas marinas (Neuhaus y Spangenberg 1990).

Un campo amplio y estable en la transformación nuclear fue alcanzado en el alga verde marina unicelular *Acetabularia mediterranea* SV40 y pSV2neo, mediante la microinyección de ADN dentro del núcleo aislado de las células de algas y luego la implantación del núcleo inyectado dentro de los fragmentos de células sin núcleo de la misma especie (Neuhaus y col 1986). Este método establecido fue exitosamente usado para enfrentar el problema del transporte nuclear de proteínas algales. Pese a lo complicado y delicado del procedimiento, la microinyección, podría ser considerada como un método de transformación altamente eficiente y de bajo costo para algas marinas (Pfeiffer y col 2009).

f) *Agrobacterium tumefaciens*

El primer método diseñado para la transformación de células vegetales, que ha resultado el más exitoso, y por consecuencia el más usado, surgió del estudio detallado del mecanismo de infección de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium*

tumefaciens. Desde entonces, los esfuerzos se enfocaron en conocer los mecanismos de transferencia de ADN con la idea de adecuar este sistema para transferir genes. El empleo del sistema de transformación mediante *A. tumefaciens* en microalgas ofrece destacables ventajas frente a otras técnicas empleadas hasta el momento. En primer lugar no requiere generar protoplastos o mutantes sin pared, por tanto mejora la viabilidad de las células. Por otro lado, garantiza la integración del material genético en el genoma nuclear, facilitando su expresión estable en las células (Ikarán 2011).

Aunque diversas especies de microalgas han sido transformadas genéticamente mediante *Agrobacterium*; *Chlamydomonas reinhardtii* representa la primera especie que ha sido modificada genéticamente por este patógeno y ha servido como sistema modelo para el entendimiento de muchos procesos biológicos en eucariotas a nivel molecular (Grossman 2000), de hecho, actualmente es considerada como una plataforma para la producción de proteínas terapéuticas humanas (Beth 2010). *Dunaliella bardawil* es otra especie marina que ha sido transformada mediante la integración de transgénos con el fin de desarrollar un sistema eficiente para la producción de proteínas recombinantes y compuestos con valor agregado (Anila 2011). Con el mismo objetivo, el establecimiento de un sistema eficiente para la producción de proteínas heterólogas y metabolitos secundarios de interés, *Agrobacterium* ha mediado la transformación de la microalga marina *Schizochytrium* (Cheng 2012), y de *Chlorella ellipsoidea* para proveer un sistema de expresión foráneo de proteínas para su activación biológica (Lohuis y Miller 1998). Un fin similar presenta la transformación genética de los dinoflagelados *Amphidinium* sp y *Symbiodinium*

microadriaticum, ya que estos tienen la capacidad de informar sobre mecanismos de regulación genética mediante el remplazo de timina por 5-hidroximetiluracil.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria, gram negativa que induce la formación de tumores, denominados “agalla de la corona”, generalmente en la unión del tallo con la raíz, en numerosas dicotiledóneas y en muy pocas monocotiledóneas y gimnospermas (De Cleene y De Ley 1976).

A. tumefaciens y sus especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. vitis*, son bacterias patógenas reconocidas de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético, el ADN de su plásmido Ti, conocido como ADN-T, dentro del genoma hospedero donde el ADN se integra al azar en los cromosomas nucleares (Tzfira y col 2002).

El proceso de transformación comienza cuando *Agrobacterium* percibe señales químicas producidas por las células dañadas de la planta, éstas pueden ser azúcares neutros y ácidos, hidrocarburos aromáticos monocíclicos como acetosiringona, α -hidroxiacetosiringina y vainillina; y monosacáridos neutros o ácidos como la glucosa y el ácido glucorónico (Hess y col 1991).

La región *vir* que está constituida por distintos genes de virulencia (hasta 25 descritos); dos de ellos (*virA* y *virG*), de expresión constitutiva y necesaria para la activación transcripcional de otros genes como *virB*, *virC*, *virD* y *virE* (Bolton y col 1986; Stachel y col 1986).

Los plásmidos Ti (Fig 6), son plásmidos de ADN circular de doble cadena y de gran tamaño (200-800 Kpb). En un plásmido de este tipo se distingue:

- Un origen de replicación que le permite mantenerse de forma estable en la bacteria.
- La región de transferencia (ADN-T) delimitada por dos bordes (de 24-25 pares de bases) que se conocen como borde derecho (RB; right border) y borde izquierdo (LB; left border) que están muy conservados entre los distintos plásmidos Ti (Van Haaren y col 1998).

En esta región se localizan un grupo de genes (*iaaM*, *iaaH* e *ipt*) que codifican enzimas para la síntesis de auxinas y citoquininas (hormonas vegetales implicadas en la división celular y otros procesos del desarrollo vegetal) y algún gen de síntesis de opinas, como el gen *ocs*, que codifica la octopina-sintasa, el gen *nos* que codifica la nopalina-sintasa, y el gen *acs* que codifica la agropina-sintasa (VanHaaren y col 1998).

- Genes que codifican enzimas para el catabolismo de las opinas que se sintetizan y que le sirven de alimento a la bacteria (VanHaaren y col 1998).

El mecanismo de transferencia del ADN-T a la célula vegetal está determinado por la interacción molecular entre la bacteria y la especie vegetal, especialmente por el intercambio de señales de tipo proteico. Aunque el proceso de transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens* ha sido ampliamente estudiado, aún no han sido descifrados completamente los mecanismos moleculares por los cuales éste es transferido.

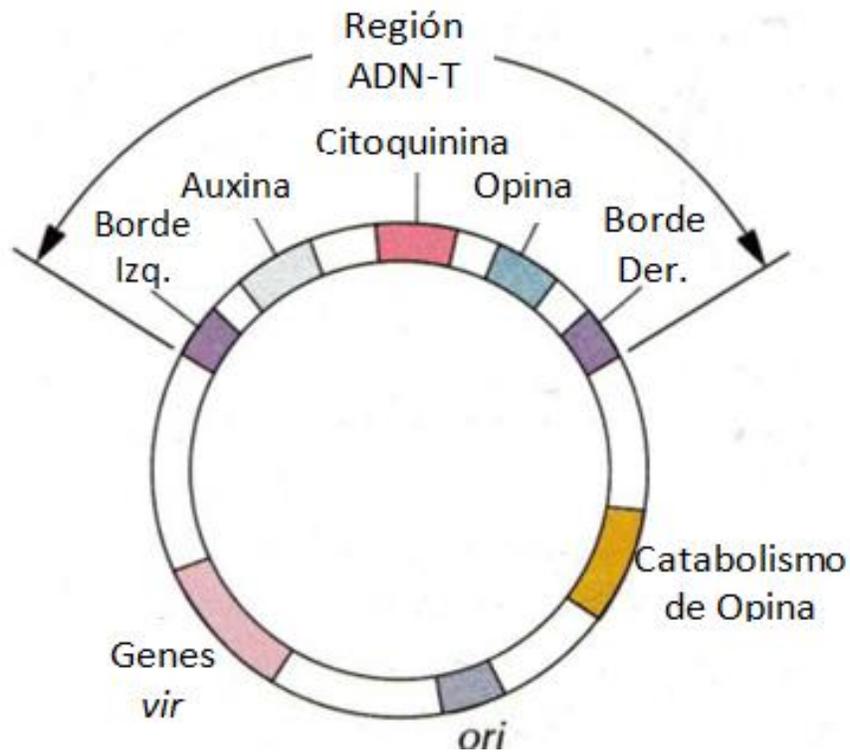


Figura 6. Plásmido Ti. El ADN-T está definido por los bordes derecho e izquierdo e incluye los genes para la biosíntesis de auxina, citoquinina y opina; estos genes son transcritos y traducidos sólo en las células de la planta. Fuera de la región del ADN-T, hay un clúster de genes *vir*, un gen que codifica para enzima(s) del catabolismo de opinas, y un origen de replicación (*ori*) que permite que el plásmido sea mantenido de forma estable en *A. tumefaciens*. Tomada de Tzfira y col (2002).

Sin embargo se pueden mencionar algunos eventos importantes para que se lleve a cabo la interacción, como son: reconocimiento y adherencia, identificación de señales del hospedero, activación de genes *vir*, generación del ADN-T, exportación del ADN-T hacia el huésped, importación del ADN-T dentro del núcleo de la célula huésped e integración del ADN-T dentro del genoma del hospedero (Zhu y col 2003).

2) Genes reporteros

La proteína expresada por un gen reportero es sensible y fácil de detectar; por consiguiente este puede ser usado para demarcar la frecuencia de transformación, la eficiencia de la expresión, y la estabilidad de los genes externos incorporados, así como para determinar la ubicación de la proteína recombinante en las células transformadas. Los genes reporteros ampliamente utilizados en transformación de algas marinas son *gus* y *lacZ*. El primero codifica para la enzima β -glucuronidasa, y es típicamente seleccionado como un reportero efectivo por la expresión temporal y estable en algas marinas (Qin 2012). En plantas superiores y algas marinas, se ha detectado que existen antecedentes débiles del gen *gus* y, en consecuencia, el control negativo debe ser fijado para eliminar dicha señal del antecedente.

El gen *lacZ* existe en muchas bacterias y es similar al gen *gus* porque es más efectivo en el proceso conductor antibacteriano y requiere tanto un control negativo, como un control en blanco para eliminar los antecedentes. El ensayo LacZ ha sido aplicado en algunas algas marinas, como el alga roja *P. haitanensis* (Zhang y col 2010) y alga café *L. japonica* (Qin y col 1998; Jiang y col 2003). El gen *Luc* codifica para luciferasa es otro gen reportero aplicado usualmente en microalgas de agua dulce y diatomeas

marinas *P. tricornutum* (Falciatore y col 1999). La proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) de la medusa *Aequorea victoria* ha sido usada como reportero universal y en el análisis de localización en varias algas marinas, sin embargo, debido a que el alga típicamente tiene pigmentos fotosintéticos endógenos y otras sustancias fluorescentes, la expresión de GFP requiere un fuerte promotor para prevenir la interferencia de la señal interior de fluorescencia (Zaslavskaja y col 2000; Poulsen y col 2006; Hirakawa y col 2008; Takahashi y col 2010; Wang y col 2010; Miyagawa-Yamaguchi y col 2011, Watanabe y col 2011).

3) Genes marcadores de selección

Los protocolos de transformación requieren marcadores de selección efectivos para discriminar exitosamente a los transformantes de las células transformadas. La mayoría de los marcadores de selección constituyen dos tipos: un tipo incluye genes con resistencia a antibióticos o a herbicidas, estos genes de selección son comúnmente usados para la selección de algas marinas transformadas. En contraste a plantas superiores, las algas marinas son insensibles a neomicina y a kanamicina pero son típicamente sensibles a cloromicetina, higromicina, y al herbicida glufosinado. El otro tipo de marcadores de selección es la complementación de mutantes metabólicos, este método es usado particularmente para la transformación de cloroplastos. Ejemplos de marcadores innovadores que han sido desarrollados son la fitoeno desaturasa (PDS) (Steinbrenner y Sandmann 2006) y gen *Arg9* (Remacle y col 2009). Existe la preocupación por la bioseguridad del antibiótico y los genes de resistencia a herbicidas, cuando se liberan las plantas transgénicas al medio ambiente.

Por lo que se está buscando desarrollar alternativas de sistemas marcadores y estandarizar los sistemas de selección de marcadores libres (Manimaran y col 2011).

IV JUSTIFICACIÓN

Debido al gran potencial que representa el empleo de las microalgas para la producción de proteínas recombinantes y otros compuestos de interés nutricional, nutracéutico y farmacológico, el establecimiento de un sistema de transformación genética de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, podría permitir el desarrollo de una plataforma para la utilización de éstas como reactores biológicos.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de transformación genética de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elaborar una curva de crecimiento y viabilidad celular de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.
2. Evaluar el efecto de la concentración de higromicina sobre el crecimiento de la microalga en estudio.
3. Evaluar el efecto de la concentración de *A. tumefaciens*, el tiempo de co-cultivo y el método de infección en la expresión transitoria del gen *gus* en *Dunaliella tertiolecta*.
4. Determinar el Índice de Eficiencia de Transformación genética de *D. tertiolecta*.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Material celular

Se utilizó la cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, obtenida de la colección de microalgas del departamento de acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Para la transformación se empleó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2 Vectores de transferencia genética

Para la transformación, se utilizó el vector de transformación pCAMBIA 1304 (Fig 7), el cual contiene el gen *gus* como reportero en la transformación; además, cuenta con genes de resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina para la selección bacteriana y en células de microalgas transformadas, respectivamente (Wilson y col 1999).

3 Medios de cultivo

El cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, así como las curvas de crecimiento, se realizaron en medio F/2, el cual es un medio de agua de mar común y ampliamente utilizado para el cultivo de algas marinas, se compone de vitaminas, fosfatos, nitratos y metales traza. La concentración de la formulación original, denominada "Medio F" (Guillard y Ryther 1962), se redujo a la mitad (Anexo 1).

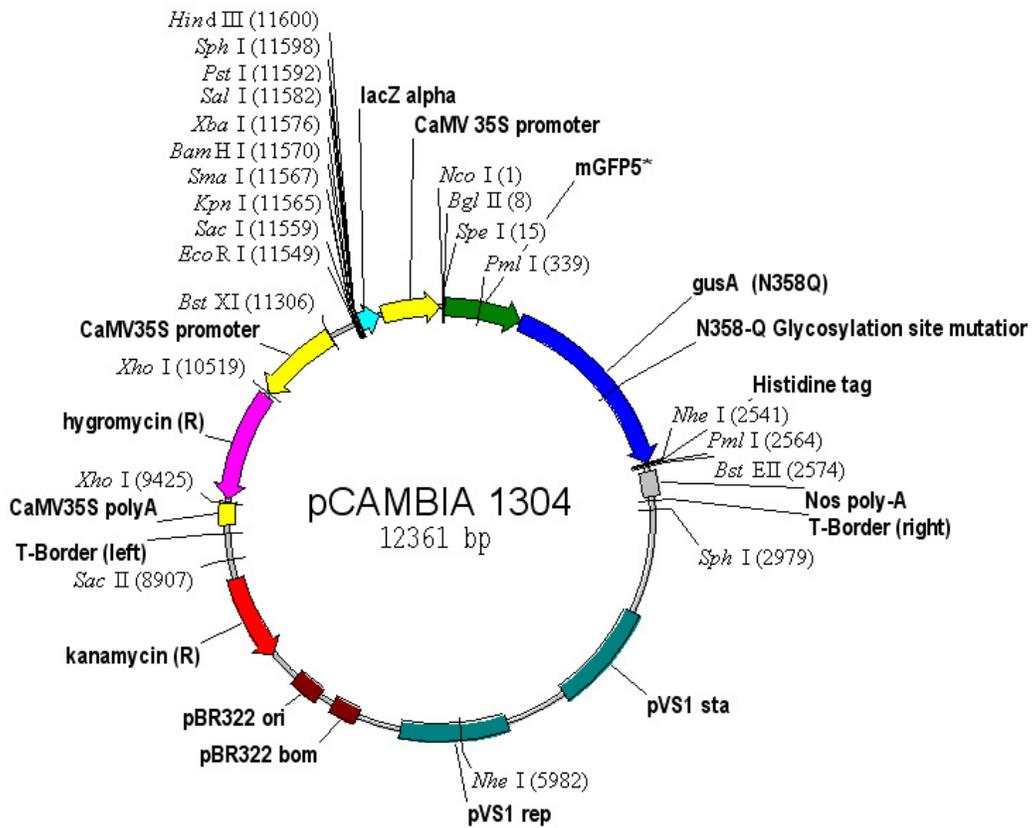


Figura 7. Mapa genético del vector de transformación genética pCAMBIA1304.

Tomada de Wilson y col (1999).

Para la determinación de la dosis letal mínima de higromicina y la transformación genética de las células de microalgas, se utilizó el medio TAP (tris, acetato y fosfato) (Andersen 2005). El medio TAP es un medio rico en fosfatos que favorece el crecimiento de las microalgas, pues permite un mayor crecimiento celular (Anexo 2).

Los medios de cultivo se esterilizaron por autoclave a 121°C, 1.2 kg/cm² por 20 minutos. Los antibióticos se esterilizaron por filtración, y se agregaron a los medios después de pasar por el autoclave y enfriamiento de los mismos (Mayo y col 2006).

B MÉTODOS

1 Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Guillard y Ryther (1962). Se utilizó la técnica de transferencias sucesivas hasta alcanzar un volumen de 300 mL de cultivo. Se partió de una cepa almacenada en un tubo de ensayo con aproximadamente 10 mL para inocular un matraz con 50 mL de solución de cultivo, finalmente dicho volumen se transfirió a un matraz que contenía 300 mL de cultivo.

Una vez alcanzado el volumen de 300 mL, se mantuvo el matraz a una temperatura constante de 24 °C. Se le aplicó luz al cultivo con la finalidad de acelerar el crecimiento celular, se procuró que todas las células se encontraran expuestas a la misma cantidad de luz, la cual fue emitida durante las 24 h del día con una intensidad de 6000-6500 luxes, que es equivalente a un flujo de fotones de aproximadamente 120-130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se realizaron conteos celulares para conocer la densidad de la biomasa empleando un microscopio compuesto equipado con hemocitómetro o cámara de

Neubauer de 0.1 mm de profundidad. Para ello, se tomaron muestras cada 24 h; de esta forma, se verificó constantemente el crecimiento celular del cultivo; además, para evitar cambios en el metabolismo de las microalgas, se suministró aireación manualmente, agitando el matraz dos veces al día.

2 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la microalga *D. tertiolecta*, se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con medio F/2, que contenían 300 mL de cultivo de microalgas, utilizando condiciones de operación en un ambiente con luz y agitación, a temperatura controlada de 24 °C (Voltolina y col 1989).

Para evaluar el crecimiento celular se utilizó como método analítico el conteo celular con hemocitómetro. En base a este valor, se pueden calcular los parámetros de la tasa de crecimiento específico y el tiempo de duplicación, que describen la eficiencia del crecimiento celular (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006). Para medir la viabilidad celular se utilizó la prueba de determinación del número de células viables por colorante de exclusión utilizando el colorante azul de tripán al 0.4% (Richardson y Fedoroff 2001).

a Medición por conteo celular en hemocitómetro

El conteo se realizó por triplicado, se utilizó un microscopio óptico (OLYMPUS CX21) y un hemocitómetro o cámara de recuento celular Neubauer, la cual está dividida en nueve cuadros. Se contaron las células presentes en los cuatro cuadros ubicados en las esquinas de la cámara, el número obtenido se dividió entre cuatro y

se multiplicó por 10000; si la muestra fue diluida, también se multiplicó por el factor de dilución (Fig 8); el valor resultante fue el número de células por mililitro (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota 2006).

1) Tasa de crecimiento celular específico (μ)

La tasa de crecimiento específica (μ) se define como la tasa de aumento de la biomasa de una población celular por unidad de concentración de biomasa. Se calcula en cultivos discontinuos, ya que durante un período definido de tiempo (entre las fases de latencia y la estacionaria), el aumento de la población celular se ajusta a una ecuación lineal. Para obtener μ , se tomaron los datos obtenidos de la cinética de crecimiento y se graficó el logaritmo natural del valor obtenido de la biomasa celular contra el tiempo, se eligió el rango de datos que se ajustaron al comportamiento lineal y se despejó μ de la ecuación obtenida del gráfico, la cual corresponde a la pendiente de la ecuación de la gráfica:

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde X_0 es la biomasa inicial, X es la biomasa al tiempo t , y μ es la tasa de crecimiento específico (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

2) Tiempo de duplicación (dt)

El tiempo de duplicación (dt) se define como el tiempo requerido para que la concentración de la biomasa de una población de células se duplique, este parámetro se calculó a partir de los valores de μ obtenidos, empleando la siguiente ecuación:

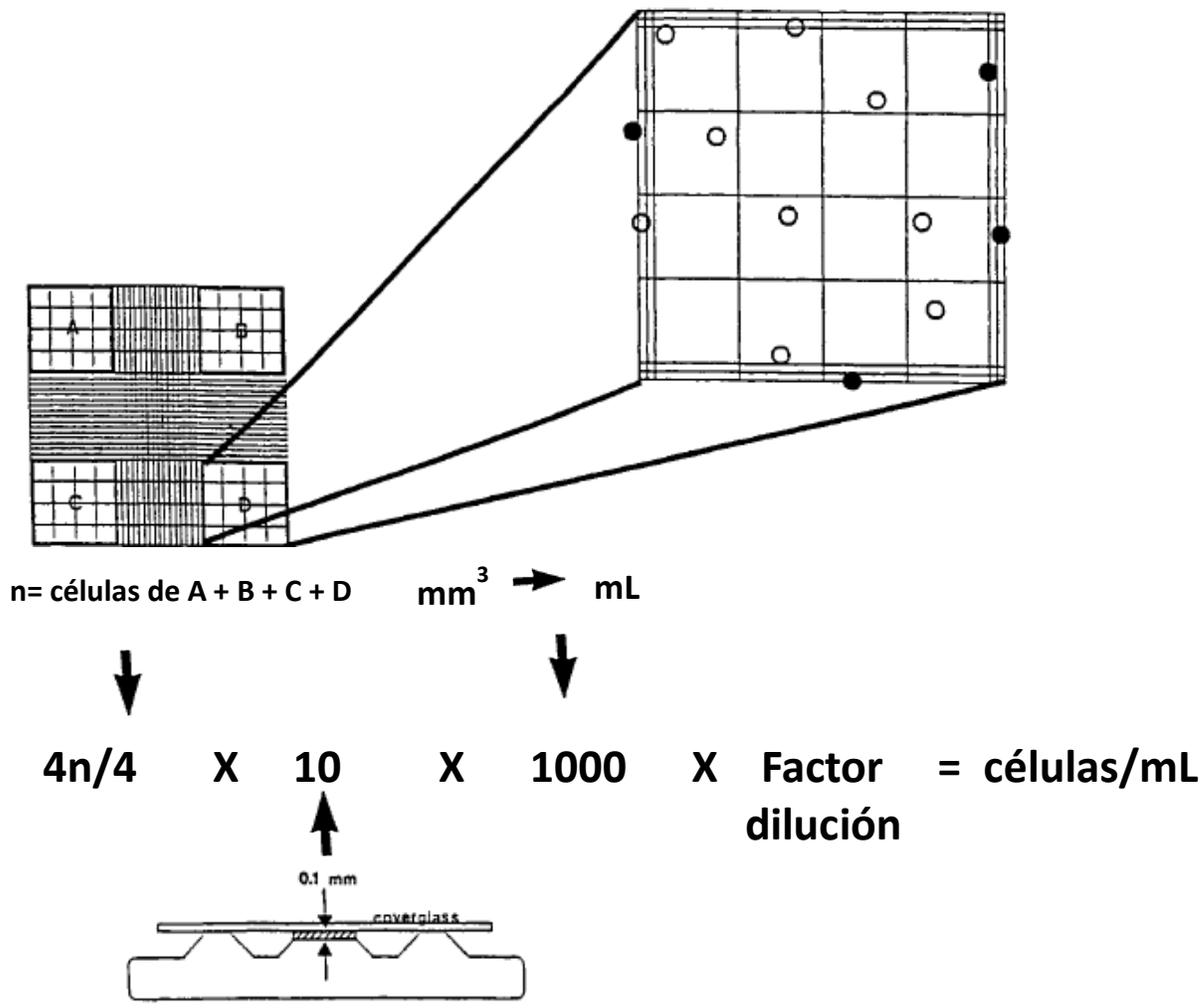


Figura 8. Cálculo del número celular utilizando el hemocitómetro. Tanto para el conteo celular como para la determinación de viabilidad por colorante de exclusión, se cuentan todas las células dentro del área limitada por las líneas triples. Adaptada de Richardson y Fedorof (2001).

$$dt = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específico (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

b Determinación de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular del cultivo, se utilizó la prueba de determinación del número de células viables por colorante de exclusión (Richardson y Fedoroff 2001), donde se empleó el colorante azul de tripán al 0.4%, se agregaron 0.2 mL de colorante a 0.8 mL del cultivo celular, obteniendo una dilución de 8:10; la suspensión se homogenizó y se procedió al conteo, para lo cual se hizo uso de la metodología de Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2006); por medio de una cámara de Neubauer, se contabilizaron el número de células totales y las que presentaron coloración azul (no viables); por diferencia se obtuvo el número de células viables.

El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\# \text{ cel. viables}}{\# \text{ cel. totales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

3 Determinación de la dosis letal mínima de higromicina

Se utilizó el medio de cultivo sólido TAP (Anexo 2), con diferentes dosis de higromicina: 25, 50, 75, 80, 90, 100 y 110 mg/L. Se empleó también cultivo celular de microalgas con una viabilidad celular > 85 %, se plaqueó un volumen que contenía 1.5×10^6 cel/mL en las cajas con medio sólido selectivo, éstas se colocaron en condiciones de crecimiento a 25 ± 1 °C en un ambiente con luz por aproximadamente 5 semanas.

El experimento se realizó por duplicado y la evaluación del crecimiento celular se determinó de manera visual. La mínima concentración de higromicina en la cual no se observó crecimiento celular fue la dosis letal mínima correspondiente (Gomez-Kosky y col 2010).

4 Transformación genética del cultivo de microalgas

Para el establecimiento del sistema de transformación de *D. tertiolecta* se utilizó el vector de transferencia pCAMBIA 1304, con el fin de aprovechar el monitoreo rápido mediante la expresión transitoria del gen reportero *gus*.

Para la transformación genética de las células de microalgas se utilizó una adaptación de los protocolos para la transformación de cultivos de microalgas con *Agrobacterium tumefaciens* reportados por Kumar y col (2004), y Pratheesh y col (2014). Para ello, aproximadamente 1.5×10^6 células de microalgas fueron plaqueadas en medio sólido TAP e incubadas a la luz durante una semana para permitir el crecimiento celular (periodo de pre-cultivo), las cuales posteriormente fueron transformadas empleando el método de infección en sólido (Kumar y col 2004). Mientras que aproximadamente 1.5×10^6 células de microalgas fueron tomadas directamente del cultivo, se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min y se recuperó la pastilla que contenía las células de microalgas, la cual fue empleada para llevar a cabo la transformación con el método de infección en líquido (Pratheesh y col 2014).

Se utilizaron estrías frescas (48 h) de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales se resuspendieron en medio TAP hasta alcanzar las densidades ópticas (DO) de 0.5, 1.0 y 1.5 a 600 nm. Posteriormente, se llevó a cabo la inducción de los genes *vir* con

Asetosiringona (AS) 100 μM a 28 °C durante 4 h. La transformación fue hecha por co-cultivo de las microalgas con *A. tumefaciens*, adicionando 200 μL de la suspensión bacteriana inducida a las diferentes DO's sobre la delgada capa de microalgas crecida anteriormente durante una semana.

El co-cultivo se incubó a 25 ± 1 °C por 24, 48 y 72 h. Pasados estos tiempos, las células fueron recolectadas y lavadas tres veces con medio líquido TAP adicionado con 100 mg L^{-1} de timentina mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 min, para la eliminación de la bacteria.

5 Análisis bioquímico de células transformadas

a Expresión transitoria del gen *gus*

El ensayo histológico de GUS se realizó una vez que se recolectaron y lavaron las células del co-cultivo, posteriormente se resuspendieron en solución X-GLUC (GUSS-1K, Sigma, EUA) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las células se destiñeron con etanol al 70%, esto, para evitar la interferencia de la clorofila que naturalmente proporciona su pigmentación verde natural. Las muestras se analizaron en un microscopio estereoscópico Motic DM143 (Motic, Richmond, British Columbia, Canadá). Como control negativo se utilizó cultivo celular no transformado desteñado con etanol al 70%.

b Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de las células transformadas, se utilizó la prueba de determinación del número de células viables por colorante de exclusión (Richardson y

Fedoroff 2001), donde se empleó el colorante azul de tripán al 0.4%, se agregaron 0.2 mL de colorante a 0.8 mL del cultivo celular, obteniendo una dilución de 8:10; la suspensión se homogenizó y se procedió al conteo, para lo cual se empleó la metodología de Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2006); por medio de una cámara de Neubauer, se contabilizaron el número de células totales y las que presentaron coloración azul (no viables); por diferencia se obtuvo el número de células viables. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo con la Ec. 3.

6 Determinación del Índice de Eficiencia de Transformación (IET)

Una vez que se realizó el análisis histoquímico de la expresión transitoria del gen *gus* y la determinación de la viabilidad celular a las células de *D. tertiolecta* transformadas, ambas variables tomaron una ponderación de acuerdo a su importancia en el proceso de transformación de la microalga en estudio, en este sentido, se les asignó el 50 % y 50 % de importancia a cada una. Debido a que se requiere una célula competente para que esta siga su ciclo de vida de manera natural, y se requiere también, la competencia de la célula a ser transformada. El IET se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{IET} = \% \text{ Eficiencia de transformación} * 0.5 + \% \text{ Viabilidad celular} * 0.5 \quad \text{Ec. 4}$$

7 Diseño de experimentos

Los resultados del Índice de Eficiencia de Transformación fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de 3 factores (densidad óptica de *Agrobacterium* (DO_{agro}), tiempo de co-cultivo ($T_{co-cult}$) y método de infección); la comparación de medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Fisher con un nivel de significancia del 95 % (LSD, $p \leq 0.05$).

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO CELULAR DE LA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*

1 Establecimiento de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento del cultivo de *Dunaliella tertiolecta*, se estableció mediante conteos celulares con cámara de Neubauer y microscopio óptico, según la metodología anteriormente descrita. La densidad celular inicial del cultivo fue de 3×10^5 cel/mL; en la figura 9 se muestra el comportamiento del crecimiento de *D. tertiolecta*, en la cual, se pudo observar que no se presentó una fase de latencia, esto podría deberse a que el cultivo fue crecido mediante la técnica de transferencias sucesivas y, al momento de iniciarlo, éste ya contaba con un número de células en constante reproducción; el comportamiento principal observado fue exponencial, hasta alcanzar su máxima densidad celular al día 14 con aproximadamente 2.5×10^6 cel/mL. Aguilar (1995) señaló el mismo comportamiento en un cultivo de *Dunaliella salina*, alcanzando una densidad celular máxima de 3.5×10^6 cel/mL, al mismo día; mientras que Calderón (2003), en un cultivo de *D. tertiolecta*, logró alcanzarla al día 10, obteniendo aproximadamente 3×10^6 cel/mL; Mishra (2008), por su parte, reportó una máxima densidad celular al día 13 en un cultivo de *Dunaliella* sp. Por lo anterior, podría aseverarse que la máxima densidad celular en un cultivo de especies del género *Dunaliella*, puede alcanzarse en un intervalo de 10 a 14 días; y dicho comportamiento dependerá principalmente de las condiciones del cultivo en el que éstas sean crecidas.

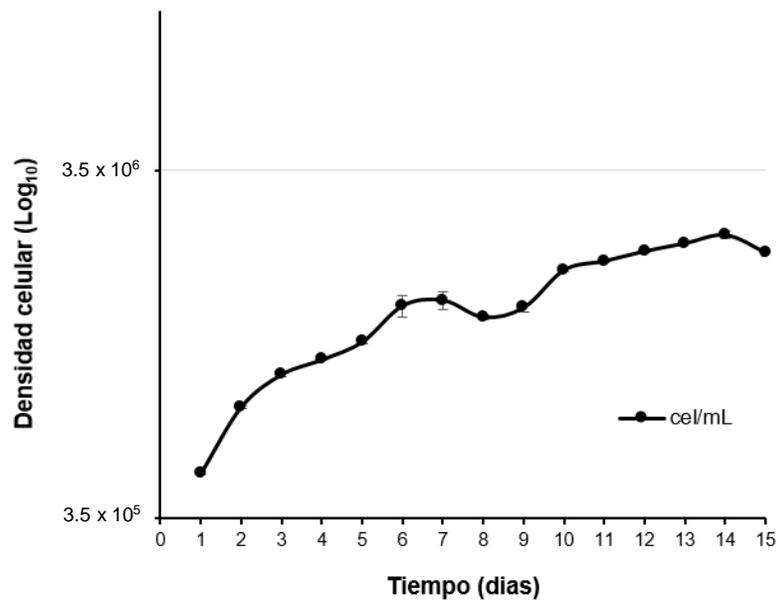


Figura 9. Curva de crecimiento del cultivo de *Dunaliella tertiolecta*. Cada punto corresponde al promedio de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

Algunos autores han señalado que una densidad celular de 1×10^6 cel/mL, corresponde a un número considerable de células suficientes para someterse al proceso de transformación genética mediado por *Agrobacterium* (Mayfield 2003; Anila 2011).

a Tasa de crecimiento celular específico (μ) y tiempo de duplicación (dt)

La tasa de crecimiento específico (μ) se refiere a la inclinación en una parte específica de la curva de crecimiento, y se define como la tasa de aumento en la biomasa de una población de células por unidad de concentración de biomasa. El μ obtenido en el presente estudio, a partir del monitoreo de la densidad celular del cultivo de *D. tertiolecta* fue de 0.17 d^{-1} ; mientras que el tiempo de duplicación (dt) obtenido fue de 4.1 d, éste se define como el tiempo requerido para que la concentración de biomasa de una población celular se duplique. Ambos valores fueron superiores a los presentados por Arun y Singh (2013), quienes reportaron un $\mu = 0.13 \text{ d}^{-1}$ y un $dt = 5.8$ d para la misma microalga. Lo anterior indica que las condiciones empleadas para el cultivo de la microalga *D. tertiolecta* en la presente investigación, resultan más favorables que las reportadas por Arun y Singh (2013) en su estudio.

b Viabilidad celular del cultivo

La viabilidad celular puede ser determinada a través de diversos métodos, los cuales dependerán del tipo de célula o tejido analizado; algunos de los procedimientos más comunes se basan en métodos colorimétricos, o bien, en análisis microscópicos; éstos últimos, requieren el uso de colorantes que son selectivamente excluidos o incorporados por las células vivas, mientras que los métodos colorimétricos, se basan

en el desarrollo de color en el medio de crecimiento, después de la reacción de metabolitos celulares con agentes químicos de la solución del ensayo (Capasso 2003).

Los métodos por colorante de exclusión son frecuentemente utilizados para cuantificar el número de células muertas en un cultivo; esta técnica se basa en la suposición de que ciertos colorantes, tales como, azul de metileno, azul de tripán, azul Nilo y eosina, son capaces de entrar en las células cuya permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, ha sido perdida o gravemente comprometida (Tolnai 1972; Bonara y Mares 1982).

En la figura 10A se observa que a medida que transcurre el tiempo, la viabilidad celular del cultivo disminuye, pues conforme el número celular aumenta de manera exponencial, se genera una acumulación de productos extracelulares tóxicos para la célula, tales como aminoácidos, proteasas, fragmentos celulares o metabolitos secundarios, que afectan el crecimiento y multiplicación celular en el cultivo (Yesil-Celiktas y col 2010). La mayor viabilidad del cultivo se alcanzó el día 4, presentando un valor del 86 % de células viables. A partir del día 5 se observó una disminución en la viabilidad, y en los días posteriores a ese, los valores se mantuvieron constantes con valores que oscilaron entre el 50 – 70 % hasta llegar al día 12 del cultivo, donde se pudo apreciar una disminución considerable hasta un nivel del 52 %.

Este comportamiento es típico en cultivos celulares, donde al llegar a los días finales de cultivo, la densidad celular disminuye dramáticamente, existiendo una mayor competencia de las células viables aún presentes, por los nutrientes restantes del medio, lo que genera una mayor muerte celular (Steward y col 1999).

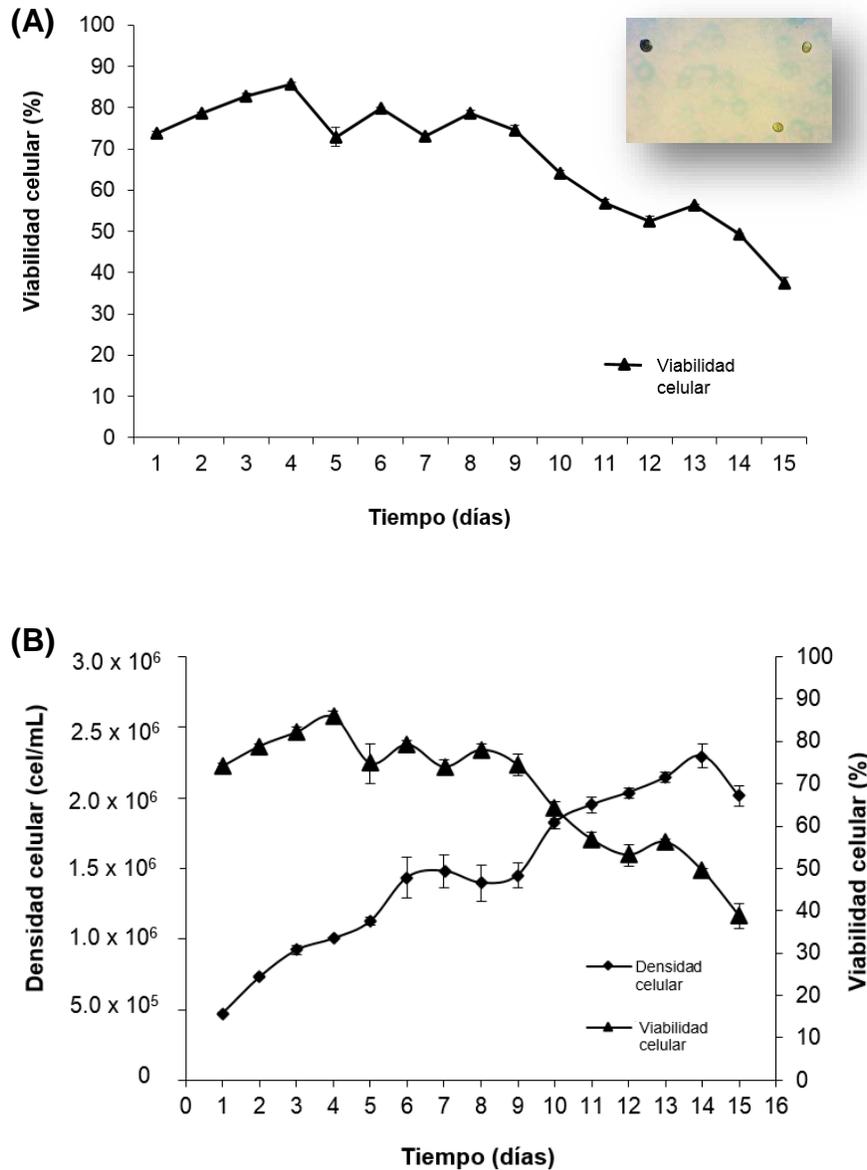


Figura 10. Determinación de la viabilidad celular del cultivo de *Dunaliella tertiolecta* mediante el método por colorante de exclusión con azul de tripán. (A) Análisis del comportamiento de la viabilidad celular; (B) análisis de la viabilidad en conjunto con la densidad celular del cultivo. Cada punto corresponde al promedio de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

Con base en los porcentajes de viabilidad observados, en conjunto con la densidad celular (Fig 10B) y tomando en consideración lo reportado en la literatura, se optó por seleccionar el día 4 del cultivo, donde éste presenta aproximadamente 1×10^6 cel/mL y un 86 % de viabilidad, para la determinación de la dosis letal mínima de higromicina y el establecimiento del sistema de transformación genética, considerándose que se requiere un número adecuado de células viables para ser sometidas al proceso de transformación.

2 Dosis letal mínima de Higromicina

Aproximadamente 1.5×10^6 cel/mL fueron plaqueadas en medio sólido TAP a las diferentes concentraciones de higromicina descritas en la metodología. El crecimiento celular se observó después de 5 semanas. En la figura 11 se observa que el crecimiento de *D. tertiolecta* se inhibió a la concentración de 110 mg/L de higromicina; por ello, dicha concentración fue utilizada posteriormente para la selección de células transformadas después del co-cultivo con *Agrobacterium*, evitando el crecimiento de las células de *D. tertiolecta* de tipo silvestre. Este valor fue muy similar al reportado por Anila (2011) para la microalga *Dunaliella bardawil* (100 mg/L), sin embargo, se encuentra muy por encima de lo reportado para las especies *Chlamydomonas reinhardtii* (10 mg/L), *Haematococcus pluvialis* (10 mg/L) y *Chlorella vulgaris* (20 mg/L) (Kumar 2004; Kathiresan 2009; Cha 2011); cabe mencionar que estas últimas especies habitan en agua dulce, mientras que las especies de *Dunaliella* son microalgas de agua salada; además, se ha demostrado que la salinidad del medio puede interferir en la actividad antibiótica de la higromicina, ocasionando la inhibición

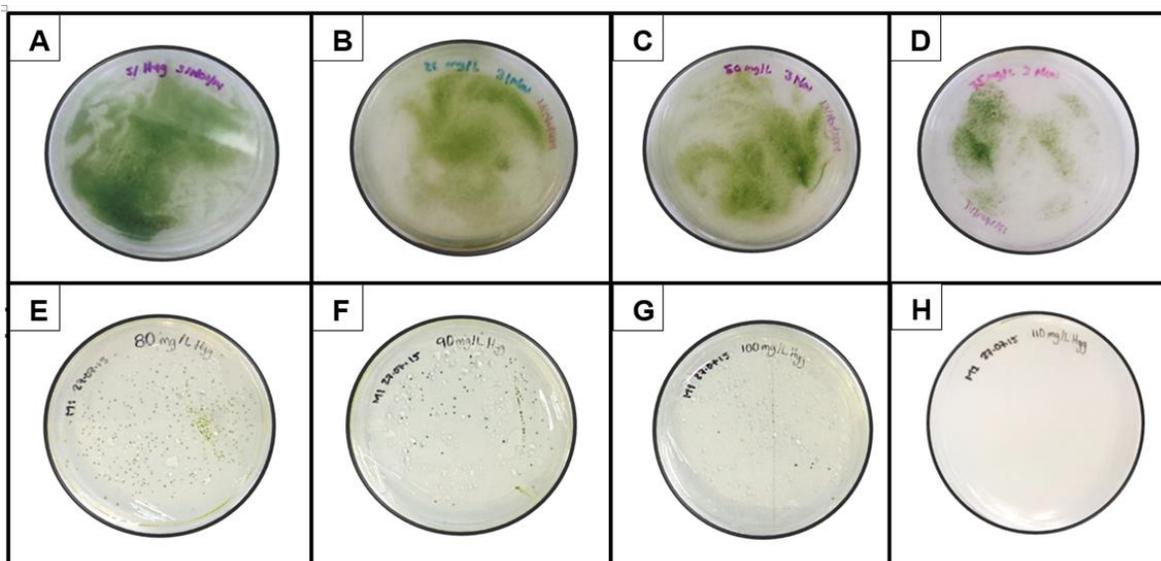


Figura 11. Efecto de la concentración de higromicina (mg/L) sobre el crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* en medio TAP. Crecimiento después de 5 semanas en: (A) 0, (B) 25.0, (C) 50.0, (D) 75.0, (E) 80.0, (F) 90.0, (G) 100.0 y (H) 110.0.

del crecimiento a altas concentraciones del antibiótico (Apt 1996; Facialto 1999; Anila 2011).

La sensibilidad observada por *Dunaliella tertiolecta* para higromicina, indica que el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hptII*) contenido en el plásmido pCAMBIA1304, puede ser utilizado como un marcador de selección para esta especie de microalga transformada genéticamente.

B TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Dunaliella tertiolecta*

Las células del cultivo de *Dunaliella tertiolecta* fueron transformadas con las diferentes concentraciones de *Agrobacterium* EHA105::pCAMBIA1304, bajo distintas condiciones de infección, y co-cultivadas a diferentes tiempos, cada uno de ellos descritos anteriormente. Con base en los resultados anteriores, se emplearon células crecidas en el día 4 del cultivo para llevar a cabo la transformación genética, debido a que este día había un 86 % de viabilidad celular y un buen número de células; lo anterior, en conjunto sugiere que a este tiempo de cultivo existe un considerable número de células (1.0×10^6 cel/mL) susceptibles de ser efectivamente transformadas.

1 Análisis histoquímico de la expresión transitoria del gen *gus* en las células transformadas de *D. tertiolecta*.

La expresión transitoria del gen *gus* fue analizada una vez que se recuperaron las células del co-cultivo, mediante el ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa, observándose la coloración de color azul índigo característica después de la

incubación con X-GLUC por 24 h (Fig 12); las células control no transformadas (Fig 12A) no presentaron coloración.

La tinción de las células GUS positivas fue diferente entre ellas, mostrándose de moderada a intensa en algunas células, el mismo comportamiento se observó en *Haematococcus pluvialis* (Kathiresan 2009); mientras que en *Dunaliella Bardawil*, la tinción fue apenas visible y sin uniformidad (Anila 2011).

El análisis de la expresión transitoria del gen *gus* se realizó mediante conteos celulares en un microscopio óptico y a través del empleo de la cámara de Neubauer. A partir de éstos, se obtuvieron valores de eficiencia de transformación, determinada como el porcentaje de células GUS positivas. Dichas eficiencias oscilaron entre 55 % y 80 % para los distintos tratamientos de transformación; estos valores estuvieron por encima de lo reportado en *Nannochloropsis* sp. (Cha 2011), con 21.4 %, y en *Chlorella vulgaris*, con 25 % (Cha 2012); cabe mencionar que las condiciones utilizadas en el proceso de transformación por este autor difieren en algunos parámetros (tiempo de co-cultivo), con las utilizadas en la presente investigación.

2 Viabilidad celular del cultivo de *D. tertiolecta* transformada

Una vez recolectadas las células transformadas del co-cultivo, se les determinó la viabilidad celular por colorante de exclusión, esto para verificar la sobrevivencia de las células a las variadas condiciones del proceso de transformación (densidad óptica de *Agrobacterium*, tiempo de co-cultivo y tipo de infección). Los valores de viabilidad celular variaron principalmente entre los tipos de infección a los que fueron sometidas las microalgas durante su transformación.

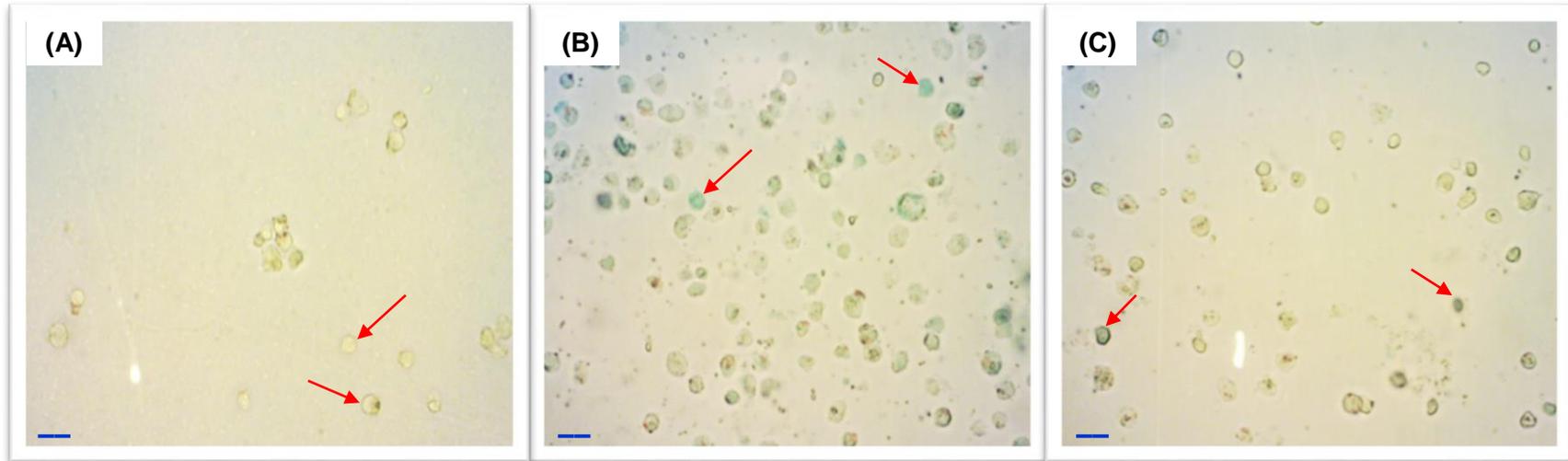


Figura 12. Análisis histoquímico de la expresión del gen *gus* en células de *D. tertiolecta* . Vista con microscopio óptico 40X: (A) Control *D. tertiolecta* sin transformar, donde no se observa coloración azul. (B) *D. tertiolecta* mostrando la expresión de *gus* a través del método de infección sólido; (C) *D. tertiolecta* mostrando la expresión *gus* a través del método de infección líquido. Las barras de referencia equivalen a 20 µm.

Se encontraron valores en un rango de (87 % - 92 %) para el método de infección sólido, mientras que para el método de infección en líquido los valores se encontraron en un rango de (80 % - 90 %).

3 Análisis estadístico del Índice de Eficiencia de Transformación (IET)

El IET resultó de la ponderación de las dos variables analizadas anteriormente: viabilidad celular y eficiencia de transformación de las células gus positivas; ambas variables fueron ponderadas según su importancia en el proceso; así, se asignó el 50 % a la primera y el 50 % a la segunda, ya que se requiere que sobrevivan el mayor número de células efectivamente transformadas.

Los Índices de Eficiencia de Transformación variaron entre el 69 y 87 %, encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre algunos tratamientos (Fig 13). Los cinco mejores tratamientos de transformación según el IET pertenecían al método de infección en sólido: (1) $DO_{Agro} = 1.0$, $T_{co-cult} = 48$ h; (2) $DO_{Agro} = 1.5$, $T_{co-cult} = 48$ h; (3) $DO_{Agro} = 0.5$, $T_{co-cult} = 72$ h; (4) $DO_{Agro} = 1.0$, $T_{co-cult} = 72$ h y (5) $DO_{Agro} = 1.5$, $T_{co-cult} = 72$ h, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto al resto de los tratamientos, que en promedio lograron un IET del 85 %.

Las condiciones de co-cultivo que resultaron mejores entre los demás tratamientos fueron similares, o presentaron valores cercanos a las condiciones utilizadas por diversos autores, para la transformación de algunas especies de microalgas de agua salada; Úbeda-Mínguez (2015) optimizó las condiciones de co-cultivo para la transformación de *Tetraselmis chuii*, obteniendo $DO_{Agro} = 1.0$,

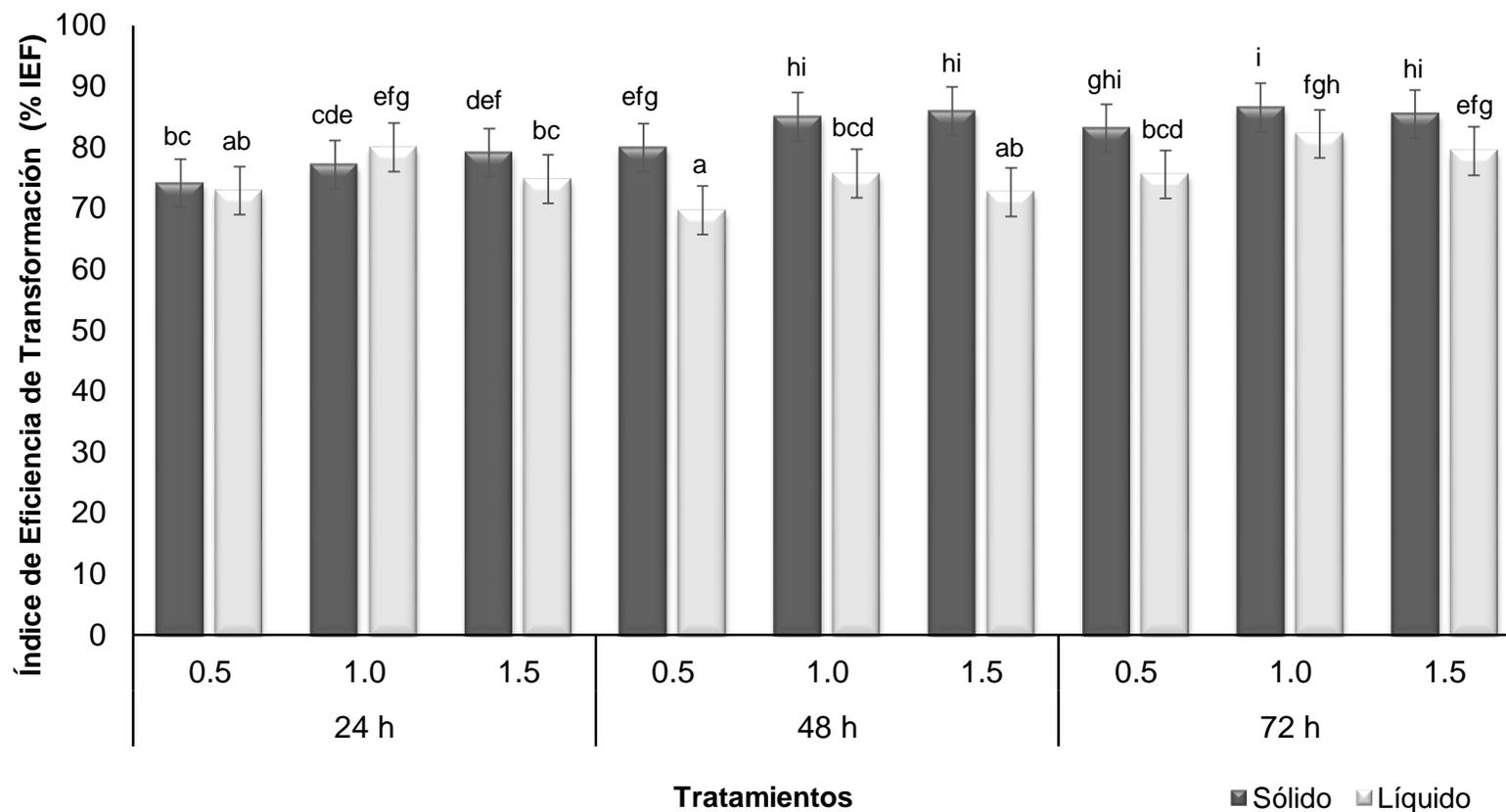


Figura 13. Efecto de la concentración de *Agrobacterium*, tiempo de co-cultivo y medio de infección en el Índice de Eficiencia de Transformación en *Dunaliella tertiolecta*. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (LSD = 3.95, $p \leq 0.05$).

$T_{\text{co-cult}} = 72$ h; Cheng (2012) transformó a la microalga *Schizochytrium* utilizando el método de infección en sólido, $DO_{\text{Agro}} = 0.8$ y $T_{\text{co-cult}} = 12$ h; por su parte, Anila (2011) transformó genéticamente a *Dunaliella bardawil* bajo las condiciones de co-cultivo de $DO_{\text{Agro}} = 0.5$, $T_{\text{co-cult}} = 48$ h y utilizando el método de infección en sólido.

La relación entre la cantidad de *Agrobacterium* y la célula huésped es un factor importante que influye en la frecuencia de transferencia del ADN-T; las bajas concentraciones de *Agrobacterium* pueden reducir la eficiencia de la transferencia del ADN-T, mientras que las concentraciones altas de la bacteria pueden afectar la viabilidad de las células. En esta investigación los mejores tratamientos, según el análisis del IET, arrojaron valores de $DO = 1.0$ y $DO = 1.5$. Cha (2012) reportó un aumento en el porcentaje de células GUS positivas del 6.6 % al 15.1 %, cuando incrementó la densidad óptica de *Agrobacterium* de 0.2 a 1.0 unidad; muchos estudios de transformación genética de plantas y microalgas han reportado 1.0 como la densidad óptima de *Agrobacterium* para el desarrollo de protocolos de transformación (Humara y col 1999).

El tiempo de co-cultivo óptimo es dependiente de cada especie en transformación. Los mejores tratamientos en esta investigación requirieron 48 y 72 h de co-cultivo de la microalga con la bacteria, similar a lo reportado por Kumar (2003) y Kathiresan (2009) para el co-cultivo de *C. reinhardtii* y *H. pluvialis* respectivamente, y por Cha (2012) para el co-cultivo de *C. vulgaris*, la cual requirió un periodo de 72 h, observando que al pasar ese tiempo, la eficiencia de transformación disminuía. El principal problema que se presenta al prolongar el

tiempo de co-cultivo después de 5 días, es a menudo el sobrecrecimiento de la bacteria en el medio y consecuentemente la muerte celular de la microalga (Humara y col 1999; Hu y col 2006).

VIII CONCLUSIONES

Con base en la curva de crecimiento celular, el cultivo de *Dunaliella tertiolecta* presentó una tasa de crecimiento específico (μ) de 0.17 d^{-1} , y un tiempo de duplicación (dt) de 4.1 d.

Bajo las condiciones empleadas, a los 4 días de cultivo se logró obtener hasta un 86% de viabilidad, alcanzando la densidad celular mínima ($1 \times 10^6 \text{ cel/mL}$) recomendada para la realización de los ensayos de transformación a través de *Agrobacterium*.

La dosis letal mínima de higromicina para la selección de células transformadas de *Dunaliella tertiolecta*, fue de 110 mg/L.

Tomando como base la viabilidad de las células transformadas y el número de células expresando el gen reportero *gus*, el 27.8% de los ensayos de transformación evaluados permitió obtener un IET arriba del 83%.

Las condiciones de transferencia genética determinadas en el presente trabajo, podrían permitir el desarrollo posterior de una plataforma de expresión de proteínas recombinantes de interés, en la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar CP. 1995.** Crecimiento y ciclo de vida de la microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta, volvocales) de las Salinas de los Chimus (Ancash) y las Salinas de Chilca (Lima) [Tesis de Licenciatura]. Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma. 69 p.
- Allen JF, de Paula WBM, Puthiyaveetil S, Nield J. 2011.** A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Science* 16:645-655.
- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. 2011.** Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88(10):3402-3410.
- Andersen RA. 2005.** Algal culturing techniques. Estados Unidos de América: Elsevier Academic Press. 578 p.
- Anila N, Chandrashekar A, Ravishankar GA, Sarada R. 2011.** Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. *European Journal of Phycology* 46:36-44.
- Apt KE, Behrens PW. 1999.** Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology* 35:215-226.
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR. 1996.** Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular Genetics and Genomics* 252:572-579.

Archibald JM, Rogers MB, Toop M, Ishida K, Keeling PJ. 2003. Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 100:7678-7683.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Andrew E. Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. Science 306:79-86.

Arun N, Singh DP. 2013. Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: A study on growth, pigment and glycerol synthesis. Journal of Marine Biology Assesment 55(1):65-70.

Avron A. 1986. The osmotic component of halotolerant algae. Trends in Biochemical Sciences 11:5-6.

Balat M, Balat H. 2010. Progress in biodiesel processing. Applied Energy 87(6):1815-1835.

Beer L, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. Energy Biotechnology 20(3):264-271.

Ben-Amotz A, Avron M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. Plant Physiology 51:875-878.

Berger WH, Smetacek VS, Wefer G. 1989. Productivity of the Ocean: Present and Past. New York: Wiley. 471 p.

Bergey DH, Garrity GM, Boone, DR, Castenholz, RW, Brenner DJ, Krieg NR. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology* New York, Springer-Verlag.

Beth AR, Stephen PM. 2010. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered Bugs* 2(1):50-54.

Bhattacharya D, Medlin L. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiology* 116:9-15.

Blanc G, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Polle J, Salamov A, Terry A. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex. *The Plant Cell*. 22:2943-2955.

Bo-Ping H. 2001. Photosynthesis-Irradiance Response at Physiological Level: a Mechanistic Model. *Journal of Theoretical Biology* 213:121-127.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jonsen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111.

Bold HC, Wynne MJ. 1985. Introduction to the algae. 2^a ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.

- Bolton GW, Nester EW, Gordon MP. 1986.** Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232(4753):983-985.
- Bonara A, Mares D. 1982.** A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms. *Current Microbiology* 7:217-222.
- Borowitzka MA. 2006.** Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae. *Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae. Journal of Biotechnology* 70:313-321.
- Brahamsha B. 1996.** A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Applied Environmental Microbiology* 62:1747-51.
- Brennan L, Owende P. 2010.** Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577.
- Browler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otilar RP, Rayko E, Salamov A. 2008.** The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456:239-244.
- Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. 1991.** Introduction of Exogenous DNA into *Chlamydomonas-Reinhardtii* by Electroporation. *Molecular and Cellular Biology* 11:2328-2332.

- Butanaev AM. 1994.** Hygromycin phosphotransferase gene as a dominant selective marker for transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biology* 28:682-686.
- Buzby JS, Porter RD, Stevens SE. 1985.** Expression of the *Escherichia coli* lacZ gene on a plasmid vector in a cyanobacterium. *Science* 7:230-805.
- Cadoret JP, Garnier M, Saint-Jean B. 2012.** Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. *Advances in Botanical Research* 64:285-341.
- Calderón A, Serpa RF. 2003.** Efectos del paraquat sobre el crecimiento y la morfología de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecología Aplicada* 2(1):99-102.
- Capasso JM, Cossío BR, Berl T, Rivard CJ, Jiménez C. 2003.** A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures. *Biomolecular Engineering* 20:133-138.
- Cha TS, Yee W, Aziz A. 2012.** Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4):1771-1779.
- Cha TS, Chen CF, Yee W, Aziz A, Loh SH. 2011.** Cinnamic acid, coumarin and vanillin: alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Microbiological Methods* 84:430-434.

- Chan CX, Reyes-Prieto A, Bhattacharya D. 2011.** Red and Green algal origin of diatom membrane transporters: insights into environmental adaptation and cell evolution. *PLoS One* 6(12).
- Chebolu S, Daniell H. 2009.** Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. *Plant-Produced Microbial Vaccines* 33-54.
- Chen Y, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Li W. 2001.** Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Current Genetics* 39:365-370.
- Cheng R, Ma R, Li K, Rong H, Lin X, Wang Z, Yang S, Ma Y. 2012.** *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological Research* 167:179-186.
- Chisti Y, Yan J. 2011.** Algal biofuels - a status report. *Applied Energy* 88:3277-3279.
- Chisti Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3):294-306.
- Chuntapa B, Powtongsook S, Menasveta P. 2003.** Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture* 220:355-366.
- Cock JM, Coelho SM. 2011.** Algal models in plant biology. *Journal of Experimental Botany* 62(8):2425–2430.

Coelho SM, Peters AF, Charrier B, Roze D, Destombe C, Valero M, Cock JM. 2007.

Complex life cycles of multicellular eukaryotes: new approaches based on the use of model organisms. *Gene* 406(1-2):152-170.

Coll JM. 2006. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. *Spanish Journal Agricultural Research* 4:316-330.

Cordero BF, Couso I, León R, Rodríguez H, Vargas MÁ. 2011. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:341-351.

Cruz-Mendivil A, Rivera-López J, Germán-Báez LJ, López-Meyer M, Hernández-Verdugo S, López-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. 2011. A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv microtom from leaf explants. *Horticultural Sciences* 46(12):1655-1660.

Debuchy R, Purton S y Rochaix JD. 1989. The argininosuccinatelyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *European Molecular Biology Organization Journal* 8:2803-2809.

De Cleene M, De Ley J. 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review* 42(4):389-466.

Demirbas A. 2010. Energy Sources Part A. Recovery Utilization en Environmental Effects. Energy sources 32(10):909-910.

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouze P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynie S, Cooke R. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 103:11647-11652.

Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT. 2001. The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. Nature 410:1091-1096.

Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe VI. 2003. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:10020-10025.

Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG. 1995. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. Journal of Phycology 31:1004-1012.

European Biodiesel Board. 2014. <http://www.ebb-eu.org/stats.php>

Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C. 1999. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. Marine Biotechnology 1:239-51.

Falkowski PG. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. Photosynthesis Research 39:235-258.

Feng SY, Xue LX, Liu HT, Lu PJ. 2009. Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular Biology Reports* 36:1433-1439.

Feito L. 1999. El sueño de lo posible. Bioética y terapia génica. Graficas Delos S.L. España. p 65-70.

Fischer H, Robl I, Sumper M, Kröger N. 1999. Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (*bacillariophyceae*). *Journal of Phycology* 35:113–120.

Franklin SE, Mayfield SP. 2005. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5:225-35.

Franklin SE, Mayfield SP. 2004. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology* 7:159-165.

Gastineau R, Davidovich NA, Hallegraef GM, Probert I, Mouget JL. 2001. Reproduction in microalgae. En: Ramawat KG, Mérillon JM, Shivanna KR. *Reproductive Biology of Plants*. Londres: CRC Press. 1 p.

Gelvin SB. 1998. *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *Journal of Bacteriology* 180:4300-2.

Georgianna DR, Michael J. Hannon MJ, Marcuschi M, Shuiqin Wu S, Botsch K, Lewis AJ, Hyun J, I Mendez M, Mayfield SP. 2013. Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Research* 2(1):2-9.

Germán-Báez LJ. 2009. Expresión de una proteína de reserva de semilla (Bioamar-KDE) en tejido foliar, y evaluación *In vitro* de su actividad antihipertensiva. Tesis de Maestría. Culiacán, Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa.

Gibbs SP. 1992. The evolution of algal chloroplasts. En Lewin RA, editor. *Origins of plastids*. New York: Chapman & Hall. p 107-117.

Gilson y PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ, McFadden GI. 2006. Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: Nature's smallest nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(25):9566-9571.

Gobler CJ, Berry DL, Dyhrman ST, Wilhelm SW, Salamov S, Lobanov AV, Zhang Y, Collier JL, Wurch JL. 2011. Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(11): 4352-4357.

Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA. 2006. Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. *Methods in Molecular Biology*. En: Loyola-Vargas VM, Vazquez-Flota FA. *Plant cell culture protocols*. 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana press Inc. p 51-58.

Gokhale, Sayre RT. 2009. Photosystem II, a structural perspective. En: Stern DB, editor. *The Chlamydomonas Sourcebook*. 2ª edición. San Diego: Academic Press p 573-602.

Gómez-Kosky R, Reyes-Vega M, Bermúdez-Caraballosa I, Chong-Peréz B, Alvarado-Capo Y. 2010. Nuevo método para la selección rápida de plantas de banano (*Musa* spp. AAA cv. Grande naine) transformadas con gen bar procedentes de campo, empleando glufosinato de amonio. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea] 2010, vol. XII. Disponible en Internet:<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=77617808022>. ISSN 0123-3475.

Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:1879-1890.

Gouveia L, Coutinho C, Mendonza E, Batista AP, Sousa I, Bandarra NM, Raymundo A. 2008. Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:891-896.

Green BR. 2011. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The Plant Journal* 66:34-44.

Grzebyk D, Schofield O, Vetriani C, Falkowski PG. 2003. The mesozoic radiation of eukaryotic algae: the portable plastid hypothesis. *Journal of Phycology* 39:259-67.

Griesbeck C, Kobl I, Heitzer M. 2006. *Chlamydomonas reinhardtii*, a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular Biotechnology* 34:213-224.

- Grossman AR. 2000.** *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 3:132-7.
- Guedes C, Malcata FX. 2012.** Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. En: Muchlisin Z(Ed.). *Aquaculture*, ISBN: 978-953-307-974-5.
- Guillard RL, Ryther JH. 1962.** Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* *Husted* and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8:229-239.
- Hess K, Dudley M, Lynn D, Joerger R, Binns A. 1991.** Mechanism of phenolic activation of *Agrobacterium* virulence genes: development of a specific inhibitor of bacterial sensor/response system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:7854-7858.
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M. 2008.** Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:15208-15213.
- Hirata K, Tsujimoto Y, Namba T, Ohta T, Hirayanagi N, Miyasaka H, Zenk MH, Miyamoto K. 2001.** Strong induction of Phytochelatin by Zinc in Marine *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(1):24-29.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. 2008.** Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54(4):621-639.

- Hu Z, Wu Y, Li W, Gao H. 2006.** Factors affecting *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42:461-466.
- Humara JM, López M, Ordás RJ. 1999.** *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of uidA gene transfer. *Plant Cell Reports* 19:51-58.
- Ikaran Z. 2011.** Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* S. Chantanachat and H. C. Bold (Clorofita) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* [Tesis de maestría]. Pamplona: Universidad Pública de Navarra. p 28.
- Jenkins. 1986.** Genética. 2ª ed. España: Editorial Reverté S.A. 784 p.
- Jensen GS, Ginsberg DI, Drapeau MS. 2001.** Blue green algae as an immunoenhancer and biomodulator. *Journal of the American Nutraceutical Association* 3:24-30.
- Kaštánek F, Šabata S, Šolcová O. 2010.** In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella* sp. using the flue gas from cogeneration unit as a source of carbon dioxide. *Waste Management & Research* 28:961-966.
- Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar GA, Sarada R. 2009.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae, Volvocales*). *Journal of Phycology* 45:642-649.

Katz A, Avron M. 1985. Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella*. *Plant Physiology* 78:817-820

Keeling PJ, Palmer JD. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 9:605-618.

Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S, Banerjee UC. 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:2361-2372.

Kilian O, Benemann CSE, Niyogi KK, Vick B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis sp.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:1265-1279.

Kindle KL. 1990. High-Frequency Nuclear Transformation of *Chlamydomonas-Reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:1228-32.

Kindle KL, Schnell RA, Fernández E, Lefebvre PA. 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *Journal Cellular Biology* 109:2589-2601.

Kuang M, Wang SJ, Li Y, Shen D-I, Zeng CK. 1998. Transient expression of exogenous *gus* gene in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 16:56-61.

- Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV. 2004.** Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 8:166-731.
- Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. 2001.** Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 6:98-1871.
- Kurtzman AL, Cheney DP. 1991.** Direct gene transfer and transient gene expression in a marine red alga using the biolistic method. *Journal of Phycology* 27:42.
- Lee RE. 1989.** *Phycology*. 4^a ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press. 561 p.
- León R, Cousoa I, Fernández E. 2007.** Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology* 130:143-152.
- León-Bañares R, Gonzalez-Ballester D, Galvan A, Fernandez E. 2004.** Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnology* 22:45-52.
- Li Q, Du W, Liu D. 2008.** Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology* 80:749-756.
- Li Y, Han D, Hu G, Sommerfeld M, Hu Q. 2010.** Inhibition of Starch Synthesis Results in Overproduction of Lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 107(2):258-268.
- Lipps JH. 1993.** *Fossil Protists*. Oxford: Blackwell. p 778-799.

Lohuis MR, Miller DJ. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant Journal* 13:427-435.

Manimaran P, Ramkumar G, Sakthivel K, Sundaram RM, Madhav MS, Balachandran SM. 2011. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: present status and future prospects. *Biotechnology Advances* 29:703-14.

Maruyama M, Horakova I, Honda H, Xing XH, Shiragimi N, Unno H. 1994. Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. *Biotechnology Techniques* 8:821-826.

Matsunaga T, Takeyama H. 1995. Genetic Engineering in Marine Cyanobacteria. *Journal Applied Phycology* 7:77-84.

Matsunaga T, Sakaguchi T, Tadokoro F. 1991. Magnetite Formation by a Magnetic Bacterium Capable of Growing Aerobically. *Applied Microbiology Biotechnology* 35:651-655.

Matsuzaki M, Misumi O, Shin T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima S, Mori T, Nishida K. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653-657.

Mayfield SP, Franklin SE. 2004. Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae. *Vaccine* 23:1928-1932

- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. 2003.** Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):438-442.
- Mayo KJ, Gonzales BJ, Mason HS. 2006.** Genetic transformation of tobacco NT1 cells with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Protocols* 1(3):1105-1111.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L. 2007.** The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Function. *Science* 318(5848):245-250.
- Metting FB. 1996.** Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology* 17:477-489.
- Milledge JJ. 2011.** Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 10:31-41.
- Mishra A, Mandoli A, Jha B. 2008.** Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1093-1101.
- Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K. 2011.** Expressed Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Horseradish Peroxidase Identifies Co-Clustering Molecules in Individual Lipid Raft Domains. *PLoS ONE* 9(3).
- Muller J. 1981.** Fossil pollen records of extant angiosperms. *Botanical Review* 47:1-140.

Muñoz J, Barahona A, Herrera E. 2004. Alimentos transgénicos: Ciencia, ambiente y mercado: Un debate abierto. 1ª ed. Argentina: Siglo XXI editores S.A. de C.V.

Mutanda T, Ramesha D, Karthikeyan S, Kumaria S, Anandraj A, Buxa F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102:57-70.

National Biodiesel Board. 2012. <http://nbb.org/>

Neuhaus G, Neuhausurl G, Degroot EJ, Schweiger HG. 1986. High-yield and stable transformation of the unicellular green-alga *Acetabularia* by microinjection of SV40 and PSV2NEO. *European Molecular Biology Organization Journal* 65:1437-1444.

Neuhaus G, Spangenberg G. 1990. Plant Transformation by Microinjection Techniques. *Plant Physiology* 79:213-217.

Neumann E, Schaeferriidder M, Wang Y, Hofschneider PH. 1982. Gene-Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric-Fields. *European Molecular Biology Organization Journal* 1:841-845.

Pan K, Qin JJ, Li S, DaiWK, Zhu BH, Jin YC. 2011. Nuclear Monoploidy and Asexual Propagation of *Nannochloropsis Oceanica* (*Eustigmatophyceae*) as Revealed by Its Genome Sequence. *Journal of Phycology* 47:1425-1432.

Parker MS, Mock T, Armbrust EV. 2008. Genomic Insights into Marine Microalgae. *Annual Review of Genetics* 42:619-45.

- Pfeiffer A, Kunkel T, Hiltbrunner A, Neuhaus G, Wolf I, Speth V. 2009.** A cell-free system for light-dependent nuclear import of phytochrome. *Plant Journal* 57:680-689.
- Polnefuller M, Gibor A. 1984.** Developmental studies in *Porphyra*. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *Journal of Phycology* 20:609-916.
- Poulsen N, Chesley PM, Kroger N. 2006.** Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 42:1059-1065.
- Pratheesh PT, Vineetha M, Kurup GM. 2014.** An Efficient Protocol for the Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology* 56:507-515.
- Prochnik SE, Umen J, Nedelcu AM, Hallmann A, Miller SM, Nishii IN, Ferris P, Kuo A, Mitros T, Fritz-Laylin LK. 2010.** Genomic Analysis of Organismal Complexity in the Multicellular Green Alga *Volvox carteri*. *Science* 329(5988): 223-226.
- Pulz O, Gross W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiological Biotechnology* 65:635-48.
- Qin S, Lin H, Jiang P. 2012.** Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnology Advances* 30:1602-1613.
- Qin S, Jiang P, Tseng C. 2005.** Transforming kelp into a marine bioreactor. *Trends Biotechnology* 23:264-268.

- Qin S, Jiang P, Li XP, Wang XH, Zeng CK. 1998.** A transformation model for *Laminaria japonica* (*Phaeophyta, Laminariales*). Chinese Journal of Oceanology and Limnology 16:50-5.
- Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. 2010.** Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. American Society for Microbiology. 9:486-501.
- Radmer RJ. 1996.** Diversidad de algas y productos de algas comerciales. BioScience, Marine Biotechnology 4-46:263-270.
- Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso R, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M, Mayfield SP. 2010.** Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Biotechnology Journal 8:719-733.
- Reddy SM. 1996.** University Botany I: (Algae, Fungi, Bryophyta And Pteridophyta). 1^a ed. New Dheli: New Age International. p 14-20.
- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri R, Coosemans N, Hamel P. 2009.** The *ARG9* Gene Encodes the Plastid-Resident *N*-Acetyl Ornithine Aminotransferase in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell 8(9):1460-1463.
- Reyes-Prieto A, Bhattacharya D. 2007.** Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within plantae. Molecular Biology and Evolution 24:2358–61.

Richardson A, Fedoroff S. 2001. Quantification of cells in culture. En *Protocols for Neural Cell Culture*. Fedoroff S, Richardson A. 3^a ed. Totowa, New Jersey. Humana press Inc. p 333-339.

Richmond A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. United Kingdom: Blackwell Science Limited. 545 p.

Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA. 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424:1042-1047.

Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology* 19:430-436.

Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research* 35:291-311.

Schnorf M, Neuhaus-Url G, Galli A, Iida S, Potrykus I, Neuhaus G. 1991. An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis. *Transgenic Research* 1:23-30.

Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 21(3):277-286.

Segovia M, Haramaty L, Berges JA, Falkowski PG. 2003. Cell death in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant Physiology* 132:99-105.

Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H. 1998. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148:1821-1828.

Sims R, Christenson L. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and subproducts. *Biotechnology Advances* 29(6):686-702.

Sode K, Tatara M, Takeyama H, Burgess JG, Matsunaga T. 1992. Conjugative gene-transfer in marine *cyanobacteria* - *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. and *Pseudanabaena* sp. *Applied Microbiology Biotechnology* 37:369–73.

Soltani J, van Heusden GP, Hooykaas PJ. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of non-plant organisms. En: Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. New York: Springer. p 649-675.

South GR, Whittick A. 1996. Reproduction and life cycles. En: An introduction to phycology. Londres: Blackwell Scientific Ltd. 120-162 p.

Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S. 2010. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 32:1373-1383

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2):87-96.

Stachel S.E. 1985. Identification of signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. En: Nature 318:624-629.

Staehelein LA. 1986. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In Staehelein LA, Arntzen CJ, editores. Photosynthesis III: Photosynthetic Membranes and Light-harvesting Systems. Verlag, Berlin, Germany: Springer. p 1-84.

Steinbrenner J, Sandmann G. 2006. Transformation of the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology 72(12):7477-7484.

Stephanopoulos G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuels production. Science 315:801.

Stevens SE, Porter RD. 1980. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America -Biology Science 77:6052-6056.

Steward N, Martin R, Engasser JM, Goergen JL. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant Cell Reports 19: 171-176.

Sun Y, Yang ZY, Gao XS, Li QY, Zhang QQ, Xu ZK. 2005. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. Molecular Biotechnology 30:185-192.

- Takahashi T, Kakehi JI. 2010.** Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany* 105:1-6.
- Timilsina GR, Mevel S. 2013.** Biofuels and Climate Change mitigation: A CGE Analysis Incorporating Land-use change. *Environmental and Resource Economics* 55(1):1-19.
- Tinland B. 1992.** The T-DNA linked VirD2 protein contains two distinct nuclear localization signals. En: *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. 89:7442-7446.
- Tolnai S. 1972.** A method for viable cell count. *Methods in Cell Science* 1:37–38
- Tolonen AC, Liszt GB, Hess WR. 2006.** Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Applied Environmental Microbiology* 72:7607-7613.
- Tran M, Zhou B, Pettersson PL, Gonzalez MJ, Mayfield SP. 2009.** Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology Bioengineering* 104(4):663-73.
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. 2002.** Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1. En: *Proceedings of the Natural Academy of Sciences United States of America* 99(16):10435-10440.

- Van Haaren MJJ, Pronk JT, Schilperoort RA, Hooykaas, PJJ. 1998.** Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid left and right T-Region border fragments. *Plant Molecular Biology* 8: 95-104.
- Voltolina D, Bückle-Ramírez LF, Morales-Guerrero ER. 1989.** Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. 2ª ed. CICESE, Ensenada, B.C. 67 p.
- Wallis JG, Browse J. 2010.** Lipid Biochemists Salute the Genome. *Plant Journal* 61:1092-1106.
- Wang JF, Jiang P, Cui YL, Guan XY, Qin S. 2010.** Gene transfer into conchospores of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) by glass bead agitation. *Phycology* 49: 355-360.
- Watanabe M, Cheng K, Murayama Y, Ueno K, Asamizuya T, Tanaka K, Logothetis N. 2011.** Attention But Not Awareness Modulates the BOLD Signal in the Human V1 During Binocular Suppression. *Science* 334(6057):829-831.
- Wilson KJ, Parra A, Botero L. 1999.** Application of the GUS marker gene technique to high-throughput screening of *rhizobial* competition. *Canadian Journal of Microbiology* 45(8): 678-685.
- Yesil-Celiktas O, Gurel A, Vardar-Sukan F. 2010.** Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. En: *Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors*. Pandalai SG. (Ed). Transworld Research Network. Kerala, India. Pp. 1-54.

- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. 2004.** A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 21:809-818.
- Yu W, Ansari W, Schoepp NG, Hannon MJ, Mayfield SP, Burkart D. 2011.** Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories* 10(91).
- Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, Ehrhardt D, Grossman AR, Apt KE. 2001.** Trophic obligate conversion of a photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science* 292:2073–2075.
- Zhang ZD, Jiang P, Yang R, Fei X, Tang X, Qin S. 2010.** Establishment of a concocelis-mediated transformation system for *Porphyra* by biolistic PDS-1000/He. *Chinese High Technology Letters* 20:204-207.
- Zhang ZD, Green BR, Cavalier-Smith T. 1999.** Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* 400:155-159.
- Zhu Y. 2003.** Identification of Arabidopsis rat mutants. *Plant Physiology* 132(2): 494-505.
- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F. 1975.** Preparation of erythrocyte ghosts by dielectric breakdown of the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Journal* 375:209-219.

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal 23:11-28.

Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG. 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable markers and reporter genes. Journal of Phycology 36:379-386.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico de Transferencia
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés Analysis of variance)
AS	Asetosiringona
ATP	Adenosin trifosfato
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CaCl ₂	Cloruro de calcio
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CICESE	Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada
CO ₂	Dióxido de carbono
Co-cult	Co-cultivo
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
DO	Densidad óptica
<i>D. salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
<i>D. tertiolecta</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein)
GRAS	Generalmente Reconocidos Como Seguros (del inglés Generally Recognized As Safe)
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
IET	Índice de eficiencia de transformación

LB	Left border
<i>L. japonica</i>	<i>Lonicera japonica</i>
Lsc	Cadena larga simple (del inglés Long single chain)
LSD	Mínima diferencia significativa (del inglés Least Significant Difference)
Mpb	Mega pares de bases
NADPH ₂	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGS	Secuenciación de nueva generación (del inglés Next Generation Sequencing)
PDS	Fitoeno desaturasa (del inglés Phytoene desaturase)
PEG	Polietilenglicol
<i>P. haitanensis</i>	<i>Porphyra haitanensis</i>
<i>P. tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
RB	Right border
Sp	Especie (del inglés specie)
S	Svedberg
TAG	Triacilglicéridos
TAP	Tris-acetato-fosfato (del inglés Tris-acetate-phosphate)
TGH	Transferencia de genes horizontal
Ti	Inductor de tumores (del inglés Tumor induction)
Ufc	Unidades formadoras de colonias

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio F/2

Para preparar el medio F/2 se agregan 1 mL de cada solución (previamente esterilizadas) en un litro de agua salada estéril. Las soluciones de elementos traza y vitaminas se describen a continuación. Si las algas no requieren silicatos, se recomienda su omisión en el medio, pues ocasionan precipitación.

Componente	Solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio
NaNO ₃	75 g·L ⁻¹	1 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g·L ⁻¹	1 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30 g·L ⁻¹	1 mL	1.06 x 10 ⁻⁴ M
Metales traza	Ver descripción abajo	1 mL	---
Vitaminas	Ver descripción abajo	0.5 mL	---

Solución patrón de metales traza

Para preparar la solución patrón de metales traza, en 950 mL de agua destilada, se agregan los componentes, se disuelven completamente y se lleva a un volumen final de un litro. Se esterilizan en autoclave a 121°C, 12 kg·cm⁻² por 20 minutos.

Componente	Concentración en la solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio final
FeCl ₃ 6H ₂ O	---	3.15 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M

Na ₂ EDTA 2H ₂ O	---	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8 g·L ⁻¹	1 mL	3.93 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3 g·L ⁻¹	1 mL	2.60 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0 g·L ⁻¹	1 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0 g·L ⁻¹	1 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0 g·L ⁻¹	1 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M

Solución patrón de vitaminas

Para preparar la solución patrón, primero se disuelve la tiamina en 950 ml de agua destilada, y posteriormente se agrega 1 mL de solución patrón de biotina y de cianocobalamina. Finalmente se lleva a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. Se filtroesteriliza y se almacena a 4°C bajo condiciones de oscuridad.

Componente	Concentración en la solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio final
Tiamina HCL (vit. B ₁)	---	200 mg	2.96 x 10 ⁻⁷ M
Biotina (vit. H)	1.0 g·L ⁻¹	1 mL	2.05 x 10 ⁻⁹ M
Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1.0 g·L ⁻¹	1 mL	3.69 x 10 ⁻¹⁰ M

Anexo 2. Composición del medio TAP

El medio TAP puede ser usado para aquellas algas que usan NH_4^+ en lugar de NO_3^- como fuente de nitrógeno.

Para un volumen final de 1000 mL se agregan las siguientes cantidades de soluciones patrón, preparadas a las concentraciones dadas. En 850 mL de agua destilada, se añaden un componente tras otro hasta mezclarlos completamente, y finalmente se lleva a un volumen de 1000 mL. Todas las soluciones patrón se almacenan a 4 °C.

Solución patrón (SP)	Volumen	Componente	Concentración en la SP	Concentración final en el medio
Base Tris	2.42 g	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ Tris (hidroximetil)- aminometano		$2.0 \times 10^{-2} \text{ M}$
Sales TAP (sales Beijerinck)	25 mL	NH_4Cl $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ $8.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ $4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$
Solución fosfatos	1 mL	K_2HPO_4 KH_2PO_4	$28.8 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ $14.4 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.65 \times 10^{-3} \text{ M}$ $1.05 \times 10^{-3} \text{ M}$
Solución de elementos traza	1 mL	Na_2EDTA $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ H_3BO_3	$5.00 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ $2.20 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ $1.14 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ $0.50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.34 \times 10^{-4} \text{ M}$ $1.36 \times 10^{-4} \text{ M}$ $1.84 \times 10^{-4} \text{ M}$ $4.00 \times 10^{-5} \text{ M}$

		MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.50 g·100 mL ⁻¹	3.29 x 10 ⁻⁵ M
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.16 g·100 mL ⁻¹	1.23 x 10 ⁻⁵ M
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.16 g·100 mL ⁻¹	1.00 x 10 ⁻⁵ M
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.11 g·100 mL ⁻¹	4.44 x 10 ⁻⁶ M
		(NH ₄) ₆ MoO ₃		
Ácido acético	1 mL	CH ₃ COOH		

Para preparar la solución de elementos traza, primero se disuelve Na₂EDTA ·2H₂O en 100 mL de agua destilada calentando a 60 - 80 °C, después se ajusta el pH a 5.0 con KOH. Se añaden todos los elementos traza por separado, checando el pH constantemente. El pH no debe de aumentar más de 6.8, de lo contrario el MnSO₄ podría precipitar. La solución se almacena a 4 °C; cuando el color cambie de naranja a rojo, aproximadamente después de 2 semanas, se filtra y almacena a -20 °C en un contenedor de teflón o policarbonato (no use contenedores de vidrio para estos elementos, pues tienden a absorber la superficie del vidrio). Después de la adición del ácido acético, el pH cambia a 7.0.

El pH final del medio se ajusta a 6.0 o al deseado con ácido acético y se esteriliza en autoclave a 121 °C, 1.2 kg·cm⁻² por 20 min.

Para el cultivo en TAP solido, se agrega agar al 1.0 - 1.5 % al medio preparado, antes de someter a la esterilización en autoclave.