

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**Transformación genética de cloroplastos de tabaco con los genes *Cel9A* de
Phanerochaete Chrysosporium y *mfc* de *Ampullaria crossean***

POR:

Q.B.P. Yaneiry Jasmin Reyes Caraveo

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias en Biotecnología

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JULIO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 3 de junio de 2021.

Oficio: 57/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Transformación genética de cloroplastos de tabaco con los genes *Cel9A* de *Phanerochaete chrysosporium* y *mfc* de *Ampullaria crossean*”**, presentada por la **Q.B.P. Yaneiry Jasmin Reyes Caraveo**, alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”

Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez
Director de tesis

Dra. Sughey Ramona Sinagawa García
Co-Directora de tesis

Dr. Quintín Rascón Cruz
Asesor de tesis

Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos
Asesor de tesis

M.C. Tania Samanta Siqueiros Cendón
Asesora de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

Chihuahua, Chihuahua a 2 junio de 2021

Ph.D. Jaime Raúl Adame Gallegos
Coordinador Académico de Posgrado
FCQ UACH
P R E S E N T E . –

Aprovecho para saludarlo e informarle que se llevó a cabo la revisión de tesis titulada “TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS DE TABACO CON LOS GENES *Cel9A* DE *Phanerochaete chrysosporium* Y *mfc* DE *Ampullaria crossean*” presentada por la alumna **Q. B. P. Yaneiry Jasmin Reyes Caraveo** con el número de matrícula 271884 del programa de Maestría en Biotecnología.

Concluido el trabajo experimental, se realizó la revisión del trabajo escrito y después de hacer las correcciones necesarias manifestamos que se han cumplido los objetivos señalados para proceder a la revisión del escrito por el Comité de Tesis y posteriormente con los tramites necesarios para la presentación del Examen de Grado.

A T E N T A M E N T E



Dr. Edward Alexander Espinoza
Sánchez
Director de tesis



Dra. Sughey Ramona Sinagawa
García
Co-Directora de tesis



DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir esta meta en mi vida.

A mis padres Margarita Roció Caraveo Pérez y Joaquín Reyes Barrios por su esfuerzo y confianza, por siempre creer en mí y apoyarme a seguir mis sueños y a superarme siempre, por darme la oportunidad y la motivación de seguir estudiando.

A mi abuela Adela Pérez por apoyarme siempre con mis estudios y darme fuerza siempre con una sonrisa y un abrazo.

A mis hermanos Karina Anai Reyes Caraveo y Joaquín Arturo Reyes Caraveo por su apoyo y estar al pendiente de mí siempre, por motivarme y por siempre cuidarme.

A mi sobrino Aiden Buena Reyes, que llegó a nuestras vidas mientras estudiaba la maestría y ha sido un pequeño motor en mi vida.

A todas las personas que confiaron en mí y me apoyaron a lograr mis sueños.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser un pilar muy importante en mi vida.

Agradezco a mis padres por ser mi motor siempre, desde pequeña apoyaron mis sueños y confiaron en que puedo lograr cosas grandes. A mi madre por siempre apoyarme y ser la persona que me animó a que entrar a la Maestría en esa tarde mientras nos comíamos un helado, por inspirarme siempre y por su frase de “tú puedes con eso y más” que siempre me daba el impulso para seguir en momentos difíciles, a mi padre por ser una gran inspiración, por siempre decirme que era capaz de hacer las cosas y sacarme una sonrisa con sus ocurrencias para sentirme mejor, por ayudarme con mis tareas y siempre con sus ánimos me ayudaba a comenzar mi día con una sonrisa.

Gracias a mi hermana Karina por siempre cuidarme y aconsejarme, a mi hermano Joaquín, por apoyarme en mis estudios y motivarme a seguir y superarme.

Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez, quiero agradecerle de manera muy especial por darme la confianza de trabajar en su laboratorio, nunca olvidaré ese primer día que llegue al laboratorio muy temerosa y nerviosa, pero con muchas ganas de aprender.

M.C. Tania Siqueiros Cendón y Dr. Quintín Rascón Cruz por sus sabios consejos que me ayudaron mucho.

Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos, muchas gracias por el tiempo y dedicación, por sus sabios consejos y correcciones que me ayudaron a concluir y dar lo mejor durante la maestría.

Dra. Sughey Sinagawa García, muchas gracias por la oportunidad de dejarme trabajar en estancia en su laboratorio, por sus enseñanzas y consejos.



Dra. Blanca Flor Iglesias, gracias por sus consejos, ánimos y el apoyo que me brindo durante la maestría.

Quiero agradecer a mis amigos y compañeros de maestría Eduardo Rodríguez, Carolina Máynez y Stephanie García, pero sobre todo a mis hermanas Ilse Corral, Daniela Estrada, Arely Zapien por siempre apoyarme e impulsarme en cada paso que di, en cada lagrima y momento difícil que se llegó a presentar siempre estuvieron presentes, ustedes son lo más bonito e importante que me pasó en la maestría, agradezco mucho por su amistad y espero que dure mucho tiempo.

Alan Velázquez muchas gracias por todo tu apoyo y todo tu amor, gracias por repetirme siempre que podía lograr lo que me propusiera y por nunca dejarme sola, eres una parte muy importante en mi vida.

También quiero agradecer especialmente a mis mejores amigos: Hairo Rios por todo su apoyo e inspirarme siempre a superarme y a Rey Molina, que, aunque está muy lejos físicamente siempre ha encontrado la manera de estar cerca y presente en todos mis logros.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Biotecnología I, Carlos, Arlett, Rodrigo y Amado, por enseñarme tantas cosas, por la bonita amistad que logramos establecer durante los días de trabajo, son los mejores compañeros que me pudo haber tocado.

Quiero agradecer también a José Antonio Badía, Eduardo Espinoza y a Mario López Capistran que fueron una parte muy importante durante el escrito de mi tesis y que me acompañaron durante las largas noches de desvelo y durante toda la Maestría.

INDICE

Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	vii
Lista de abreviaciones.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Biocombustibles	3
2.2 Celulosa.....	5
2.2.1 Conformación de la celulosa	7
2.3 Celulasas.....	8
2.3.1 Estructura general de las celulasas.....	9
2.3.2 Hidrólisis del enlace glucosídico, mecanismo de acción.	10
2.4 Producción de celulasas por organismos.	11
2.4.1 Celulasa multifuncional (EGX) de <i>Ampullaria crossean</i>	12
2.4.2 Endoglucanasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	14
2.5 Ingeniería genética en plantas.....	15
2.6 Cloroplasto	16
2.6.1 El genoma del cloroplasto, plastoma.....	17
2.7 Transformación genética de cloroplasto.....	20
2.7.1 Método de transformación, Biobalística.....	24
2.7.2 Gen marcador de selección.....	25
2.7.3 Secuencias regulatorias	26
2.7.4 Transformación genética en cloroplasto de tabaco	27
2.7.4.1 Celulasas expresadas en cloroplasto de tabaco	27

2.7.1.2 Efectos pleiotrópicos	29
III. HIPÓTESIS	35
IV. JUSTIFICACIÓN.....	36
V. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo General.....	37
5.2 Objetivos específicos.....	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1 Material Vegetal.....	38
6.2 Cepas de <i>E. coli</i>	38
6.3 Vectores de transformación de cloroplasto de tabaco, vector pES6	38
6.4 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	39
6.5 Propagación y caracterización del vector pES6	40
6.6 Diseño y construcción de vectores de clonación	40
6.7 Clonación de los genes <i>mfc</i> y <i>Cel9A</i> en el vector pES6.....	41
6.8 Transformación de <i>E. coli</i> DH5α con pRCY-1 y pRCY-2 por choque térmico.....	42
6.9 Análisis de restricción de pRCY-1 y pRCY-2.....	43
6.10 Transformación genética de cloroplastos de tabaco	43
6.10.1 Preparación de partículas de oro.....	43
6.10.2 Recubrimiento de micropartículas de oro	44
6.10.3 Preparación de material para el bombardeo.....	44
6.10.4 Bombardeo de hojas de Tabaco.....	45
6.11 Selección y regeneración del material transformado	46
6.12 Establecimiento de plantas regeneradas en invernadero	46



6.13	Análisis moleculares	46
6.13.1	Extracción de ADN vegetal.....	46
6.13.2	Análisis de integración de transgenes en plastoma de tabaco mediante PCR.	47
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1	Micropropagación de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Petite Havana	48
7.2	Selección de los genes de interés y diseño de secuencias	48
7.3	Diseño <i>in silico</i> y análisis de restricción de vectores de expresión... ..	56
7.4	Transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Petite Havana por biobalística.....	60
7.5	Rondas de selección	61
7.6	Regeneración de plantas transformadas	65
7.7	Análisis de integración mediante PCR	66
7.8	Traspaso de plantas a condiciones de invernadero	68
VIII.	CONCLUSIÓN.....	71
IX.	PERSPECTIVAS	72
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Reacción química para la producción de etanol y CO ₂ a partir de celulosa	4
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica.	4
Figura 3. Localización y disposición de los principales componentes poliméricos en las paredes celulares vegetales	6
Figura 4. Representación de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa.	7
Figura 5. Estructura de la celulosa y mecanismo de acción de las celulasas.	8
Figura 6. Disposición de las regiones de la celulosa y efecto del pretratamiento en la matriz de hemicelulosa y lignina	9
Figura 7. Mecanismo general de hidrólisis de enlace glucosídico.	11
Figura 8. Mapa circular del plasmoma de <i>Nicotiana tabacum</i>	19
Figura 9. Vector pES6.	39
Figura 10. Preparación de material para biobalística.	45
Figura 11. Micropropagación de plantas silvestres de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Petite Havana.	48
Figura 12. Secuencia nucleotídica codificante del gen <i>Cel9A</i> de <i>Phanerochaete Chrysosporium</i> optimizada y reportada por Chánez <i>et al.</i> (2013).	49
Figura 13. Secuencia nucleotídica codificante del gen <i>Cel9A</i>	49
Figura 14. Secuencia de aminoácidos del gen <i>Cel9A</i> de <i>Phanerochaete Chrysosporium</i>	50
Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de <i>Cel9A</i>	51
Figura 16. Secuencia nucleotídica codificante del gen <i>mfc</i> procedente de <i>Ampullaria crossean</i> optimizada y reportada por Chánez <i>et al.</i> (2013).	52
Figura 17. Secuencia nucleotídica codificante del gen <i>mfc</i>	52

Figura 18. Secuencia de aminoácidos del gen <i>mfc</i> de <i>Ampullaria crosseana</i>	53
Figura 19. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de <i>mfc</i>	54
Figura 20. Sitio activo en forma de hendidura de celulasas multifuncional (<i>mfc</i>)....	55
Figura 21. Superposición de las estructuras de la proteína EGX.....	56
Figura 22. Vector pRCY-1.....	57
Figura 23. Vector pRCY-2.....	58
Figura 24. Cepas de <i>E. coli</i> DH5 α transformado con pRCY-1, pRCY-2.....	59
Figura 25. Tejido bombardeado de <i>Nicotiana tabacum</i> var. Petite Havana.	60
Figura 26. Observación de los primeros brotes y tejido clorótico cinco semanas posteriores a la transformación.	61
Figura 27. Rondas de selección de explantes transformados.....	63
Figura 28. Regeneración de plantas <i>N. tabacum</i> var. Petite Havana transformadas.	65
Figura 29. Análisis de integración por PCR de pRCY-2.....	66
Figura 30. Análisis de integración por PCR de pRCY-1.....	67
Figura 31. Traspaso y aclimatación de plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> var. Petite Havana.....	68
Figura 32. Desarrollo de plantas transformadas en Invernadero.....	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Origen de los diferentes tipos de biomasa.	3
Tabla 2. Especies de plantas transformadas a nivel cloroplasto.	20
Tabla 3. Celulasas expresadas en tabaco.	29
Tabla 4. Efectos pleiotrópicos mostrados por plantas de tabaco transformadas a nivel de cloroplasto.....	32
Tabla 5. Explantes NtcppRCY-1 y NtcppRCY-2 obtenidos durante las rondas de selección.	64

Lista de abreviaciones

g	Gramo	<i>mfc</i>	Gen de la celulasa multifuncional
mg	Miligramo	<i>Cel9A</i>	Celulasa de la familia 9 de las glicosil hidrolasas
µg	Microgramo	CD	Dominio catalítico
ng	Nanogramo	CBM	Módulo de unión a carbohidratos
M	Molar	NCBI	National Center for Biotechnology Information
mM	Milimolar	LB	Luria Bertani
aadA	Aminoglucósido adenililtransferasa	3''- UACH	Universidad autónoma de Chihuahua
L	Litro	CMC	Carboximetilcelulosa
LB	Luria-Bertani	ATP	Adenosín trifosfato
mL	Mililitro	VIH-1 ^{Nef}	Proteína Nef del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
µL	Microlitro	PHB	Polihidroxibutirato
µM	Micromolar	A27L	Proteína A27L del virus vaccinia
h	Hora	TSP	Proteína total seca
min	Min	LSC	Región larga de una sola copia
s	Segundo	SSC	Región corta de una sola copia
°C	Grado Celsius	(IRA/IRB)	Región de repetidos invertidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	RNA	Ácido ribonucleico
pb	Pares de bases		
D.O.	Densidad óptica		
rpm	Revoluciones por min		
nm	Nanómetros		
CDB	Dominio de unión a carbohidratos		

RESUMEN

La producción de enzimas recombinantes a partir de la transformación plasmídica utilizando plantas de tabaco como biorreactores, ha emergido por su capacidad de producir proteínas a gran escala. La transformación genética del cloroplasto se ha ido implementando y desarrollado abriendo diversas áreas en las que destaca la agricultura, biocombustibles y farmacéutica. La producción de proteínas recombinantes para el uso humano por medio de biorreactores “verdes” tiene muchas ventajas como nulos efectos de posición, la ausencia de efectos epigenéticos y la posibilidad de contener los transgenes. En esta investigación se reportan las condiciones para generar dos líneas genéticamente modificadas de *N. tabacum* a partir de la inserción de genes en el genoma de cloroplasto utilizando el vector pRCY-1 que contiene el gen de *Cel9A* que codifica para una endoglucanasa de *Phanerochaete chrysosporium* y pRCY-2 que contiene el gen *mfc* que codifica para una celulasa multifuncional proveniente de *Ampullaria crossean*. Ambos transgenes están dirigidos por el promotor *rrn* (del operon ARN) que contiene un terminador *rbcL* y un gen de resistencia *aadA* a espectinomicina/estreptomicina, además de las regiones de recombinación homóloga para cloroplasto de tabaco *rrn16S/3'rps12* dirigido hacia la región de repetidos invertidos. La transformación se llevó a cabo a partir de hojas de tabaco por la técnica de biobalística obteniendo brotes a la quinta semana del bombardeo en medio suplementado con espectinomicina, posteriormente los callos obtenidos se sometieron a tres rondas de selección. De las plantas en tercera selección se eligió una línea para cada uno de los genes y se realizaron análisis de integración mediante primers específicos confirmando la integración plastidal en las plantas de tabaco. El sistema descrito en este proyecto puede ser utilizado como base para el mejoramiento genético de plantas de tabaco en la producción de enzimas hidrolíticas para la obtención de biocombustibles a partir de biomasa vegetal.



ABSTRACT

The production of recombinant enzymes from plastid transformation using tobacco plants as bioreactors has emerged due to their ability to produce proteins on a large scale. The genetic transformation of the chloroplast has been implemented and developed, opening up various areas in which agriculture, biofuels and pharmaceuticals stand out. The production of recombinant proteins for human use by means of "green" bioreactors has many advantages such as no positional effects, the absence of epigenetic effects and the possibility of containing the transgenes. This study reports the conditions to generate two genetically modified lines of *N. tabacum* from the insertion of genes in the chloroplast genome using the vector pRCY-1 that contains the *Cel9A* gene that encodes an endoglucanase from *Phanerochaete chrysosporium* and pRCY-2 that contains the *mfc* gene that codes for a multifunctional cellulase from *Ampullaria crossean*. Both transgenes are driven by the *rrn* promoter (from the RNA operon) that contains a *rbcL* terminator and a spectinomycin/streptomycin resistance gene *aadA*, in addition to the homologous recombination regions for tobacco chloroplast *rrn16S/3rps12* directed towards the region of inverted repeats. The transformation was carried out from tobacco leaves by the biolistic technique, obtaining shoots at the fifth week of bombardment in a medium supplemented with spectinomycin, subsequently the calli obtained were subjected to three rounds of selection. From the plants in the third selection, a line was chosen for each of the genes and integration analyzes were carried out using specific primers, confirming the plastidal integration in the tobacco plants. The system described in this project can be used as a basis for the genetic improvement of tobacco plants in the production of hydrolytic enzymes to obtain biofuels from plant biomass.

I. INTRODUCCIÓN

La era de los combustibles fósiles va en picada, junto a la gran huella de carbono que se ha generado. Aunado al aumento de la población mundial, la ciencia se ha visto en la necesidad de crear energías alternativas que satisfagan las necesidades actuales y que a su vez disminuya su efecto en el medio ambiente (Rodionova *et al.*, 2017). Es en esta parte donde la biotecnología verde juega un papel importante para la producción de biocombustibles a partir de residuos celulósicos provenientes de desechos agronómicos (Sims *et al.*, 2010).

El fitomejoramiento ha sido una práctica utilizada desde el inicio de la civilización con el fin de mejorar los cultivos para incrementar la productividad y maximizar los rendimientos multiplicando la producción de alimentos con el fin de satisfacer las necesidades humanas (Ceccarelli *et al.*, 2010). En la actualidad el mejoramiento vegetal a nivel genético, específicamente a nivel cloroplasto, es un sistema de expresión prometedor para la producción de proteínas recombinantes (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). La ingeniería genética de plástidos ofrece ventajas como: altos niveles de expresión transgénica, contención a través de la herencia materna y expresión multigénica en un solo evento de transformación (Kusnetsov, 2018).

Los cloroplastos se caracterizan por ser orgánulos semiautónomos, cada célula contiene aproximadamente 100 cloroplastos y cada cloroplasto contiene un alto número de copias agrupadas en nucleoides (~100 genomas), por tanto, la transformación de plástidos permite la introducción de miles de copias de transgenes por célula vegetal (Sims *et al.*, 2010). En los últimos años, el desarrollo de estrategias de expresión optimizadas ha dado un gran impulso a la explotación de plástidos en la agricultura molecular, obteniendo productos como: antígenos de vacunas, proteínas terapéuticas, antibióticos y enzimas (Ruhlman *et al.*, 2010).

La biotecnología en plantas ha estimulado la producción de enzimas recombinantes como exo-glucanasas, endo-glucanasas y β -glucosidasas. Dichas enzimas son obtenidas de información genética de organismos con la capacidad de degradar la biomasa celulósica e insertarla dentro del material genético cloroplastídico (Juturu y Wu, 2014). Esto permite sobreexpresar enzimas hidrolíticas capaces de degradar biopolímeros complejos



de la pared celular para permitir que la glucosa, sea utilizada como fuente de energía para la producción de bioetanol, considerada una fuente de energía renovable (Garvey *et al.*, 2014). En las últimas décadas, el incremento de la población a nivel mundial ha aumentado las exigencias energéticas, por lo que se ha obligado a una transición en el uso de energías fósiles a energías renovables (Hackenberg y Cerrillo, 2008).

Actualmente los biocombustibles representan el 3% del suministro mundial de combustibles y se espera que para el 2050 representen hasta un 9% (Calviño y Messing, 2012; Payne *et al.*, 2019). La generación de combustibles a través de la utilización de biomasa no alimentaria, como las plantas de tabaco, representa una ventaja ya que se ha reportado una sobreexpresión de enzimas recombinantes de hasta 72% de proteína total soluble (Ruhlman *et al.*, 2010) en comparación a las cantidades producidas por los propios organismos (Madanala *et al.*, 2015). El tabaco es el cultivo no alimentario más popular en el mundo (cultivado en más de 120 países) y hasta el momento es el cultivo estándar utilizado para la transformación plastidal (Barla y Kumar, 2019). Este trabajo tiene como objetivo generar dos líneas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Petite Havana) genéticamente modificadas a nivel cloroplasto con el gen *Cel9A*, de *Phanerochaete Chrysosporium* que codifica para una endoglucanasa, y el gen *mfc* de *Ampullaria crossean*, que codifica para una celulasa multifuncional, con el fin de aportar un modelo base dirigido hacia la producción de enzimas recombinantes para la producción de energías alternativas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Biocombustibles

Se le conoce como biocombustible a cualquier tipo de combustible derivado de una masa orgánica denominado biomasa (Tabla 1) (Serna *et al.*, 2011), la cual, al someterse a un tratamiento químico o biológico, genera diversos productos que pueden ser utilizados como energía (Callejas y Quezada, 2009). Los materiales lignocelulósicos como residuos agrícolas (paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz), productos forestales (madera dura y blanda) y cultivos específicos son fuentes renovables de energía (Kumar *et al.*, 2009). Estas materias primas son suficientemente abundantes y su conversión de biomasa lignocelulósica a biocombustibles tiene diversas ventajas como minimizar el impacto del cambio climático, contribuir al control de contaminantes del aire, manejo de desperdicios, disminuir la dependencia a combustibles fósiles y disminuir la emisión de gases de efecto invernadero (Stephen y Periyasamy, 2018).

Tabla 1. Origen de los diferentes tipos de biomasa (González y Castañeda, 2008).

Biomasa	Origen
Primaria	Organismos fotosintéticos y dentro de estos se clasifican los residuos agrícolas y forestales.
Secundaria	Organismos heterótrofos utilizando la biomasa primaria.
Terciaria	Seres que se alimentan de la biomasa secundaria.
Natural	Ecosistemas silvestres.
Residual	Residuos agrícolas, por las actividades humanas.
Cultivos energéticos	Son cultivos cuyo propósito es generar biomasa para producir directamente biocombustibles.

El primer paso para convertir las materias primas lignocelulósicas en bioetanol es el proceso de sacarificación el cual consiste en hidrolizar la celulosa y dividirla en glucosa y otros tipos de azúcar (Romero, 2010). Existen tres métodos para extraer azúcares a partir de biomasa vegetal: la hidrólisis con ácidos concentrados, hidrólisis con ácidos diluidos y

la hidrólisis enzimática. Las complejas estructuras de la celulosa se van fragmentando por hidrólisis con ácidos concentrados a baja temperatura, con ácidos diluidos a alta temperatura o mediante procesos enzimáticos hasta obtener una solución que contiene azúcares fermentables, como glucosa, celobiosa o xilosa. La última etapa del proceso consiste en la fermentación anaeróbica de las disoluciones azucaradas para transformarlas en etanol y dióxido de carbono como se muestra en la Figura 1 (Hackenberg y Cerrillo, 2008; Sánchez *et al.*, 2010).

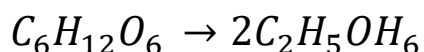


Figura 1. Reacción química para la producción de etanol y CO₂ a partir de celulosa

(Romero, 2010).

La reacción para la producción de bioetanol es exotérmica (25.5 kcal) y permite obtener como máximo 0.51 kg de alcohol por kg de azúcar fermentado, el resto se libera como dióxido de carbono (Romero, 2010). En la Figura 2 se puede observar el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica y sus pasos específicos.



Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica

(Romero, 2010).

Voloshin *et al.* (2016) informaron que en el año 2013 la energía obtenida a partir de biomasa alcanzó cerca del 9% de toda la energía consumida en el mundo. En México, en el año 2006, se inició la construcción de dos plantas de tratamiento para la producción de bioetanol en el estado de Sinaloa a cargo de la empresa Destilmex S. A. de C. V., tomando como base la producción de maíz que se genera en la región. Estas dos plantas lograrían asimilar alrededor de 335 mil toneladas de maíz y sorgo (Serna *et al.*, 2011). Esto abre una puerta al campo de los biocombustibles producidos a partir de la degradación de biomasa celulósica (Voloshin *et al.*, 2016). A nivel nacional, los recursos y tecnologías disponibles actuales para la generación de etanol a gran escala se ven limitadas a la producción de bioenergéticos de primera generación, esto quiere decir que se restringe a aquellos cultivos en plantas procesadoras o biorrefinerías y los procesos son mediante fermentaciones enzimáticas de azúcares (Becerra-Pérez, 2009).

2.2 Celulosa

La celulosa es una fuente de carbono abundante en la tierra ya que se encuentra en la pared celular de vegetales, frutas, hortalizas y cereales, siendo el componente principal, junto con la hemicelulosa y la lignina (Figura 3) (Gómez-Romero *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2007). Wyman *et al.* (2005) reportaron que la biomasa vegetal tiene un contenido entre 40 a 50% de celulosa, 25 a 35% de hemicelulosa y de 15 a 20% de lignina, además de una cantidad pequeña de minerales, aceites, azúcares solubles y otros componentes (Wyman *et al.*, 2005). La celulosa es utilizada ampliamente en las industrias manufactureras de textiles, productos farmacéuticos, bebidas energéticas y azúcar industrial (Gopi *et al.*, 2019).

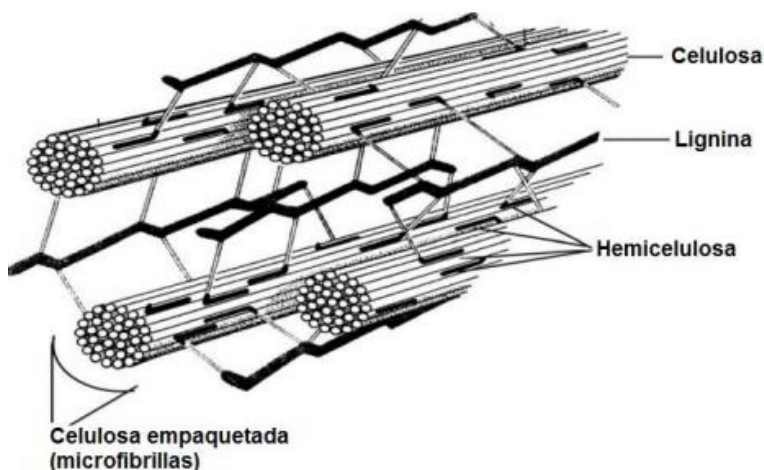


Figura 3. Localización y disposición de los principales componentes poliméricos en las paredes celulares vegetales (Murphy y McCarthy, 2005).

La biomasa vegetal son los residuos más abundantes que produce nuestra sociedad en forma de madera, desechos municipales, en la industria textil, agricultura, hierbas, desechos forestales y procesamiento de alimentos. Aunque estos desechos no son tóxicos, si se considera que la acumulación de estos productos representa un deterioro del ecosistema y una pérdida de materia prima (Jung *et al.*, 2013; Kashyap *et al.*, 2001; Petersen y Bock, 2011; Sánchez *et al.*, 2010) ya que la limitante se origina en la disponibilidad de los monómeros de glucosa que componen su estructura para poder ser utilizados como fuente de energía y esto ocasiona que el aprovechamiento de sus productos sea relativamente bajo (Voiniciuc *et al.*, 2018).

Los residuos agroindustriales han sido motivo de diversos estudios ya que gran parte de los elementos que lo conforman pueden ser implementados como materia prima para generar bioenergéticos reduciendo el impacto en la utilización de combustibles fósiles (Mejias-Brizuela *et al.*, 2016). Con el fin de aprovechar esta materia prima se han realizado diversas investigaciones dirigidas hacia la producción de enzimas con aplicación industrial como celulasas (Alcarraz-Curi *et al.*, 2010; Sukumaran *et al.*, 2005), pectinasas (Castilho *et al.*, 2000; Kashyap *et al.*, 2001), xilanasas (Bhalla *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2006), proteasas (Vijayaraghavan *et al.*, 2012), lipasas (Dutra *et al.*, 2007) y hemicelulasas (Kang *et al.*, 2004).

2.2.1 Conformación de la celulosa

La celulosa es un biopolímero que está compuesto por residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,4 que forman una cadena lineal y su fórmula química es representada como: $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Li *et al.*, 2009). Este compuesto es el producto primario formado a partir de la fotosíntesis (Murphy y McCarthy, 2005) y tiene la capacidad de formar cadenas largas de hasta 15,000 unidades por lo que es considerado un sustrato insoluble (Bacete *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Se ha reportado que la celulosa comprende alrededor de un 35% a un 50% del peso seco de las plantas (Joshi *et al.*, 2011), aunque también es posible encontrar este biopolímero en algunas bacterias y en una amplia diversidad de algas (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

El polímero lineal de glucosa forma una estructura similar a una cinta plana que es soportada por fuerzas de Van der Waals, así como por enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares que le proporcionan una estructura cristalina y amorfa (Figura 4) (Brown *et al.*, 1996; Festucci-Buselli *et al.*, 2007). Las regiones cristalinas se caracterizan por que las cadenas se encuentran en forma ordenada, en donde las alineaciones pueden formar estructuras en zigzag y así prevenir la entrada de otras moléculas, esta es una de las razones por la que es resistente a la hidrólisis (Voiniciuc *et al.*, 2018). En las regiones amorfas, las cadenas se encuentran de manera desordenada o enredadas dentro de las regiones cristalinas y se pueden encontrar plegamientos o espacios donde las enzimas celulolíticas pueden ser introducidas para comenzar el proceso de hidrólisis como se muestra en la Figura 5 (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Juturu y Wu, 2014).

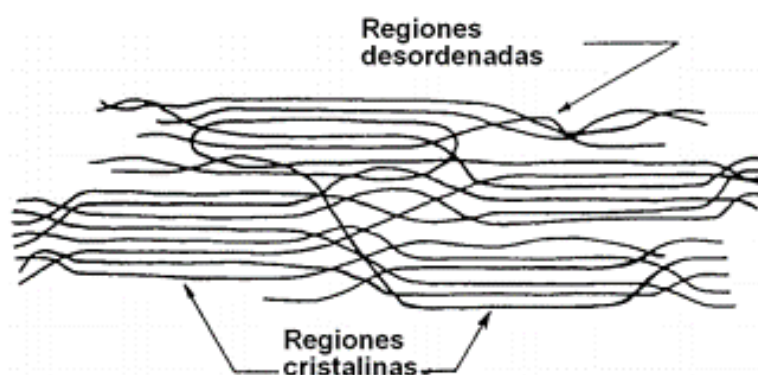


Figura 4. Representación de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa (Murphy y McCarthy, 2005).

2.3 Celulasas

Las celulasas son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los puentes glucosídicos que se encuentran entre dos o más hidratos de carbono. Dentro de las celulasas encontramos tres tipos, las exo- β -1,4-glucanasa, que se encargan de romper los enlaces más cercanos a los extremos del biopolímero y pueden producir glucosa o celobiosa, las endo- β -1,4-glucanasas, que cortan al azar los enlaces internos de la celulosa amorfa liberando cadenas de diversos tamaños (Alcarraz-Curi *et al.*, 2010) y las β -1,4-glucosidasas, que cortan la celobiosa para liberar moléculas de glucosa (Figura 5) (Wei *et al.*, 2009). Para que la hidrólisis de la celulosa sea eficiente es necesario que los tres tipos de celulasas actúen en sinergia atacando distintas regiones de la celulosa y así la degradación sea más rápida (Juturu y Wu, 2014).

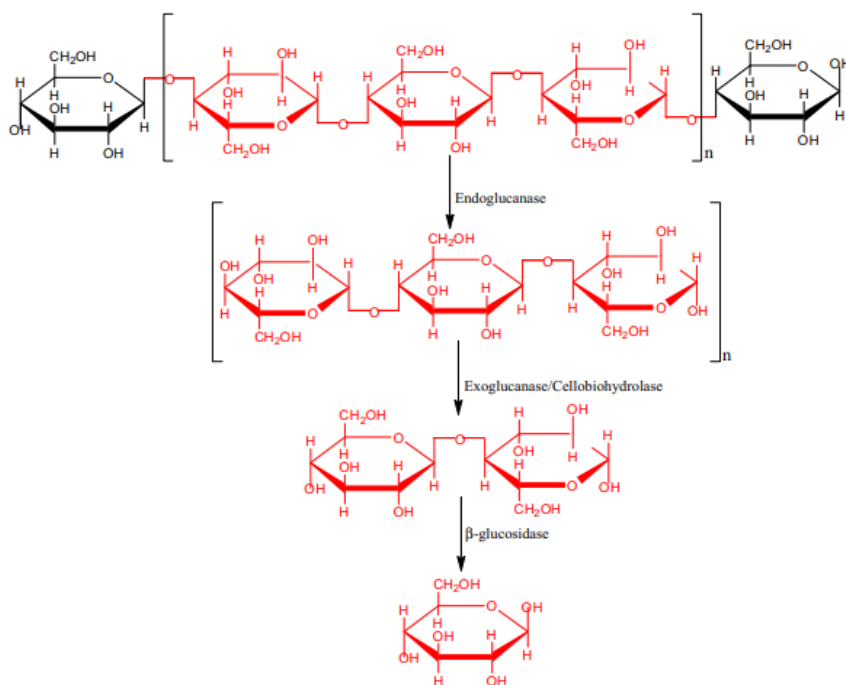


Figura 5. Estructura de la celulosa y mecanismo de acción de las celulasas.

En color negro se representa la celulosa amorfa y en rojo la celulosa cristalina. El diagrama representa los sitios de acción de las celulasas para liberar las moléculas de glucosa (Juturu y Wu, 2014).

Es posible efectuar un tratamiento previo a desechos vegetales ya sean tratamientos físicos, químicos o biológicos para que la celulosa sea más accesible. Estos pretratamientos cambian la estructura de la biomasa lignocelulósica y su composición

rompiendo la hemicelulosa y la lignina que rodean a la celulosa (Figura 6) (Johar *et al.*, 2012; Mosier *et al.*, 2005). Se ha empleado por décadas el tratamiento de hidrólisis ácida para la solubilización de hemicelulosa y el tratamiento de hidrólisis alcalina para remover lignina. Ambos tratamientos son eficientes y su costo no es elevado, pero se considera que su impacto al medio ambiente es alto ya que genera compuestos químicos que pueden ser de riesgo ambiental o que pueden inhibir la actividad de los microorganismos hidrolíticos (Bacete *et al.*, 2018). Es por esto que la hidrólisis mediante enzimas hidrolíticas procedentes de distintos organismos se ha visto con mayor ventaja en el tratamiento de material celulósico (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Algunos organismos que se han reportado como fuente de enzimas son: *Phanerochaete Chrysosporium* (Escudero *et al.*, 2013), *Laetiporus sulphureus*, (Sánchez *et al.*, 2010), *Trichoderma viride* (Gautam *et al.*, 2010), *Trichoderma reesei* (Jones y Vasudevan, 2010), *Penicillium pinophilum*, *Cellulomonas* sp. (Yin *et al.*, 2010), *Cellvibrio* sp. (Christopherson *et al.*, 2013) y *Thermomonospora* sp. (Kuhad *et al.*, 2011).

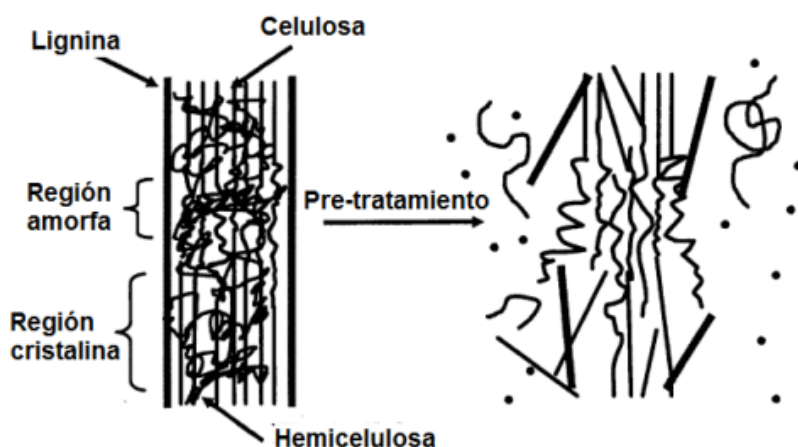


Figura 6. Disposición de las regiones de la celulosa y efecto del pretratamiento en la matriz de hemicelulosa y lignina (Mosier *et al.*, 2005).

2.3.1 Estructura general de las celulasas

Tilbeurgh *et al.*, (1986) realizaron un estudio utilizando una celulasa de *Trichoderma reesei* y descubrieron que la enzima contaba con un dominio catalítico (CD) que respondía a la hidrólisis de la celulosa, y un dominio de unión a celulosa (CBD) que mediaba la unión

de la enzima a la celulosa. Fue a partir de esos estudios que se comenzaron a describir a las celulasas como proteínas modulares, conformadas por un dominio de unión a la celulosa (CBD), un dominio catalítico (CD) y una región enlazadora entre dominios (Tilbeurgh *et al.*, 1986). El dominio catalítico se encarga de hidrolizar mientras que el dominio de unión a celulosa lleva a cabo tres funciones: una unión a zonas ricas de su sustrato por medio de su afinidad a carbohidratos, mantenimiento de la atracción entre la enzima y el sustrato, así como una función disruptiva, en donde expone las cadenas del biopolímero para que el dominio catalítico lleve a cabo la hidrólisis del sustrato (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Sugimoto *et al.*, 2012). La actividad de hidrólisis de la celulosa generalmente depende del dominio CBD, que podría unirse en la matriz de celulosa y respaldar el dominio catalítico para ejercer su capacidad de degradación de la celulosa (Bacete *et al.*, 2018). En endoglucanasas se ha reportado que el dominio de CBD se une a los sustratos celulósicos mediante una interacción entre los aminoácidos aromáticos (Try, Phe y Tyr) en el dominio de CBD y la unidad de anillo de glucosa de las moléculas de celulosa (Kormos *et al.*, 2000; Ohmiya *et al.*, 1997).

2.3.2 Hidrólisis del enlace glucosídico, mecanismo de acción.

Las celulasas llevan a cabo la hidrólisis del enlace glucosídico (β -1,4) entre las glucosas que componen la celulosa a través de la acción de dos residuos catalíticos localizados en el centro activo, uno de ellos actúa como nucleófilo o base y el otro como donador de protones (Chen *et al.*, 2014).

El enlace glucosídico puede ser hidrolizado de dos formas distintas (Figura 7), esto depende de la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis: La primera es que su configuración anomérica cambie, a esta reacción hidrolítica se le llama mecanismo de inversión, donde la distancia de separación de los dos residuos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración de enlace la separación es de 5 Å (Rye y Withers, 2000). El mecanismo de inversión sucede en una sola etapa en un proceso catalítico de ácido-base, esto quiere decir que uno de los dos residuos catalíticos opera como base, lo cual facilita el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico, y el residuo ácido ayuda a la separación del oxígeno (Davies y Henrissat, 1995; Juturu y Wu, 2014). La segunda forma en la que el

enlace puede ser hidrolizado es cuando la configuración anomérica se mantiene, a esto se le denomina mecanismo de retención. Dicho mecanismo se lleva a cabo en dos desplazamientos en donde el residuo nucleofílico ataca al carbono anomérico generando un producto con estereo química opuesta al sustrato (Henrissat, 1991; Wilson, 2011).

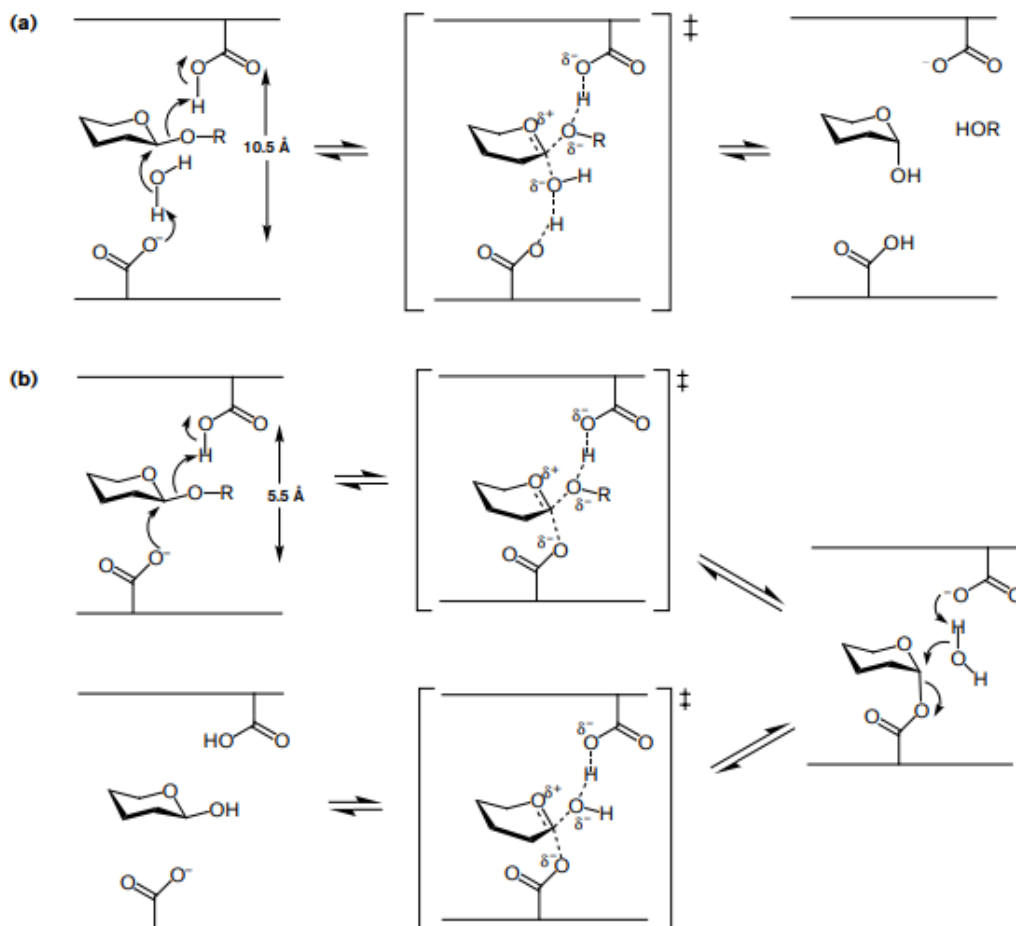


Figura 7. Mecanismo general de hidrólisis de enlace glucosídico.

Reacción catalizada por los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de las glicosil hidrolasas. (a) Mecanismo de inversión (b) Mecanismo de retención (Henrissat, 1991).

2.4 Producción de celulasas por organismos.

Para hidrolizar eficientemente la celulosa es necesario utilizar enzimas hidrolíticas, las cuales se pueden obtener de manera comercial, en forma única o en cocteles, producidos por hongos filamentosos o bacterias (Saranraj *et al.*, 2012). Desde hace más de 30 años se han comercializado celulasas de hongos filamentosos que han sido de gran utilidad

para la industria de alimentos, papelería, textil y cervecera (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Juturu y Wu, 2014; Wilson, 2011). Las enzimas fúngicas más utilizadas a nivel industrial provienen de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus niger* mientras que las enzimas bacterianas más comunes provienen de *Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp. y *Clostridium thermocellum* y *Bacillus subtilis* (Guevara-Hernández *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2010).

Debido a que la celulosa es una fuente rica en carbono, diversos organismos desarrollaron la capacidad de degradar este compuesto para producir energía (Immanuel *et al.*, 2006). Estos organismos son una importante fuente de enzimas con la capacidad de procesar eficientemente biopolímeros como la celulosa, rompiendo los enlaces que mantienen unidas a las cadenas de carbohidratos (Wei *et al.*, 2009). En la literatura se han reportado insectos, moluscos, hongos, nematodos y protozoos que producen enzimas con actividad celolítica, sin embargo, los organismos más estudiados han sido una diversa variedad de bacterias y hongos los cuales son considerados de importancia biotecnológica en la bioconversión de algunos desechos con un alto contenido de celulosa (Guevara-Hernández *et al.*, 2013; Wilson, 2011).

Cabe destacar que la producción de enzimas comerciales derivadas de microorganismos tienen un costo muy alto ya que la producción de estas enzimas, al producirse en condiciones muy específicas pueden afectar la expresión del metabolito de interés (medio de cultivo, sustrato, temperatura y pH) (González y Castañeda, 2008; Sánchez *et al.*, 2010). Debido a que las nuevas industrias productoras de bioenergéticos requieren cantidades inmensas de enzimas eficientes y a un precio más rentable, se ha generado la necesidad de investigar otros organismos con la capacidad de degradar biomasa de lignocelulosa para la sobreexpresión de enzimas (Kuhad *et al.*, 2011)

2.4.1 Celulasa multifuncional (EGX) de *Ampullaria crossean*

A. crossean es un molusco perteneciente a la familia de los gastrópodos *Ampullariidae* (NCBI Taxonomy ID: 228791) que habita áreas tropicales y subtropicales en el sur de China, así como en Sudamérica. Este organismo captó la atención de los investigadores debido a su capacidad de degradar compuestos celulósicos (Guo *et al.*, 2008). Entre los compuestos que degrada *Ampullaria crossean* se encuentran el arroz, algas, suculentas, plántulas, entre otras plantas frondosas (Li *et al.*, 2009). *A. crossean* es considerado una

especie invasiva, que ha causado pérdidas económicas en China debido a su capacidad de digerir materiales celulósicos como cultivos de arroz (Yin *et al.*, 2011). Diversos estudios se han realizado para entender el mecanismo de degradación de celulosa de *Ampullaria crossean* y de alguna manera aprovechar estas cualidades para su uso en diversas industrias como en la alimenticia, textil y bioenergética.

Wang *et al.* (2003), caracterizaron por primera vez una enzima en el jugo gástrico de *A. crossean*, la cual resultó tener diferentes actividades enzimáticas al someter la enzima a diversos sustratos. En su estudio, se encontró que la enzima tenía actividad exo- β -1,4-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y endo- β -1,4-xilanasas (Ding *et al.*, 2008). Al trabajar con el tejido estomacal lavado de *A. crossean* encontraron que la enzima era producida propiamente por el molusco y no por un microorganismo que viviera en simbiosis en el estómago del caracol. De acuerdo a estos estudios, se propuso que la celulasa multi funcional, pertenecía a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (Wang *et al.*, 2003). Esta familia de enzimas se caracteriza por hidrolizar el enlace glucosídico en un mecanismo conocido como doble desplazamiento en el cual se utilizan dos residuos de ácido glutámico, uno actúa como nucleófilo y el otro como ácido (Chen *et al.*, 2014).

Debido a las características multi funcionales de la enzima, producida por el gen denominado *mfc*, se han realizado diversos estudios para su producción como enzima recombinante. La celulasa multi funcional (EGX) de *A. crossean*, es producida en cantidades mínimas, por lo tanto, no tiene una aplicación industrial (Cheng *et al.*, 2009). Por esta razón se ha optado por hacer uso de la ingeniería genética y expresar esta proteína recombinante en otros organismos como *Pichia pastoris* (Wang *et al.*, 2003) en donde se clonó de manera eficiente y se expresó de manera estable sin perder ninguna de sus actividades enzimáticas. Guo *et al.* (2016) expresaron el gen *mfc* en *Volvariella volcacea* obteniendo una expresión en las líneas transformadas menor a lo esperado. Ellos concluyeron que probablemente el gen *mfc* es un gen que produce una enzima inducible cuya actividad puede incrementarse en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y en diferentes condiciones de cultivo (Guo *et al.*, 2016).

Chávez *et al.* (2013) optimizó la secuencia de el gen *mfc* para expresión en cloroplastos de tabaco donde clonó y caracterizó el gen sintético en *E. coli* DH5 α , en su

trabajo obtuvieron una actividad celulolítica satisfactoria en tiempos menores a los esperados (entre 167 a 360 h) mediante la utilización de medio LB y CMC 1%.

Posteriormente este gen optimizado fue utilizado por Gómez-Torres *et al.* (2018) en donde identificó la estructura tridimensional utilizando el software UCSF® Chimera de la proteína recombinante y mediante la utilización de diversos sitios web identificó el sitio activo de la de la proteína recombinante (Glu¹⁷² y Glu²⁷³) con actividad multifuncional de exo- β -1,4-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y endo- β -1,4-xilanasas, de igual manera identificaron las condiciones óptimas de la proteína siendo a una temperatura de 65°C, a un pH de 5.0.

2.4.2 Endoglucanasa de *Phanerochaete chrysosporium*

P. Chrysosporium pertenece al grupo de los basidiomicetos, está dentro de la Familia Corticiaceae y es uno de los hongos causantes de la pudrición blanca. Este hongo ha sido ampliamente estudiado en la biotecnología ya que se han analizado sus mecanismos de acción por sus diferentes enzimas capaces de degradar la pared vegetal principalmente en la degradación de la lignina (Zeng *et al.*, 2013) y este conjunto de enzimas representan un 12% de las proteínas totales secretadas por este hongo (Monroy-Licht, 2016). Algunas de sus características principales es que en su ambiente natural puede soportar un rango amplio de temperatura, pH y humedad (Monroy-Licht, 2016; Singh y Chen, 2008). Su temperatura óptima se encuentra entre 37°C hasta los 39.8°C y actúa de manera eficiente a un pH de 3.5 a 5 (Singh y Chen, 2008). Una de las desventajas de la producción de este hongo es que las cantidades en las que produce las enzimas son reducidas por lo que se ha utilizado la tecnología recombinante para sobre expresar las enzimas y hacer uso de ellas en diversos estudios (Coconi-Linares *et al.*, 2014; Monroy-Licht, 2016; Zeng *et al.*, 2013).

El gen *Cel9A* de *P. Chrysosporium* codifica para una enzima reportada por Wymelenberg *et al.* (2002), donde reportaron su actividad enzimática de endoglucanasa. Rudsander *et al.*, (2003) realizaron un estudio comparando las secuencias de tres celulasas pertenecientes a la Familia 9 de las glicosil hidrolasas. Estas enzimas tienen estructuras modulares versátiles y diferentes topologías de sitios activos que conducen a diferentes acciones sobre los sustratos celulósicos. El análisis de secuencia de los ADNc

correspondientes a clones de longitud completa de *Populus tremula* x *Populus tremuloides* *Cel9A* y *Populus tremula* x *Populus tremuloides* *Cel9B* indicaron que ambas enzimas tienen un módulo catalítico de la familia GH9. En este estudio encontraron, que el gen *Cel9A* tiene un ancla de membrana N-terminal e identificaron que la celulasa GH9 en el hongo filamentoso no tiene CBM pero, en contraste a las celulasas microbianas, contiene una región transmembrana C-terminal (Rudsander *et al.*, 2003).

Chávez *et al.* (2013) optimizó la secuencia de el gen *Cel9A* para expresión en cloroplastos de tabaco donde clonó y caracterizó el gen sintético en *E. coli* DH5 α , en su trabajo obtuvieron una actividad celulolítica satisfactoria en tiempos menores a los esperados (entre 167 a 360 h) mediante la utilización de medio LB y CMC 1%.

Futuras investigaciones sobre la expresión de los genes *mfc* de *A. crossean* y *Cel9A* de *P. Chrysosporium* en otros organismos podrían ser beneficiosas para la industria. A pesar de que se ha encontrado que la producción de enzimas por estos organismos no es suficiente para su aprovechamiento industrial, la aplicación de ingeniería genética para la expresión de estas enzimas recombinantes podría solventar esta problemática.

2.5 Ingeniería genética en plantas

Durante muchos años, el genoma nuclear de las plantas ha sido un objetivo para la ingeniería genética para producir biorreactores, además, las plantas modificadas han emergido como una de las plataformas escalables más prometedoras para la producción de proteínas (Xu *et al.*, 2015). El objetivo principal ha sido generar grandes cantidades de proteínas útiles que puedan satisfacer las necesidades de una población en crecimiento que se prevé supere los nueve mil millones de personas para 2050 (Béné *et al.*, 2015). Las plantas que producen vacunas, anticuerpos, alimentos fortificados, plantas con rasgos agronómicos útiles como la resistencia a plagas y enfermedades, y plantas con componentes de bajo contenido de paredes celulares están actualmente en desarrollo para las industrias farmacéutica, agrícola y energética (Daniell *et al.*, 2009). La transformación nuclear ha hecho posible la obtención de plantas modificadas que reduzcan los costes de producción de las proteínas de interés; sin embargo, esto también conduce a problemas de bioseguridad (Meyers *et al.*, 2010). Las plantas transformadas pueden hibridarse con

parientes silvestres, permitiendo que los transgenes se dispersen sin control (Dively *et al.*, 2020). Estas observaciones son propicias para la búsqueda de nuevas estrategias que puedan reducir o eliminar el impacto ambiental, y aquí es donde la transformación de cloroplasto hace su contribución (Adem *et al.*, 2017). Tal vez desde un punto de vista público y ecológico, la contención genética es la ventaja más notable que ofrece la transformación de cloroplasto. Sin embargo, otras ventajas incluyen el alto nivel de expresión proteica producida por plantas transformadas sin silenciamiento genético, ingeniería multigénica y la capacidad de eliminar los efectos de posición (Bock, 2015; Ruhlman *et al.*, 2010).

2.6 Cloroplasto

El cloroplasto es un organelo que se encuentra en organismos fotosintéticos como plantas y algas. Estos organelos son los encargados de proveer energía química a la planta mediante la transformación de energía solar (Adem *et al.*, 2017; Izumi *et al.*, 2017). Algunas características importantes de este organelo es que contiene su propio código genético, además, posee una doble membrana, que, según la teoría endosimbiótica, fue el resultado de la unión de una cianobacteria por una célula eucariota hace más de 1.2 billones de años (Bobik y Burch-Smith, 2015; Jin y Daniell, 2015).

La función principal del cloroplasto es la fotosíntesis, pero también tiene la función de sintetizar algunos ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos, fitohormonas, vitaminas, almidón y algunos metabolitos. Estos metabolitos pueden interactuar con el medio ambiente en modo de respuesta a estímulos como el calor, deshidratación, exceso de luz, etc. El cloroplasto es una maquinaria metabólica completa que sostiene la vida en la tierra transformando la luz solar en carbohidratos liberando oxígeno (Daniell *et al.*, 2016; Tiller y Bock, 2014) .

Durante la evolución de las células vegetales, existió un intercambio de información genética en la endosimbiosis por medio de la cianobacteria y el núcleo de la célula huésped en donde cerca de 3,000 genes del cloroplasto fueron incorporados al núcleo celular de las plantas. Sin embargo, un casete específico de alrededor de 120 genes fueron retenidos por los cloroplastos (Tiller y Bock, 2014), y estos genes han permanecido conservados en mayor grado que en el genoma nuclear (Jin y Daniell, 2015).

2.6.1 El genoma del cloroplasto, plastoma

El genoma del cloroplasto o “plastoma”, consta de una cadena doble de ADN. Esta doble cadena se divide en cuatro regiones: dos copias de Repetidos Invertidos (IRA/IRB) las cuales están separadas por dos regiones, una sección corta de una sola copia (SSC) y una zona larga de una sola copia (LSC) (Maliga, 2004; Xu *et al.*, 2015). El tamaño del genoma en plantas verdes puede ir de 120 a 250 kb conteniendo aproximadamente 120 genes. Estos genes pueden ser clasificados en tres grupos altamente conservados: genes que codifican para la formación del aparato fotosintético, genes que codifican los componentes del sistema genético y genes que codifican otras funciones. (Daniell *et al.*, 2016). Debido a que el genoma plastídico es de origen procariota, tiene la capacidad de utilizar operones para la expresión de diversos genes externos bajo un solo promotor, brindando una ventaja dentro de la ingeniería genética ya que se pueden integrar genes externos al genoma mediante recombinación homóloga (Longoni *et al.*, 2015). Una célula típica de una hoja contiene entre 1,000 y 2,000 plastomas y aproximadamente 100 cloroplastos (Adem *et al.*, 2017; Svab y Maliga, 1993).

Shinozaki *et al.* (1986) secuenciaron el primer genoma cloroplastídico de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow 4). Años más tarde, Wakasugi *et al.* (1998) actualizaron un mapa circular de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana (Figura 8) en donde mostraron que el tamaño del plastóma comprendía 155,939 pb. Además, encontraron que la región larga de una sola copia (LSC) consta de 86,686 pb, la región corta de una sola copia (SSC) consta de 18,571 pb y que las dos regiones de Repetidos Invertidos (IRA/IRB) poseen 25,341 pb cada una (Bock, 2015).

En su interior se acumulan alrededor de 3,000 proteínas para controlar el metabolismo del cloroplasto, y muchas de ellas están codificadas en el núcleo celular; muy pocas están codificadas en el propio cloroplasto (Farquhar *et al.*, 2011). Las proteínas producidas en el cloroplasto están codificadas por alrededor de 120 genes en un genoma de ~150 a 220 kb con estructura cuatripartita donde la característica particular en plantas superiores es la duplicación de una región grande (~ 25 kb) en una orientación invertida (IR) (Asaf *et al.*, 2016; Gruenstaeudl *et al.*, 2017; Leister, 2003) que proporcionan estabilidad genómica, por lo que requieren su mantenimiento para la evolución de los genomas del cloroplasto (Green, 2011; Kim *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2008). De los genes codificados en el genoma

del cloroplasto, alrededor de 47 genes, como *psb*, *psa*, *ycf3*, *ycf4*, *pet*, *atp*, *ndh* y *rbcl*, están involucrados en la formación del aparato fotosintético (subunidad PSII, subunidad PSI, ensamblaje PSI, complejo de citocromo b6f, subunidad de ATP-sintasa y subunidad del complejo de plastoquinona oxidorreductasa de cloroplasto NADPH). Más de 60 genes, como *trn*, *rrn*, *rpl*, *rps*, *rpo*, *matK*, *clpP* e *infA*, están involucrados en el sistema genético (tRNA, rRNA, proteínas ribosómicas, RNA-polimerasas, madurasas, proteasas caseinolíticas y factores de iniciación de la traducción). Algunos genes no están directamente involucrados en el proceso de fotosíntesis o en el sistema genético del cloroplasto, como *accD* (subunidad β de acetil-CoA-carboxilasa), *ccsA* (biogénesis del citocromo C) y *cemA* (proteína de la membrana de envoltura) (Green, 2011; Kusnetsov, 2018). Además, el genoma del cloroplasto tiene marcos de lectura abiertos hipotéticos, como *ycf1* (Tic214) e *ycf2*, presuntamente involucrado en funciones de importación de proteínas (de Vries *et al.*, 2015; Kikuchi *et al.*, 2018).

El genoma del cloroplasto se agrupa en nucleoides poliploides cuyo número varía con la edad del tejido: desde unos pocos en los plástidos meristemáticos hasta más de 30 en los cloroplastos maduros (alrededor de 20 a 750 nucleoides por célula) (Greiner *et al.*, 2020). Esta particularidad de aumentar el número de plastomas por célula a lo largo del tiempo y el hecho de que los genes en el cloroplasto pueden expresarse a partir de un solo operón (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016; Kusnetsov, 2018; Saxena *et al.*, 2014), son algunas de las razones por las que el genoma del cloroplasto es un objetivo de la biotecnología vegetal.

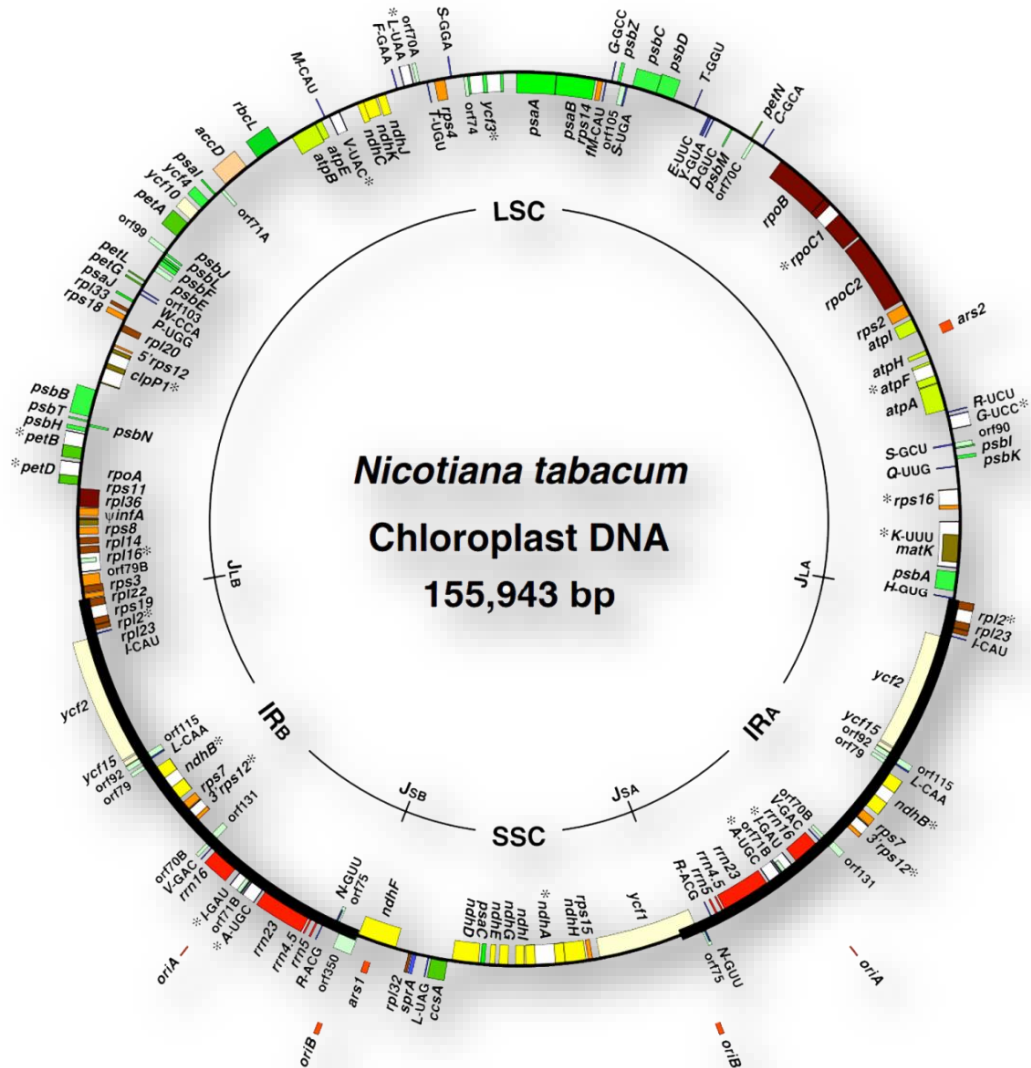


Figura 8. Mapa circular del plastoma de *Nicotiana tabacum*.

El tamaño del genoma es de 155,939 pb y consta de 86,686 pb de región de copia única grande (LSC) y 18,571 pb de región corta de una sola copia (SSC) y dos regiones de Repetidos Invertidos (IRA/IRB) de 25,341 pb cada una. Los genes que se muestran en el interior del círculo se transcriben en sentido de las manecillas del reloj y los genes del exterior se transcriben en sentido contrario. Los genes de los ARNt están representados por un código de una letra de aminoácidos con anticodón. Los asteriscos muestran genes que contienen intrones. Los marcos de lectura abiertos exclusivos del tabaco se muestran mediante orf más el número de codón (Wakasugi *et al.*, 1998).

2.7 Transformación genética de cloroplasto

Hasta la fecha se han reportado 4,891 genomas de cloroplasto de diversas especies en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Esta información permite analizar y manipular el genoma para insertar genes de interés biotecnológico y así aportar una solución a problemas que se han desarrollado a partir de la transformación nuclear tomando ventaja las cualidades de la transformación cloroplastídica para expresar las proteínas de una manera más eficiente y controlable.

La primera transformación de cloroplasto se llevó a cabo en el año de 1988 en *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1988) permitiendo posteriormente la modificación de diversas plantas superiores (Tabla 2) como tabaco, tomate, coliflor, alfalfa, *Arabidopsis*, zanahoria, algodón, berenjena, entre otras; pero hasta la fecha las plantas de tabaco son las especies estándar utilizadas en la transformación plastidal.

Tabla 2. Especies de plantas transformadas a nivel cloroplasto.

Familia	Especies	Nombre	Marcador de selección	Referencia
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Petit Havana, <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Nicotiana sylvestris</i>	Tabaco	<i>aadA</i>	(Davarpanah <i>et al.</i> , 2009; Maliga y Svab, 2010; Svab <i>et al.</i> , 1990; Svab y Maliga, 1993)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	<i>aadA</i>	(Ruf <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Desirée y línea 1607	Papa	<i>aadA</i>	(Sidorov <i>et al.</i> , 1999; Valkov <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Petunia hybrida</i> var. Pink Wave	Petunia	<i>aadA</i>	(Zubko <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Solanum melongena</i>	Berenjena	<i>aadA</i>	(Singh <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Capsicum annum</i> var. G4	Pimienta	<i>aadA</i>	(Kota <i>et al.</i> , 2019)
	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	<i>aadA</i>

Tabla 2. (Continuación)

Familia	Especies	Nombre	Marcador de selección	Referencia
	<i>Brassica napus</i>	Colza	<i>aadA</i>	(Hou <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Lesquerella fendleri</i>	Lesquerella	<i>aadA</i>	(Skarjinskaia <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	Coliflor	<i>aadA</i>	(Nugent <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	Repollo	<i>aadA</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Brassica napus</i> cv. FY-4	Colza	<i>aadA</i>	(Cheng <i>et al.</i> , 2010)
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. Coker310FR	Algodón	<i>aphA-6, nptII</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2004)
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> cv. Half long	Zanahoria	<i>aadA, badh</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2004)
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	Soja	<i>aadA</i>	(Dufourmantel <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Medicago sativa</i> cv. Longmu 803	Alfalfa	<i>aadA</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2011)
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> cv. Verónica, cv Flora y cv. Cisco	Lechuga	<i>aadA</i>	(Kanamoto <i>et al.</i> , 2006; Lelivelt <i>et al.</i> , 2005; Queiroz <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Artemisia annua</i>	Artemisa	<i>aadA</i>	(Kaushal <i>et al.</i> , 2020)
Salicaceae	<i>Populus alba</i>	Álamo	<i>aadA</i>	(Okumura <i>et al.</i> , 2006)
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha azucarera	<i>aadA</i>	(De Marchis <i>et al.</i> , 2008)
Plantaginaceae	<i>Scoparia dulcis</i>	Escobilla	<i>aadA</i>	(Muralikrishna <i>et al.</i> , 2016)
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	Melón amargo	<i>aadA</i>	(Narra <i>et al.</i> , 2018)
Funariaceae	<i>Physcomitrella patens</i>	Musgo	<i>aadA</i>	(Sugiura y Sugita, 2004)
Marchantiaceae	<i>Marchantia polymorpha</i>	Hepática	<i>aadA</i>	(Chiyoda <i>et al.</i> , 2007)

Tabla 2. (Continuación)

Familia	Especies	Nombre	Marcador de selección	Referencia
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> var. Japonica lineal 19 y Hwa-Chung	Arroz	<i>aadA</i> , <i>hpt</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2018)
Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	<i>aadA</i>	(Goldschmidt-Clermont, 1991)
Euglenaceae	<i>Euglena gracilis</i>	-	<i>aadA</i>	(Doetsch <i>et al.</i> , 2001)
Haematococcaceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	-	<i>aadA</i>	(Gutiérrez <i>et al.</i> , 2012)
Dunaliellaceae	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	-	<i>ereB</i>	(Georgianna <i>et al.</i> , 2013)
Porphyridiophyceae	<i>Porphyridium</i> sp. UTEX 637	-	<i>mahas</i> (W492S)	(Lapidot <i>et al.</i> , 2002)
Bangiaceae	<i>Pyropia yezoensis</i>	-	<i>cat</i>	(Kong <i>et al.</i> , 2017)
Cyanidiaceae	<i>Cyanidioschizon merolae</i>	-	<i>cat</i>	(Zienkiewicz <i>et al.</i> , 2017)
Phaeodactylaceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-	<i>cat</i>	(Xie <i>et al.</i> , 2014)
Monodopsidaceae	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	-	<i>ble</i>	(Gan <i>et al.</i> , 2018)
Isochrysidaceae	<i>Tisochrysis lutea</i>	-	<i>bar</i>	(Bo <i>et al.</i> , 2020)

Las plantas transformadas genéticamente ofrecen tecnologías para la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Algunas de las ventajas que ofrece la expresión de proteínas en plantas es su bajo costo de producción, la facilidad de escalamiento y la capacidad de expresión múltiple (Jin y Daniell, 2015; Xu *et al.*, 2015).

La transformación vía cloroplasto es una técnica que se caracteriza por su alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en plantas, la contención de genes ya que estos no se transmiten a través del polen y la falta de efectos de posición en el genoma por la integración definida mediante la recombinación homóloga (Castiglia *et al.*, 2016). La alta expresión de enzimas recombinantes se debe a que se lleva a cabo una transcripción, traducción y mecanismos de plegamiento de las proteínas independiente en cada plástido. (Longoni *et al.*, 2015; Madanala *et al.*, 2015).

Para el uso de las plantas como biorreactor en la transformación genética, las plantas de tabaco se consideran ideales, ya que producen una cantidad de biomasa alta y estas plantas no se mezclan en la cadena alimenticia (Leelavathi *et al.*, 2003; Madanala *et al.*, 2015). En la mayoría de las plantas, entre ellas la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*), el plastoma se hereda de madre a hija, por lo que la contaminación cruzada por polen no es un problema en la transformación de cloroplasto (Daniell *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2015).

La integración de un gen externo en el cloroplasto se lleva a cabo mediante la recombinación homóloga en un evento de transformación único sin tener efectos posicionales en comparación a la transformación nuclear, en la que la integración de los genes externos se lleva a cabo de manera aleatoria en el genoma nuclear (Longoni *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2010).

La mayoría de los genes plastídicos se agrupan en operones. Los cuales se transcriben como un ARN mensajero policistrónico. La traducción ocurre mediante un ribosoma similar al ribosoma bacteriano 70S con la ayuda del set iniciador de los procariotas y factores de elongación y terminación (Jin y Daniell, 2015). La expresión genómica del cloroplasto se regula a nivel post transduccional (Drechsel y Bock, 2010).

Durante el estudio del genoma plastídico, surgieron dos teorías para la inserción de genes externos en el genoma del cloroplasto. La primera teoría habla sobre la inserción de transgenes en regiones espaciadoras transcripcionalmente silenciosas, esto es en las regiones en donde los genes se encuentran en cadenas de ADN opuestas y en orientaciones opuestas (teoría de Maliga). La segunda teoría habla sobre la inserción en espaciadores transcripcionalmente activos dentro de los operones del cloroplasto (teoría Daniell). Diversos estudios han comprobado que la región espaciadora transcripcionalmente activa ofrece un nivel alrededor de 25 veces más de expresión que las regiones transcripcionalmente silenciosas (Jin y Daniell, 2015; Longoni *et al.*, 2015; Maliga, 2004).

A la fecha, la región más común para la integración de transgenes es la transcripcionalmente activa que se encuentra entre la región *trnI-trnA* (dentro del operón *rrn*) y este se localiza en la región de Repetidos Invertidos en el genoma del cloroplasto (Jin y Daniell, 2015; Svab y Maliga, 1993). Sin embargo, se han logrado introducir diversos

genes en otras regiones de cloroplasto de manera estable como: *rrn16-3'rps12* (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016), *rrn16-trnI* (Morgenfeld *et al.*, 2014; Morgenfeld *et al.*, 2020), *rbcL-accD* (Hasunuma *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006; Tissot *et al.*, 2008), *trnfM-trnG* (Petersen y Bock, 2011; Waheed *et al.*, 2011).

Los genes del cloroplasto son transcritos por dos tipos de ARN polimerasas, las cuales son necesarias para el funcionamiento correcto del cloroplasto. El cloroplasto por sí mismo codifica para una polimerasa de múltiples subunidades, similar a las polimerasas bacterianas, que requiere cofactores sigma para facilitar el reconocimiento de los promotores. La segunda ARN polimerasa que participa en la transcripción del plastoma es una subunidad codificada por el núcleo (Daniell *et al.*, 2016; Tiller y Bock, 2014).

Un complejo de preiniciación compuesto por la subunidad 30S del ribosoma y el ARN de transferencia seleccionan el sitio de iniciación del ARNm AUG, aunque en raras ocasiones se pueden seleccionar otros tripletes como lo es GUG o UUG como codones de iniciación del plástido. Luego de seleccionar el codón de inicio, la subunidad ribosomal 50S es reclutada para entrar en la fase de elongación y síntesis de proteína. Así como las bacterias, existen diversos factores que ayudan al proceso de iniciación y elongación. La traducción termina cuando el ribosoma reconoce uno de los tres codones de terminación (UAG, UGA y UAA) (Smith y Keeling, 2015; Tiller y Bock, 2014).

2.7.1 Método de transformación, Biobalística

La transformación plastidal se basa en la transferencia de genes al genoma del cloroplasto; actualmente una de las técnicas más utilizadas en la inserción de transgenes con alta eficiencia es la biobalística. Un paso crucial en la transformación de plantas fue la invención de una “pistola” que permite “bombardear” tejido vivo celular a altas presiones con micropartículas recubiertas de ADN. Esta es una técnica que se usa comúnmente en el tejido vegetal y se basa en el uso de micropartículas de metales pesados inertes como lo es el tungsteno o el oro. Estas micropartículas se “cargan” con el ADN de interés y a una presión definida (Ej. 1000 PSI para la transformación de cloroplasto) se lleva a cabo el disparo, el tamaño de las micropartículas varía de 0.4 – 1.7 μm . Las condiciones de presión, distancia de disparo y cantidad de ADN se deben ajustar según sea el caso. (Bock, 2015; Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). La localización de los cloroplastos cerca de

las membranas plasmáticas facilita la técnica de la biobalística, ya que es más sencillo la integración de transgenes al genoma (Tiller y Bock, 2014).

2.7.2 Gen marcador de selección

Debido a que en el evento de transformación solo se alcanza un porcentaje bajo de plastomas en comparación al número total de genomas, se le considera a la célula heteroplásmica, ya que contiene copias del genoma transformadas y copias no transformadas (Zoubenko *et al.*, 1994). Posteriormente los genomas comenzaran a propagarse en diversas rondas de división celular hasta que las células lleguen a ser homoplasmáticas. Para ello se tienen que someter a un número definido por el investigador de rondas de selección/regeneración con marcadores de selección positivos (Bock, 2015; Kuroda y Maliga, 2001; Maliga, 2004).

Anteriormente, el gen marcador de selección utilizado era el gen *rrn16* con mutaciones específicas que conferían la resistencia a espectinomicina, posteriormente se expresó el gen *aadA* (codifica para la enzima amino glucósido 3'-adenilil-transferasa) en *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, 1991) otorgando la resistencia a la espectinomicina/estreptomycinina.

El gen *aadA* de la bacteria *Escherichia coli*, codifica para la enzima aminoglucósido 3'-adenilil-transferasa que inactiva diversos antibióticos del tipo aminoglucósido causando una modificación covalente. Generalmente es muy común utilizar antibióticos como la espectinomicina y la estreptomycinina como inhibidores de la traducción de plástidos ya que son sustratos eficientes para la enzima producida por el gen *aadA*. La espectinomicina es muy efectiva ya que es muy específica para la subunidad 70S del ribosoma y tiene bajos efectos mutagénicos y efectos secundarios (Bock, 2015; Madanala *et al.*, 2015).

Se han desarrollado con el tiempo distintos genes marcadores, pero el gen *aadA* sigue siendo superior a estos (Tabla 2). Los genes marcadores de selección, se les conoce como marcadores positivos, ya que seleccionan las células transplastómicas después de la integración genética (Izumi *et al.*, 2017; Svab y Maliga, 1993). También se han utilizado marcadores recesivos con mutaciones puntuales en los genes que codifican para RNAr (*rrnS* y *rrnL*) pero son menos utilizados ya que solo son eficientes en segregaciones

aleatorias si los plástidos tienen suficientes copias del genoma transformado (Khan y Maliga, 1999).

Algunos otros genes de selección reportados en la transformación cloroplastídica son: *cat* (cloranfenicol) (Li *et al.*, 2011), *alphaA-6/nptII* (kanamicina) (Kumar *et al.*, 2004), *nptII* (neomicina) (Carrer *et al.*, 1993), *hpt* (higromicina) (Wang *et al.*, 2018). Pero debido a la alta frecuencia de transformación que se obtiene con el gen *aadA* (Svab y Maliga, 1993), es hasta la fecha el más utilizado.

2.7.3 Secuencias regulatorias

La expresión de transgenes en el plastoma tiene como principal objetivo obtener niveles altos de expresión proteica. Para esto se ha buscado incrementar la presencia de ARNm utilizando diversos promotores para sobreexpresar genes de interés.

Se conoce el promotor *rrn* (gen *rrn*) como uno de los promotores con mayor eficiencia en la expresión de transgenes, en donde se ha reportado una eficiencia hasta 12 veces mayor que los promotores *psbA* o *trc* en transformación de cloroplasto de tabaco (Newell *et al.*, 2003). Algunos otros promotores utilizados en la transformación cloroplastídica reportados han sido *PT7* (Saba *et al.*, 2019), *PclpP* (Valkov *et al.*, 2011), *Patpl* (Wurbs *et al.*, 2007), *rbcL* (Lin *et al.*, 2003), *accD* (Caroca *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

La expresión de transgenes depende de diversos factores como la estabilización del ARNm, la traducción y acumulación eficiente de la proteína expresada que es determinada por las secuencias 5'/3'UTR (Baneyx, 1999). La región 5'UTR (por sus siglas en inglés) la cual no está traducida, se encuentra aguas arriba de la región de codificación. Esta zona es rica en A + T y contiene elementos *cis* que determinan la estabilidad del ARNm por su interacción con la subunidad α de la ARN polimerasa, ya que esta región contiene la secuencia Shine-Dalgarno de unión a ribosoma participando en el emparejamiento de bases con la subunidad 16S del ARN ribosómico (Adem *et al.*, 2017; Bock, 2015; Kramzar *et al.*, 2006). La región 3'UTR (aguas abajo), es considerada una secuencia reguladora de ARNm ya que los niveles de ARNm están mayormente determinados por la secuencia 3'UTR que 5'UTR debido a que el plegamiento de 3'UTR proporciona estabilidad durante la transcripción (Kuroda y Maliga, 2001; Zicker *et al.*, 2007).

2.7.4 Transformación genética en cloroplasto de tabaco

La producción de enzimas recombinantes utilizando plantas de tabaco como biorreactores ha emergido por su capacidad de producir proteínas a gran escala y la facultad que ofrece al poder ser modificado de acuerdo a las necesidades. Se han hecho diversos estudios con diseños similares a este trabajo, en donde se reporta que el rendimiento y la expresión de enzimas recombinantes (celulasas, enzimas lignocelulíticas, etc.) en células vegetales de tabaco han sido satisfactorias (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2013). Estos trabajos se han apoyado de las capacidades particulares del cloroplasto y mediante la recombinación homóloga han logrado insertar los transgenes en el plastoma, todo esto para la producción de biocombustibles o uso industrial con otros fines.

En la transformación de tabaco, se ha demostrado que el uso del marcador de selección *aadA* como un gen eficiente, que le confiere a la planta resistencia a la espectinomicina y a la estreptomycin, los cuales pueden ser de gran utilidad para realizar rondas de selección para llevar a la planta de un estado de heteroplásmico a homoplásmico (Garvey *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2007). También se ha reportado que el uso del casete de expresión utilizando el promotor *rrn*, la región 5'-UTR (que contiene la región Shine-Dalgarno de unión a ribosoma) y el gen 10 del Fago T7, para procesos de sacarificación en la producción de bioetanol como combustible alternativo es eficiente (Castiglia *et al.*, 2016).

2.7.4.1 Celulasas expresadas en cloroplasto de tabaco

Actualmente, los sistemas de producción de proteínas recombinantes más utilizados son los sistemas bacterianos. Sin embargo, *E. coli* produce endotoxinas de manera endógena cuya eliminación de las preparaciones es costosa (Twyman *et al.*, 2003). La producción de proteínas recombinantes en levaduras y hongos ofrece la rentabilidad y los beneficios de escalamiento de *E. coli* combinados con las ventajas de la expresión eucariota. Por otro lado, la proteína se expresa en el sobrenadante del cultivo permitiendo una purificación más rápida y sencilla; además, la proteína purificada contiene menos endotoxinas contaminantes en comparación con las contrapartes expresadas en bacterias (Mett *et al.*, 2008; Weisser y Hall, 2009) Sin embargo, tienen una serie de problemas

técnicos, como la pérdida de plásmido y la disminución drástica en el rendimiento de proteínas durante la producción a gran escala (Xu *et al.*, 2011). La transformación genética de cloroplastos se ha enfocado en la producción de organismos que tengan la capacidad de producir proteínas de interés; actualmente se han reportado más de 100 transgenes integrados de manera estable en el plastoma (Verma y Daniell, 2007). Estas proteínas tienen diversas áreas de impacto como el área industrial, alimenticia, textil, bioenergética, biofarmacéutica, vacunas, agronomía, antibióticos.

Se han reportado niveles de hasta un 75% de proteína total soluble expresadas de manera estable y eficiente que permiten la bioconversión de biomasa vegetal (Oey *et al.*, 2009). Estos estudios demuestran que la transformación de plastomas representan una aportación rentable para expresar enzimas recombinantes (Castiglia *et al.*, 2016).

Castiglia *et al.* (2016), expresaron tres celulasas de distintos organismos (Tabla 3) en donde obtuvieron resultados de proteína total soluble desde 2% hasta más del 75%, análisis posteriores demostraron que las enzimas derivadas de plástidos eran capaces de hidrolizar una biomasa de caña pre tratada industrialmente para la generación de biocombustibles. Por otro lado, Yu *et al.* (2007), reportaron la transformación de plantas de tabaco con los genes *Cel6A* y *Cel6B*, con niveles de proteína total soluble de 2 al 4%, al realizar ensayos enzimáticos las dos enzimas fueron activas al hidrolizar celulosa cristalina. Kolotilin *et al.* (2013), expresaron una xilanasa en plastomas de tabaco obteniendo una acumulación de enzima fúngicas con niveles diez veces más altos que la enzima bacteriana, constituyendo hasta el 6% de la proteína soluble total en el tejido foliar.

Tabla 3. Celulasas expresadas en tabaco.

Celulasa	Organismo proveniente	Gen	Referencia
	<i>Alicyclobacillus</i>		
endoglucanasa, endo- β -1,4-xilanasa y β -glucosidasa	<i>acidocaldarius, Sulfolobus solfataricus</i> y <i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>endo, xyn</i> y <i>CelB</i>	(Castiglia <i>et al.</i> , 2016)
endo- β -1,4 glucanasa y exo-celobiohidrolasa	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>Cel6A</i> y <i>Cel6B</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
β -glucosidasa, Celulasa A y B	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Thermotoga neapolitana</i>	<i>bglI, CelA</i> y <i>CelB</i>	(Espinoza-Sánchez <i>et al.</i> , 2016)
Xilanasa	<i>Aspergillus niger</i>	<i>XynA</i>	(Kolotilin <i>et al.</i> , 2013)
Endocelulasa E1 y E2, exocelulasa E4, endocelulasa E4, endocelulasa E5, exocelulasa E6 y β -glucosidasa	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>CelB, Cel6B, CelD</i> y <i>CelE, CelF</i> y <i>BglC</i>	(Klinger <i>et al.</i> , 2015)
endo- β -1,4 glucanasa	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Cel5A</i>	(Garvey <i>et al.</i> , 2014)
endo- β -1,4 glucanasa	<i>Thermomonospora fusca</i>	<i>E2</i> y <i>E3</i>	(Ziegelhoffer <i>et al.</i> , 1999)
endo- β -1,4 glucanasa	<i>Thermobifida fusca</i>	<i>Cel6A</i>	(Schmidt <i>et al.</i> , 2019)

2.7.1.2 Efectos pleiotrópicos

Si bien la transformación cloroplastídica tiene sus ventajas y sus rendimientos altos, son muy prometedores para las industrias, es necesario saber que la acumulación de una proteína no nativa puede afectar de manera imprevista el metabolismo de la planta. Diversos proyectos han reportado plantas transplastómicas con fenotipos mutantes no deseados afectando el crecimiento, fertilidad, clorosis foliar y bajo rendimiento en la biomasa (Oey *et al.*, 2009; Petersen y Bock, 2011). Generalmente estos problemas no

afectan el desarrollo de las plantas o pueden desaparecer de manera gradual, pero en ocasiones los fenotipos anormales pueden afectar el desarrollo de las plantas (Verma *et al.*, 2010).

Castiglia *et al.* (2016) transformaron cloroplastos de tabaco para expresar diversas celulasas provenientes de bacterias termófilas, hipertermófilas y *Archea*, esto con el fin de probar la aplicación de dichas enzimas en biomasa pretratada industrialmente en la generación de biocombustibles, ellos reportaron la presencia de fenotipos variables en comparación a las plantas control, se presentó una acumulación de endoglucanasa (hasta un 2% de la proteína total soluble 'TSP') dando fenotipos vegetales alterados cuya gravedad estaba directamente relacionada con el rendimiento de la enzima, dentro de este estudio se presentó un fenotipo letal para las plántulas y esto se debió al deterioro del desarrollo de plastidios asociado a la unión de la proteína endoglucanasa a los tilacoides, dentro de este estudio la expresión de la endo- β -1,4-xilanasas y la β -glucosidasa, presentaron un buen rendimiento y sin presentar efectos perjudiciales sobre el desarrollo de la planta (Castiglia *et al.*, 2016).

Por otro lado, otros estudios han presentado fenotipos diferentes a las plantas control, en donde se logró la integración con un gen *CeIA-CeIB* bicistrónico mostrando hojas con color abigarrado pero sin problemas en el desarrollo de las plantas (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016). Se han expresado xilanasas provenientes de *Aspergillus niger*, obteniendo plantas atrofiadas y cloróticas, al realizar los análisis pertinentes observaron que había una acumulación de ARNm y concluyeron que esto se debía a una alteración en la homeostasis del ARNm de los plástidos al redirigir masivamente la síntesis de ARNm causando una reducción de la transcripción de genes esenciales debido a recursos agotados de la maquinaria genética dentro del orgánulo (Kolotilin *et al.*, 2013).

En ocasiones, los fenotipos anormales tienen cierta utilidad y se pueden utilizar como mejora de la bioseguridad o adaptación en organismos modificados. Por ejemplo, Ruiz y Daniell (2005) utilizaron la transformación de plástidos a través de un fenotipo anormal producto de la expresión β -cetotiolasa en plantas obtenidas de plastidios con el desarrollo acelerado de anteras, lo que provocó un colapso de la morfología de los granos de polen. Esto afectó su maduración y condujo a la esterilidad. A través de esto, diseñaron un sistema de esterilidad masculina citoplasmática en las plantas. Jin *et al.* (2011) con la

expresión de una β -glucosidasa en cloroplasto de tabaco, que mostró un aumento en la biomasa, altura, área de la hoja y densidad de tricomas debido a un aumento de las giberelinas que producían ésteres de azúcar en exudados transplastómicos, lo que también disminuyó las poblaciones de mosca blanca y pulgón, dando lugar a una nueva estrategia para diseñar plantas altas con biopesticidas.

Hasta la fecha, no se entiende bien qué causa todos estos efectos o cuál es la solución. Sin embargo, Ruiz y Daniell (2005) propusieron que el fenotipo anormal esté relacionado con el tipo de gen expresado. En este sentido, el hecho de que hay informes con expresión proteica con menos del 2% de TSP con efectos pleiotrópicos (Waheed *et al.*, 2011) e informes con una sobreexpresión de hasta el 72% de TSP sin efectos adversos en las plantas (Ruhlman *et al.*, 2010) sugiere que los efectos pleiotrópicos no son una consecuencia de la sobreexpresión de proteínas extrañas. Tal vez efectos perjudiciales se pueden atribuir a varios factores, tales como la interferencia de las proteínas recombinantes con estructura y función de tilacoides, interferencia de nuevos marcos de lectura abiertos dentro del metabolismo citoplasmático o niveles más bajos de producción de ATP (Pelletier y Budar, 2007).

Cualquiera que sea la razón de los efectos pleiotrópicos, estudios detallados sobre las vías metabólicas afectadas dentro de los cloroplastos (o la interacción de las proteínas recombinantes con la maquinaria fotosintética del cloroplasto) son necesarios para disminuir los efectos adversos. El uso de estrategias para la expresión inducible en la transformación del cloroplasto puede eludir los efectos perjudiciales observados en las plantas y, sobre esto, se han realizado progresos significativos en los últimos años (Verhounig *et al.*, 2010).

Tabla 4. Efectos pleiotrópicos mostrados por plantas de tabaco transformadas a nivel de cloroplasto.

Gen	Producto	Promotor	5'UTR/3' UTR	Región cloroplastí dica	Marcador de selección	Proteína total soluble (TSP)	Efecto pleiotrópico	Referencia
CelA-	Celulasas	<i>rrn</i>	<i>rbcL/rbcL</i>	<i>rrn16-3/rps12</i>	<i>aadA</i>	a	Fenotipo variegado	(Espinoza-Sánchez et
CelB	bicistrónica							
CrtW	β -caroteno	<i>rrn</i>	<i>rrn/rps16</i>	<i>rbcL-accD</i>	<i>aadA</i>	a	Crecimiento lento	(Hasunuma et al., 2008)
CrtZ	β -caroteno hidroxilasa							
<i>gag</i>	Pr55 ^{gag}	<i>rrn</i>	<i>rbcL/rbcL</i>	<i>rps12/7-trnV</i>	<i>aadA</i>	6.75%	Fenotipo clorótico, crecimiento lento y disminución	(Scotti et al., 2009)
<i>p24-Nef</i>	Antígenos VIH p24- ^{N1-6}	<i>rrn</i>	T7g10/ <i>rrnB</i>	<i>trnM-trnG</i>	<i>aadA</i>	40%	Fenotipo clorótico	(Zhou et al., 2008)
A27L	Proteína inmunogéni ca A27L	<i>rrn</i>	T7g10/ <i>rbcL</i>	<i>rps12/7-trnV</i>	<i>aadA</i>	18%	Crecimiento lento y fenotipo	(Rigano et al., 2009)
E7	Antígeno del virus del	<i>psbA</i>	<i>psbA/rps</i>	<i>rrn16-trnI</i>	<i>aadA</i>	-8%	Líneas estériles	(Morgenfeld et al., 2014)
L1_2xCys	HPV-16	<i>rrn</i>	*I <i>rbcL</i>	<i>trnN-trnR</i>	<i>aadA</i>	2%	Micro callos pálidos y sin producción de	(Waheed et al., 2011)
M-LTB	L1-LTB							

Tabla 4. (Continuación)

Gen	Producto	Promotor	5'UTR/3'UTR	Región cloroplastí dica	Marcador de selección	Proteína total soluble (TSP)	Efecto pleiotrópico	Referencia
<i>L1_2xCysM</i>	HPV-16 L1	<i>rrn</i>	<i>T7g10/rbcL</i>	<i>trnN-trnR</i>	<i>aadA</i>	1.50%	Esterilidad masculina	(Waheed et al., 2011)
<i>BPTI</i>	Aprotinina	<i>psbA</i>	<i>psbA/psbA</i>	<i>rbcL-accD</i>	<i>aadA</i>	~0.5%	Fenotipo	(Tissot et al., 2005)
<i>Pha</i>	β -cetotiolasa	<i>psbA</i>	<i>psb/psb</i>	<i>trnI-trnA</i>	<i>aadA</i>	a	Esterilidad masculina	(Ruiz y Daniell, 2005)
<i>hEGF</i>	Factor de crecimiento epidérmico	<i>psbA</i>	<i>psbA/rps</i>	<i>rrn16-trnI</i>	<i>aadA</i>	a	Crecimiento lento	(Morgenfeld et al., 2020)
<i>SAG1</i>	Antígeno de superficie SAG1	<i>psbA</i>	<i>psbA/psbA</i>	<i>trnI-trnA</i>	<i>aadA</i>	2.50%	Crecimiento lento y fenotipo	(Albarracín et al., 2015)
<i>GAA</i>	Alfa glucosidasa	<i>psbA</i>	<i>psbA/psbA</i>	<i>trnI-trnA</i>	<i>aadA</i>	0.21%	Fenotipo clorótico	(Su et al., 2015)
<i>MSI-99</i>	Péptido antimicrobiano de tipo magainina	<i>rrn</i>	<i>T7g10/rps16</i>	<i>trnI-trnA</i>	<i>aadA</i>	89.75 μ g/g:FW	Crecimiento lento	(Wang et al., 2015)

Tabla 4. (Continuación)

Gen	Producto	Promotor	5'UTR/3'UTR	Región cloroplastídica	Marcador de selección	Proteína total soluble (TSP)	Efecto pleiotrópico	Referencia
<i>bg1C</i>	β -glucosidasa				<i>aadA</i>			
<i>cel6B</i>	Exocelulasa		<i>T7g10/rbcL</i>	<i>trnM-trnG</i>	<i>aadA</i>	40%	Fenotipo clorótico	(Petersen y Bock, 2011)
<i>Cel9A</i>	Endocelulasa	<i>rrn</i>			<i>aadA</i>			
<i>xeg74</i>	Xiloglucanasa				<i>aadA</i>			
<i>bg1</i>	β -glucosidasa	<i>psbA</i>	<i>psbA/psbA</i>	<i>trnI-trnA</i>	<i>aadA</i>	a	Incremento de biomasa, altura, área foliar y densidad de tricomas	(Jin <i>et al.</i> , 2011)
<i>L1_2xCysM</i>	HPV-16 L1	<i>rrn</i>	<i>T7g10/rbcL</i>	<i>trnN-trnR</i>	<i>aadA</i>	1.50%	Esterilidad masculina	(Waheed <i>et al.</i> , 2011)

a: Indica que se observó una adecuada expresión génica, pero no se reportó cuantificación.

*: Indica que no se reportó

FW: Peso fresco

III. HIPÓTESIS

Las plantas de tabaco han sido utilizadas como biorreactores para el análisis de integración de múltiples genes que codifican para celulasas en el cloroplasto; por tal motivo los genes: *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium* y *mfc* de *Ampullaria crossean* se pueden integrar de manera estable en el plastoma.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, debido a la constante disminución de las reservas fósiles, la gran huella de carbono que ha dejado y el aumento de la población aunado al incremento energético, ha obligado a la transición del uso de energías alternativas para el reemplazo de las energías fósiles (Serna *et al.*, 2011). Debido a esto, la biotecnología de plantas ha abierto un camino en la generación de biocombustibles a partir de la degradación de biomasa celulósica; esto a través de la degradación de los componentes de la pared vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina). *Nicotiana tabacum*, es una planta que ha sido utilizada ampliamente en la producción de enzimas recombinantes, dentro de sus características más importantes es que una planta genera una cantidad importante de biomasa, además de ser una planta que no interfiere en la cadena alimenticia (Tremblay *et al.*, 2010).

El uso de herramientas biotecnológicas para la producción de enzimas recombinantes mediante *Nicotiana tabacum* var. Petit Havana podría contribuir a la generación de biocombustibles. Es por esto que la integración en la región de repetidos invertidos (*rrn16S/3'rps12*) del gen *Cel9A*, el cual codifica para una glicosil hidrolasa de la familia 9, y el gen *mfc*, que codifica para una enzima EGX con actividad exo- β -1,4-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y endo- β -1,4-xilanasa, permitirán el desarrollo de plantas recombinantes con la capacidad de producir enzimas hidrolíticas para el tratamiento de biomasa vegetal para su aplicación a nivel industrial para el desarrollo de biocombustibles de segunda generación.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Transformar genéticamente plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Petite Havana) a nivel cloroplastídico mediante el uso de vectores de expresión que contengan los genes *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium* y *mfc* de *Ampullaria crossean* y confirmar su integración en el genoma del cloroplasto.

5.2 Objetivos específicos

1. Construir vectores con la capacidad de transferir genes relacionados con la degradación de la pared celular vegetal: *mfc* de *Ampullaria crossean* y *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium* a plastomas de tabaco.
2. Generar plantas transplastómicas de tabaco que contengan los genes *mfc* de *Ampullaria crossean* y *Cel9A* de *Phanerochaete chrysosporium*.
3. Demostrar la integración de los genes *Cel9A* y *mfc* en el plastoma de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana mediante PCR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

Aproximadamente 100 semillas de *Nicotiana tabacum* var Petite Havana se desinfectaron bajo las siguientes condiciones: Tres lavados con agua destilada por un min en agitación constante, un lavado de etanol al 70% durante 30 s, un lavado con etanol al 100% durante 10 s y tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se propagaron en medio RM (Macronutrientes 10X 100 mL L⁻¹, micronutrientes 100X 10 mL L⁻¹, FeEDTA 5 mL L⁻¹, Phytigel™ (Sigma-Aldrich, Japón) 3 g L⁻¹, pH 5.8 y se crecieron en cuarto aislado en condiciones de esterilidad.

6.2 Cepas de *E. coli*

Para la propagación y el mantenimiento de plásmidos se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA).

6.3 Vectores de transformación de cloroplasto de tabaco, vector pES6

El vector pES6 (Figura 9) fue proporcionado por Espinoza-Sánchez *et al.*, (2016) para la transformación de cloroplastos de tabaco. El vector pES6 es un derivado del vector pES4 (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2015) que a su vez deriva del vector pPRV111A (Zoubenko *et al.*, 1994) el cual es derivado del vector pUC119, un vector de clonación pequeño y de alto número de copias para la replicación en *E. coli* en el cual se mutó de manera puntual el sitio *Scal* (AGTACT por AGTATT) del gen resistencia a ampicilina denominándosele pZS1; este vector fue abierto utilizando *EcoRI/BamHI* y se insertó la secuencia de cloroplasto (*rrn16S/3'rps12*) entre *BglI* y *EcoRI*. y el gen *aadA*, luego se abrió con *EcoRI/HindIII* y se insertó una región promotora, secuencia líder, región Shine-Dalgarno y una secuencia terminadora para formar el pES4.

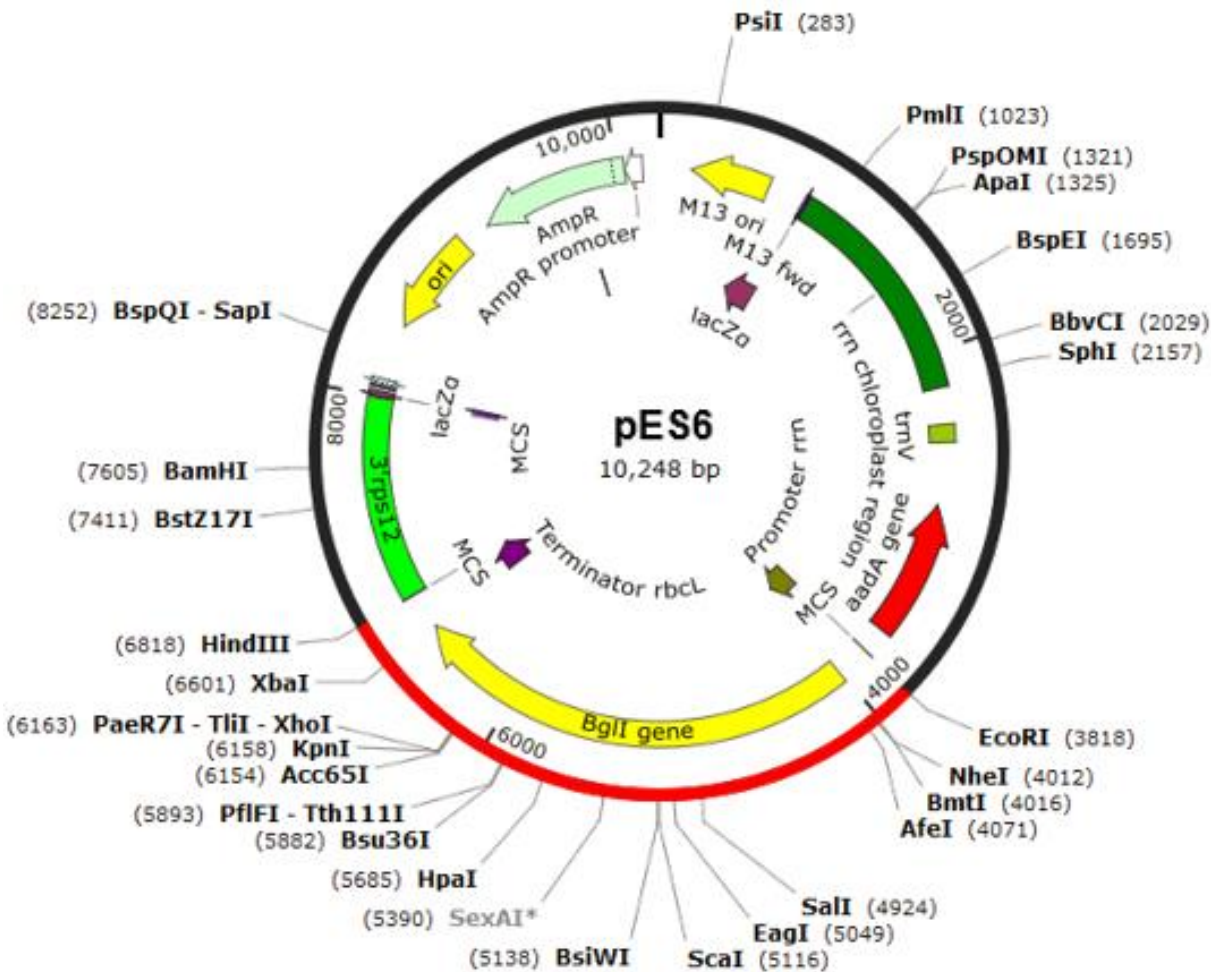


Figura 9. Vector pES6.

El cual contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), un gen de resistencia a espectinomycin (aadA gene), un terminador *rbcl* (flecha morada) y un promotor *rm* (flecha dorada) y los sitios de recombinación homóloga *rm16S/3' rps12* y diversos sitios de clonación múltiple (MCS) (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016).

6.4 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Se inocularon 5 mL de medio LB (Luria-Bertani) con 50 µL de células *E.coli* DH5α y se incubaron a 37°C por 15 h, luego de esto se tomó 1 mL de preinóculo para colocarlo en 100 mL de medio LB y se incubó a 37°C en continua agitación hasta obtener una densidad óptica (D.O.) de 0.35-0.4 a 600 nm, después el medio se pasó a tubos falcón de 50 mL previamente enfriados a 4°C y se centrifugaron a 4000 rpm durante 14 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 10 mL MgCl₂ 100 mM, posterior

a esto los tubos se centrifugaron a 300 rpm durante 15 min a 4°C. Nuevamente se decantó el sobrenadante y el contenido del tubo se resuspendió en 20 mL de CaCl₂ 100 mM para luego colocar el tubo en hielo durante 20 min, posteriormente se centrifugó a 300 rpm por 15 min a 4°C y se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol y se centrifugó a 2100 rpm por 15 min a 4°C y se decantó una vez más el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 mL de CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol (D.O.a 600 nm de 200-250). Finalmente se colocaron 100 µL de células competentes en tubos Eppendorf® de 1.5 mL a -80°C para su almacenamiento (Serrano-Rivero *et al.*, 2013).

6.5 Propagación y caracterización del vector pES6

E. coli DH5α con el vector pES6 fue sembrado en medio LB adicionado con 100 mg L⁻¹ de ampicilina, se tomaron las colonias en tubo Eppendorf® de 1.5 mL con 100 µL de agua estéril para realizar una extracción con el Kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Estados Unidos) tomando una asada de colonias siguiendo las especificaciones del fabricante y cuantificando el ADN plasmídico mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

6.6 Diseño y construcción de vectores de clonación

Chávez *et al.* (2013) optimizó las secuencias codificantes de los genes *Cel9A* y *mfc* proveniente de *P. Chrysosporium* y *A. crossean*, respectivamente, ambas secuencias fueron proporcionados por Chávez, *et al.* (2013) para realizar esta investigación. Para la síntesis del gen *Cel9A*, mediante la secuencia codificante obtenida por el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Chávez *et al.*, (2013) eliminó las secuencias que codifican para los sitios de restricción *Pst*I (29 y 1585 pb), *Aat*II (281 pb) y *Nhe*I (837 pb), mientras que para el gen *mfc* se eliminaron los sitios de restricción *Pml*I (316 pb), *Nhe*I (502 pb), *Pst*I (1209 pb), *Aat*II (1228 pb) y *Nco*I (1319 pb). Estas dos secuencias fueron enviadas a la empresa GenScript (New Jersey, Estados Unidos de América) para su síntesis de la secuencia modificada y su introducción al vector de expresión PJ401/PJ404.

Para las dos secuencias se le pidió a la empresa optimizarlas para su expresión en cloroplasto mediante algoritmos GeneGPS™. La secuencia optimizada del gen *Cel9A* fue introducida en el vector de expresión PJ401 (PJ401*Cel9A*) el cual posee un gen de

resistencia a kanamicina y un promotor T5. La secuencia optimizada del gen *mfc* se insertó en el vector de expresión PJ404 (PJ404mfc) que posee un gen de resistencia a ampicilina y un promotor T5.

Con la información proporcionada por Chánez *et al.*, (2013), y con la finalidad de analizar las secuencias sintetizadas antes de realizar la transformación de cloroplastos de tabaco, se realizó una búsqueda de las secuencias originales de *Cel9A* y *mfc* mediante la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se obtuvieron las dos secuencias codificantes originales de *Cel9A* de *P. Chrysosporium* y *mfc* de *A. crossean*.

Para el análisis, las secuencias codificantes de ambos genes se tradujeron con el uso del software en línea ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal® (web.expasy.org/translate/) tanto la secuencia original y la secuencia modificada optimizada. Posteriormente, se utilizó el software en línea Clustalw2® (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) para realizar un alineamiento local de ambas secuencias. Las secuencias de aminoácidos del gen *mfc* y la secuencia optimizada de *mfc*, fueron modeladas tridimensionalmente utilizando el programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>); posteriormente el análisis de las moléculas fue realizado por medio del programa PyMOL ver. 2.0 (Pymol, 2010) (<http://pymol.org>) realizando una superposición de estructuras.

Las secuencias optimizadas proporcionadas por Chánez *et al.* (2013) de los genes *Cel9A* y *mfc*, y la información obtenida por Espinoza-Sánchez *et al.* (2015) fue utilizada para realizar un diseño *in silico* mediante el software SnapGene ver. 2.4.1 simulando la estructura del vector de expresión pRCY-1 (*Cel9A* + pES6) y pRCY-2 (*mfc* + pES6), esta simulación se realizó como guía para la correcta construcción y evitar posibles errores durante el desarrollo de las construcciones.

6.7 Clonación de los genes *mfc* y *Cel9A* en el vector pES6

Utilizando como base el vector pES6 se construyeron dos vectores de transformación de cloroplastos, uno conteniendo la secuencia optimizada del gen *Cel9A* y de *mfc*.

Para la construcción del vector para cloroplasto conteniendo el gen de *Cel9A*, el plásmido PJ401*Cel9A* fue digerido con las enzimas *Xba*I/*Sma*I, el vector pES6 fue digerido con la enzima *Xba*I a 37°C por 3 h para luego reparar el sitio *Xba*I con la enzima T4

polimerasa (Promega, Estados Unidos) a 37°C por 30 min, posterior a esto se inactivo la polimerasa a 75°C por 20 min obteniendo la región *Xba*I con corte romo para luego cortar el extremo con la enzima *Nhe*I (Promega, Estados Unidos). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 V por 1 h. Se realizó el mismo protocolo para el plásmido PJ404mfc que contiene el gen *mfc* y el vector pES6.

Para purificar el ADN del gel de agarosa utilizando el kit Agarose Gel Extraction de Jena BioScience® (Jena, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se cortó el área del gel que contiene el ADN de interés (vector pES6 linearizado, gen de *Cel9A* y el gen *mfc*) con un bisturí transfiriendo cada sección del gel a un microtubo Eppendorf®, se adicionó 150 µL de solución de extracción para incubar a 60°C por 15 min. Se colocó una columna en un microtubo de 2 mL y se agregaron 100 µL de solución de activación, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, en la columna se adicionó el contenido del microtubo, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 30 s y se descartó el sobrenadante, en seguida se aplicó un lavado con 700 µL de solución de lavado centrifugando a 10,000 rpm por 30 s, este último paso se repitió centrifugando durante 2 min.

Posteriormente, para la reacción de ligación se colocaron en un tubo Eppendorf® 7 µL de agua destilada estéril, 2 µL de buffer 10X Tango (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), 1 µL de T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific®, EE. UU.), 50 ng de inserto y 100 ng de vector previamente purificados, en un radio molar de 1:1, se mezcló perfectamente y se incubaron durante 12 h a 25°C.

6.8 Transformación de *E. coli* DH5α con pRCY-1 y pRCY-2 por choque térmico

Una vez transcurrido el tiempo de ligación, la mezcla de reacción fue utilizada para transformar células competentes *E. coli* DH5α para esto, se utilizó un tubo Eppendorf® de 1.5 mL con 100 µL de células competentes, se adicionaron 3 µL de ADN plasmídico conteniendo el gen *Cel9A* y *mfc*. Luego de esto mantuvieron los tubos en hielo durante 15 min, transcurrido el tiempo se sometieron las células a choque térmico en baño maría a 42°C por 45 s, luego se colocaron los tubos Eppendorf® en hielo por 5 min y se añadieron 500 µL de medio LB líquido y se incubaron en agitación a 37°C por 1 h. Se realizó un spin

para retirar 350 μL de medio y se resuspendió el resto del contenido del tubo, posteriormente se sembraron las células en medio LB suplementado con ampicilina (100 mg mL^{-1}) para *mfc* y kanamicina (100 mg mL^{-1}) para *Ce/9A* con la ayuda de una L de vidrio y se dejaron crecer a 37°C por 16 h.

6.9 Análisis de restricción de pRCY-1 y pRCY-2

Las colonias de *E. coli* DH5 α resultantes de la transformación con la reacción de ligación, fueron recuperadas y subcultivadas dos veces para obtener suficiente masa celular y poder caracterizar las colonias resultantes; para esto, se realizó una extracción de ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina. Las células se colectaron y resuspendieron en 70 μL de agua destilada estéril, posteriormente se adicionaron 350 μL de TENS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaOH, 0.5% SDS) (He, 2011); la solución se mezcló por inversión de microtubo y se reposaron 3 min, después se le adicionaron 150 μL de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 y mezclados suavemente por inversión; los microtubos se colocaron en hielo por 5 min para precipitar proteínas y el ADN cromosomal. Posteriormente se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó en un microtubo Eppendorf® de 1.5 mL y se le adicionaron 700 μL de etanol absoluto centrifugándolo a 13, 200 rpm durante 10 min.

El análisis de restricción para ambos vectores se realizó con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la marca Invitrogen™ (California, Estados Unidos), la digestión enzimática se realizó a 37°C por 4 h, posteriormente, se preparó un gel de agarosa al 0.8%, el gel se corrió a 80 V por 1 h.

6.10 Transformación genética de cloroplastos de tabaco

6.10.1 Preparación de partículas de oro

Se utilizaron 30 mg de micropartículas de oro de 0.6 μm (Bio-Rad, Múnich, Alemania) y se colocaron un tubo Eppendorf® de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló en Vortex durante 5 min, luego de esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min, posterior a esto las micropartículas se centrifugaron a 300 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de agua estéril a 4°C y se mezclaron en

vortex durante 1 min, luego se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3,000 rpm por 1 min (estos lavados se realizaron dos veces más). Posterior a esto se adiciono 1 mL de etanol absoluto y se mezcló utilizando vortex durante 1 min, las partículas se dejaron precipitar por 10 min, seguidamente las partículas se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Las partículas se resuspendieron en 500 μL de glicerol al 50%. La concentración final de las micropartículas fue de 60 mg mL^{-1} .

6.10.2 Recubrimiento de micropartículas de oro

Para el recubrimiento de las micropartículas se preparó el ADN plasmídico el cual se extrajo previamente con el kit de QIAGEN plasmid Maxi (Valencia, CA), las micropartículas preparadas se resuspendieron en vortex durante 5 min (Figura 10A). Se alicuotaron cinco tubos de 100 μL de las partículas y en cada tubo se agregaron: 5 μL de ADN plasmídico ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), 50 μL de CaCl_2 , 20 μL de espermidina (0.1 M). Posteriormente se mezclaron las alícuotas en vortex por 3 min y se centrifugaron a 5,000 rpm por 20 s, se adicionaron 140 μL de etanol al 70% para resuspender y se centrifugaron nuevamente a 5,000 rpm por 20 s, seguidamente se resuspendieron las partículas en 50 μL de etanol absoluto y se colocaron en el vortex hasta su uso (Sanford, 1990).

6.10.3 Preparación de material para el bombardeo

Para esto se utilizaron hojas de tabaco jóvenes las cuales fueron desarrolladas en condiciones de esterilidad durante aproximadamente seis semanas. Luego de esto las hojas fueron cortadas con un bisturí previamente esterilizado y estas hojas fueron colocadas en medio de cultivo RM (Macronutrientes $10 \times 100 \text{ mL L}^{-1}$, micronutrientes $100 \times 10 \text{ mL L}^{-1}$ FeEDTA 5 mL L^{-1} , Phytigel™ (Sigma-Aldrich, Japón) 8 g L^{-1} , pH 5.8) con la cara abaxial hacia arriba, estas hojas fueron distribuidas de tal manera que cubrieran alrededor del 80% el área total de la caja Petri y se mantuvieron en oscuridad por 24 h previas al bombardeo (Sanford, 1990).

La pistola de bombardeo (Bio-Rad, Munich, Alemania) (Figura 10B) fue desarmada para después poder esterilizar sus componentes con etanol absoluto (Figura 10C), de igual manera las membranas de ruptura (1,100 PSI), las membranas macrocarriers, las mallas

de metal, todo esto bajo una campana de flujo laminar para asegurar las condiciones de esterilidad.

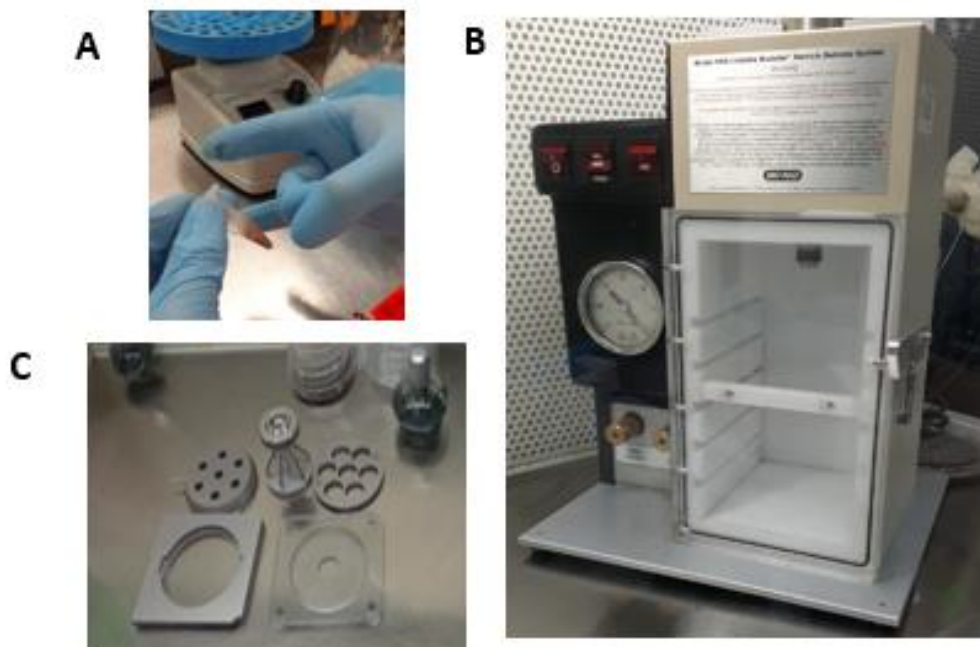


Figura 10. Preparación de material para biobalística.

A) Preparación de partículas de oro B) Pistola de bombardeo Bio-Rad (Múnich, Alemania) C) Esterilización de piezas internas de la pistola de bombardeo.

6.10.4 Bombardeo de hojas de Tabaco

El bombardeo de hojas de tabaco se llevó a cabo de acuerdo a Svab y maliga (1993) y Lutz *et al.* (2006) en campana de flujo laminar.

Con el material y el área previamente esterilizadas se colocaron las cajas Petri con las hojas de tabaco en la cámara de disparo a 11 cm de distancia del revolver, se generó vacío hasta que el indicador marcara 25 mm de Hg y se realizó el disparo, una vez realizado esto se retiró la caja Petri cubriéndola inmediatamente para evitar cualquier tipo de contaminación. Se realizaron 20 bombardeos (20 cajas), de los cuales 10 bombardeos fueron con el vector pRCY-1 y 10 bombardeos para el vector pRCY-2. Luego de realizar lo anterior las cajas Petri fueron cubiertas con papel aluminio por 24 h a 27°C para permitir la regeneración del tejido.

6.11 Selección y regeneración del material transformado

Las hojas bombardeadas fueron cortadas en piezas de 3 x 3 mm y fueron colocadas para una primera ronda de selección en medio RMOP (Macronutrientes 10X 100 mL L⁻¹, micronutrientes 100X 10 mL L⁻¹, FeEDTA 5mL L⁻¹, Tiamina [1 mg mL⁻¹] 1 mL L⁻¹, NAA [1 mg mL⁻¹] 0.1 mL L⁻¹, BAP [1 mg mL⁻¹] 1 mL L⁻¹, Myo inositol 100 mg L⁻¹, fitagel 3 g L⁻¹, pH 5.8) adicionado con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina (Sigma-Aldrich, Japón) en condiciones controladas de horas luz (16 h) y a una temperatura de 27°C. Después de aproximadamente seis semanas el tejido no transformado se tornó de un color amarillo y las células putativamente transformadas conservaron un color verde, estos explantes fueron pasados a medio RMOP ahora suplementado con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina/estreptomicina para distinguir las células transformadas de las mutantes. De las clonas resistentes se pasaron a una tercera ronda de selección en donde el medio RMOP se suplemento con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina.

6.12 Establecimiento de plantas regeneradas en invernadero

De las plantas regeneradas en tercera selección se seleccionaron tres plantas de cada línea transformada para pasarlas a sustrato (Peat Moss), esto se realizó de manera cuidadosa lavando la raíz tratando de eliminar cualquier residuo de medio de cultivo utilizando guantes de látex y posteriormente plantarlas en el Peat Moss previamente esterilizado. Adicionalmente, tres plantas de *N. tabacum* silvestre fueron cultivadas como control. Las plantas se aclimataron durante un mes en laboratorio utilizando protección plástica para posteriormente pasarlas a invernadero.

6.13 Análisis moleculares

6.13.1 Extracción de ADN vegetal

La extracción de ADN a partir de hojas de tabaco fue realizada bajo el protocolo de Doyle (1991) tomando 1g de tejido. Las muestras se colocaron en tubo Eppendorf® de 1.5 mL y se colocaron en el ultra congelador (-70°C), luego de esto se maceraron con un pistilo dentro del tubo y se le adicionaron 800 µL de solución CTAB (NaCl [5M], EDTA [0.5 M], Tris-HCl [5M] pH 7.5, Ctab 1% y β-mercaptoetanol) y se incubaron a 60 °C por 15 min en

baño maría, luego de esto los tubos se dejaron enfriar por 5 min y se les adicionó 800 μ L de cloroformo-octanol y se agitaron en vortex para después centrifugarlas a 11,000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf[®] nuevo de 1.5 mL y se añadieron 600 μ L de etanol-acetato para pasar a refrigerar las muestras durante 30 min, posteriormente las muestras se centrifugaron por 10 min a 11,000 rpm y se decantó el sobrenadante para después agregar 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó una vez más a 11,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla para así resuspender en 20 μ L de agua estéril.

6.13.2 Análisis de integración de transgenes en plastoma de tabaco mediante PCR.

La amplificación mediante PCR se realizó utilizando primers específicos para cada secuencia del gen, los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies. Para el gen de *CeI9A* se utilizaron: Fw-5'CGCCGGTGACTACATTAAG3' y Rv-5'GGTACTTCTGCGCGATTT3', estos primer amplifican una región específica dentro de la secuencia del gen de interés de 4354 hasta 5057 pb (amplicón de 705 pb) y para el gen *mfc*: Fw-5'GAGCGAGATTGACAGATTAAGA3' y Rv-5'GTATCCAGGCGCTGTTTAG3', los cuales amplifican una región específica dentro de la secuencia del gen de interés desde 4084 a 4818 pb (amplicón de 736 pb). Se utilizó el siguiente programa: 5 min a 94°C para la desnaturalización, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 45 s a 58°C y 60 s a 72°C) con una extensión final de 5 min a 72°C.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Micropropagación de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana

Aproximadamente 100 semillas de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana se esterilizaron y sembraron en medio RM, después de tres días las semillas germinaron, 15 días después de la germinación, las plantas suficientemente grandes se pasaron a cajas individuales para desarrollar las hojas que posteriormente serían bombardeadas (Figura 11).



Figura 11. Micropropagación de plantas silvestres de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana.

La propagación de las plantas se llevó a cabo en medio RM en caja Magenta™ y en condiciones de 16 h luz por aproximadamente seis semanas.

7.2 Selección de los genes de interés y diseño de secuencias

Los genes (*mfc* y *Cel9A* de *A. crossean* y *P. chrysosporium*) fueron proporcionados por Chánez *et al.* (2013). Posteriormente, se analizaron las secuencias de estos genes con respecto a las mutaciones realizadas, y la posible estructura terciaria de la proteína a producir. Para analizar la secuencia del gen *Cel9A*, se tomó como base la secuencia nucleotídica optimizada reportada por Chánez *et al.* (2013) (Figura 12)

```

1   atgatccctttacgttcggcagtagcatcctctctcttttggcttcattaggtgcagcgcagctgccgctgccgaacc
81  gccgtgggtgccattgaacgcgacgtttggcactcattccgagcaatccgagcgcagggctcgggtaatccgactggacga
161 attttctggaaaataccctgtatttctatgaagagcaacgcagcggtaagctgccggttaccaatcgcgtcccgtggcgt
241 aacgattccgctaccgcagatggctgtagttaggtttggacctgagcgggtggctactatgacgccggtgactacattaa
321 gtataccttccgatgagcttcagcgtcatgacatctgctgggggtgctttggactacggcaagggttacgacctggcga
401 accagaccgcgtacctggatgacatgctgcttggactggctgtagaaggcacatccagaccgcaaacgctg
481 tacgttcaagtgggcgatgccgacctggacaatgctgactgggggtggtagccgtggtattccgaccccgctacgagcta
561 cgcaatcaactccacctctccgggcacggatgctggcagcgcaggcagcagcggcctttgagcatgacgacactgtaca
641 acaatcgtaccctgagccaaccagcggcaatggcattaccagcacttcttatgagcaccctgctgcaaacgctcaa
721 cagttgtataaacttcgccaccaatagcagcgtcccgaagttagctatcaagcagcagcggcagcgttgagatgcgta
801 cgcaagcagcggctttcaggacgaactggctatcgtgctgcttattccctggcgggcaattctagcagatgcgtacc
881 cgcaggcagcggcttctatcgtaaacaaggcctgagcaaacacctggaagatgacggctgttcaactgggatgagaaa
961 agcccagggtgtgctgctgctggcgacaaatcgcgagaagtaccggaaactggcaaatggcaccggtgtggactggaa
1041 aagcagatctgaataactatttctgacatcgttagcaattccggctgtagctttctgacgagcggcggctgctgtact
1121 acccaggtgacagcagatgactacgctgaacctgctgtaacgcggcagctgctgttctgctgctacgccgacagcggc
1201 ctggccttagctctgagaacagctcgtatcgtcagtttgcgagagccagattgactactttttgggtaacaacc
1281 gatgaccgttcagtagtgggggctccaccgaatgctccgagcaaccgcattcggcactggcagcgggtgacacc
1361 cgcaagacattgcaaacattgatacgggtgcccggagcacgaagcctacttctgtacgggtgctgcttggggccgaac
1441 gacgatgacctgttctgggatctgcccagcagctgggtcgagagcaggttggctggattatgttgcctgtgggtcac
1521 catcgcagctcgtgagctggtagcgggtcggcgacccgtggatatacctgacggcgggttagctacgaagagcgtc
1601 gtccgggtggccagcctggtgtagcagccatcagcggcgggttctgcccgtcacgattggcgcgtgggcaaatcgtgat
1681 ggtgctggtgctgggtgacccggctggtcgtcctgagcctgggtacggtttggatggttctggcctatcgcaatcgat
1761 tcgtaagatttat

```

Figura 12. Secuencia nucleotídica codificante del gen *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium* optimizada y reportada por Chánez *et al.* (2013).

Posteriormente, se obtuvo la región codificante del gen *Cel9A* reportada en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bajo el número de acceso de AY094488.1, con su respectivo codón de inicio y codón de paro (Figura 13).

```

1   atgatacctctccgctctgcagtcgctcctcactacttctcggcagctctcggggctgccagcttccgctgccgaacc
81  tccgtgggtgccgtaaacgcaacgttcgggacgacccctagtaatccttctgacgggtccgggaaccctactggacga
161 atttctcgagaacacgctctacttctatgaagaacagcgggagcggaaagctgccgttacgaaccgcgtcccgtggcga
241 aacgatagcgcgacggacgacggcagggacgtcggactggacctgagtgggcggctactatgatgccggagactacatcaa
321 gtataccttctctatgtccttctctgtttatgtctatgctggggcgcgctggattatggcaagggttatgacctcgcaa
401 accaaaccgctatctcgacgacatgctccgggtggagcctagactggcctaataagaggccatcctgacccaaacagctg
481 tatgtacaagtcggggatgcagatctggacaacgcatattggggaggcgcagagggcatacctacaccaagaacttcata
561 tgcaatcaacagtaccagccccgggtacagacgccggcgcaagctgcggcggcttttctgctgctgttccgattataca
641 acaatcgaacattgtcgcagccccgacctaaccgggtataaacaagcactcttacgctcgcagctccttcagcatgcaaa
721 caactgtataattttcccaaaactcttctgtgctcaagtacctaccaggcgtccgagcctcggctgccgacgcata
801 cgcatcctccggattccaagacgagtagccattgcccgtcgtttatctcgttgcaggaaactccagcagcgttacc
881 cgcaagcgtctcaggttaccgcaagcaaggccttctaagcacttgaagatgacgctgttcaactgggatgagaag
961 tcaccggcgttgccttcttgcggcagattggcagaaagatcctgagcttgcgaacggcactgggtgtggattggaa
1041 gagcgaactgaaacaactcttctgacatcgtcagcaacagtgagcagatattcctaacatcaggcgggtctgctttatt
1121 atccaggcgattcagacgacgctacccttaaccggcattgaacgctgccaatgctccttctgctatgccgactcgggc
1201 cttgctccagcagtgagaagcagctgcttaccgccagttcgcgagctcctcaattgactatttctgggcaataacc
1281 aatgactgtacagataggttggcgtgacccgcaacgcccattcaaacctcattctgcttggctacgggtgctacac
1361 cccaggacattgcgaatcgcacacgggtcccggagcacgaggcttacgtcctttatggcggagtagttggaggccgcaat
1441 gatgacgaccttttgggacctacggagcagattgggtggagagcagggttgggctggattacgttgcctcggctgac
1521 catcgcagcgcgggaactcgtcagtgagcagggcgtccttggtagacacagctgcaggctgggtcgtacgaggagcgc
1601 gaccgggtggccagccttctgacgctgcaatttctgcccgttctgcccggcattgaggagtgaggcaagatcgtcatg
1681 ggtgcttggctggagtgactggtctcgtggtattgtccttggtagcctggtggtggttggcctataggaaatcgat
1761 caggaagatag

```

Figura 13. Secuencia nucleotídica codificante del gen *Cel9A*

Obtenida por el GenBank con número de acceso AY094488.1 procedente de *Phanerochaete chrysosporium*. Subrayado en amarillo el codón de inicio y el codón de paro (Wymelenberg *et al.*, 2002).

Luego de obtener la secuencia de nucleótidos reportada en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el número de accesoión AY094488.1 se tradujo mediante la herramienta ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal® (<https://web.expasy.org/translate/>) obteniendo un total de 590 aminoácidos (Figura 14).

```
MIPLRSVAVASSLLLASLGAAQLPLPNPPWVPLNATFGTHPSNPSDGSNGPHWTNPLENTLYFYEEQRSGK
LPVTNRVPWRNDSATDDGRDVGLDLSGGYYDAGDYIKYTFPMSFSVMSICWGALDYGKGYDLANQTAYLD
DMLRWSLDWLMKAHPDPNTLYVQVGADLDNAYWGGDRGIPTPRTSYAINSTSPGTDAAAQAAAAFAACS
ALYNNRRLSQPAPNGITSTSYASTLLQHAQQLYNFATNSSVPQVTYQASEPSVADAYASSGFQDELAIAA
LFISLAGNSSDAYPQASQVYRKQGLSKHLEDDAVFNWDEKSPGVALLAAQIAQKYPELANGTGVDWKS DL
NNYFDRIVSNSGRSFLTSGGLLYPGDSDDATLNPALNAAMLLRYADSGLASSEKQSAYRQFAQSQID
YFLGNNPMTVQYMVGVHPNAPSNPHSALATGATPQDIANIDTVPEHEAYVLYGGVVGGPNDDDLFWDLRS
DWVESEVGLDYVAPVVTIAARELVSGAGDPWYTQLQAGSYEERRPGGQPCDAAISAGCRGHDWRVKGIVM
GALVGVGTGLVVLSTLGTVMVLA YRNRIRKI
```

Figura 14. Secuencia de aminoácidos del gen *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium*

La secuencia nucleotídica fue traducida mediante herramienta ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal® reportada en el GenBank con el número de accesoión AY094488.1.

Posteriormente se tradujo la secuencia optimizada reportada por Cháñez *et al.* (2013) del gen *Cel9A* en la plataforma ExpASy para realizar posteriormente un alineamiento de secuencias con el Software SerialCloner 2.6.1. Los resultados mostraron que la secuencia reportada por Cháñez *et al.* (2013), aun cuando se realizaron mutaciones puntuales y optimización de secuencias, la secuencia de aminoácidos se mantuvo intacta siendo la secuencia sintetizada por Cháñez *et al.* (2013) homóloga en la secuencia de aminoácidos, a la reportada en el GenBank (Figura 15).

Similarity: 590/590 (100.00 %)

Cel19A Ori 1	MIPLRSVASSLLLASLGAQLPLPNPPWVPLNATFGTHPSNPSDGSNGPHWTFNLENTL	60
Cel19A Mod 1	MIPLRSVASSLLLASLGAQLPLPNPPWVPLNATFGTHPSNPSDGSNGPHWTFNLENTL	60
Cel19A Ori 61	YFYEEQRSGKLPVTNRVWPNRNDSDATDDGRDVGDLDSGGYYDAGDYIKYTFPMSFVSMSIC	120
Cel19A Mod 61	YFYEEQRSGKLPVTNRVWPNRNDSDATDDGRDVGDLDSGGYYDAGDYIKYTFPMSFVSMSIC	120
Cel19A Ori 121	WGALDYGKGYDLANQTAYLDDMLRWSLDWLMKAHPDPNTLYVQVGADLDNAYWGGDRGI	180
Cel19A Mod 121	WGALDYGKGYDLANQTAYLDDMLRWSLDWLMKAHPDPNTLYVQVGADLDNAYWGGDRGI	180
Cel19A Ori 181	PTPRTSYAINSTSPGTDAAAQAAAFAACSAALYNNRILSQPAPNGITSTSYASTLLQHAQ	240
Cel19A Mod 181	PTPRTSYAINSTSPGTDAAAQAAAFAACSAALYNNRILSQPAPNGITSTSYASTLLQHAQ	240
Cel19A Ori 241	QLYNFATNSSVPQVTYQASEPSVADAYASSGFQDELAIAALFISLAGNSSDAYPQASQVY	300
Cel19A Mod 241	QLYNFATNSSVPQVTYQASEPSVADAYASSGFQDELAIAALFISLAGNSSDAYPQASQVY	300
Cel19A Ori 301	RKQGLSKHLEDDAVFNWDEKSPGVALLAAQIAQKYPELANGTGVDWKSIDLNNYFDRIVSN	360
Cel19A Mod 301	RKQGLSKHLEDDAVFNWDEKSPGVALLAAQIAQKYPELANGTGVDWKSIDLNNYFDRIVSN	360
Cel19A Ori 361	SGRSFLTSGGLLYPGDSDDATLNPALNAAMLLLRADSGLASSEKQSAYRQFAQSQID	420
Cel19A Mod 361	SGRSFLTSGGLLYPGDSDDATLNPALNAAMLLLRADSGLASSEKQSAYRQFAQSQID	420
Cel19A Ori 421	YFLGNNPMTVQYMGVHPNAPSNPHSALATGATPQDIANIDTVPEHEAYVLYGGVVGPN	480
Cel19A Mod 421	YFLGNNPMTVQYMGVHPNAPSNPHSALATGATPQDIANIDTVPEHEAYVLYGGVVGPN	480
Cel19A Ori 481	DDDLFWDLRSDWVESEVGLDYVAPVVTIAARELVSGAGDPWYTQLQAGSYEERRPGGQPC	540
Cel19A Mod 481	DDDLFWDLRSDWVESEVGLDYVAPVVTIAARELVSGAGDPWYTQLQAGSYEERRPGGQPC	540
Cel19A Ori 541	DAAISAGCRGHDWRVGVKIVMGALVGVGTGLVVLSLGTVWVVLAYRNRIKI	590
Cel19A Mod 541	DAAISAGCRGHDWRVGVKIVMGALVGVGTGLVVLSLGTVWVVLAYRNRIKI	590

Figura 15. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *Cel19A*.

La secuencia “*Cel19A Ori*” representa la secuencia obtenida del GenBank (AY094488.1) y la secuencia “*Cel19A Mod*” representa la secuencia modificada reportada por Chánez *et al.* (2013).

Para el gen *mfc*, se analizó la secuencia nucleotídica optimizada y reportada por Cháñez *et al.* (2013) como se muestra en la figura 16.

```

1   atggcaagcgggtgcggcaggtgcgggcgtgacgagcgagattgacagattaagaagatcagatatcaccgtgcatgttaa
81  tgttgggtgtaacattaatcatggtcaggtgtccatccgcttctgcaaaagcgtaaagcatttccgttcgggtacctgtg
161 ttgctggccttgggcctataatgacggtagcaagggtgcatatcgtgactttattaccaacactacaactgggcccgtacct
241 gaaaacagccttgaagtgggagcattgagccgaaccgtggccgaaaaactaccagccgggtctgaacatggtgacgg
321 cctgcgcaatcacgggtattaaggtgctggtcacaacctggtctggagcgtggataataccgtccagaactgggtgaagg
401 cgctgcacggcgatgaactgctgaaagtggttcatgatcacatcgttgaaacatcaataccttcaaaggcctggtcgaa
481 cactgggatgtgaataacgagaatttgcatggccagtggtatcagcaccaactgaatgataacggttacaacctggagct
561 gtttcgcatgcccagccgagaccgaaatgtgaaactgtttctgaaactacaacgtggttagcaattcgtactcta
641 cgaatgactatttgcgcaaggccaacagttcaaggctgcaaatgctggtctgtacggcctgggtgctgacgtgcccacttc
721 ggtgatgaaagcgaccagaaccgggtactaaacagcgcctggatacgtggcccaagtcgggtgctgacgtgcccacttc
801 cgagctggcaggttgttgcgagcagatgagaaccgtcgcgaggacttctacgagcacggttgaccgttctgtatggccacc
881 acgctggcagggcattctgtatgtggggcttttgggacaaagcgcactggcgtggtgctcgcgctgctggttgcgtggt
961 gacaacttcaactgacggcggcaggccgtcgtgtcctggaactggttggagcatcgttggatgacggagcaaacccataa
1041 cctggccgagccagcgaattcaccgtgctggtgcttccacgggtgattatgaggttccaggtgattgttcaaggccaggagc
1121 aactaatctgctgacagccttccagcctgggtaagtgcgacaccgtcaacatcaatgtttcctac

```

Figura 16. Secuencia nucleotídica codificante del gen *mfc* procedente de *Ampullaria crossean* optimizada y reportada por Cháñez *et al.* (2013).

Posteriormente se buscó la secuencia codificante en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de la celulasa multifuncional mediante el número de acceso EU599577.1 identificando el codón de inicio y el codón de paro (Figura 17).

```

1   atgccctctggtgctgctggtgctggggtgaccagcagatcgaccgactgagaagaagcgacataacggttcacgtgaa
81  tgttgggtgtaacatcaaccacggtaagtgagcattcagatgttacaagagaagcattcccgttcgggacatgtg
161 tggccgctgggctacaacgatgggtccaaggagcataaccgggatttcatccaccagcactacaactgggcccgtgcca
241 gaaaactcactcaagtgggctagcatcgaacctaacaggggacaaaagaactatcagcctggcctaaacatgcttcacgg
321 actgagaaatcacgggattaaggtgagaggtcacaacctggtgtggtctgtcgaatacgggtgcagaactgggtcaagg
401 ctctgcatggggatgagctgcaaaagggtgtccatgaccacatcgtggaaccatcaacacatttaagggattagtgag
481 cactgggatgtgaacaacgagaacctgcatggcagtggtaccagatcaactgaatgacaatggctacaacctggaact
561 gttccgtatcgacacgcccggcaccgcaactcttctcaacgactacaacggttgttccaacagttattcaa
641 caaacgactatcttgcacaaggtcaacagtttaaggccgctaatgtgggtctttacggttgggtgcccagtgccacttt
721 ggcgacgaaaagcgaccagaaccggtaactaagcaactctggatactttagctcaagtggcgtgcccactctggccac
801 tgagttggatgtggttagcttccgatgagaacagacgagcggacttctacgagcacgctgacagctctgtacggccatc
881 atgccgtggaggcatcctcatgtggggcttctgggacaaaggcccactggcgtggcgcagagctgctcttgttgcgga
961 gacaacctgcagctgacggcggcggacgtcgcgtgctggagctctttgagcacaggtggatgacagacgagacgcacaa
1041 cctggcagcgggactcagttcacagtacgggttccatggcgactacgaggtgcaagtcatcgtccagggtcaagagc
1121 aactaacctgaggcagacgttctggtgggcaacgggtccccacaccgtcaacattaatgttagctag

```

Figura 17. Secuencia nucleotídica codificante del gen *mfc*

Obtenida por el GenBank con número de acceso EU599577.1 procedente de *Ampullaria crossean*. Subrayado en amarillo se encuentra el codón de inicio y codón de paro (Cheng *et al.*, 2009).

La secuencia nucleotídica codificante del gen *mfc* obtenida del GenBank (EU599577.1) fue traducida con la ayuda de la herramienta ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal® (<https://web.expasy.org/translate/>) obteniendo un total de 395 aminoácidos (Figura 18).

```
MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFGTCVAAWAYNDGSKGAYRDFIHQHYNWAVP  
ENSLKWASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGKVRGHNLVWSVDNTVQNWVKALHGDELKVVHDHIVETINTFKGLVE  
HWDVNNENLHGQWYQHLNDNGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVSNSYSTNDYLRQQQFKAANVGLYGLGAQCHF  
GDESDPEPGTKQRDLTAQVGVPIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGILMWGFWDKAHWRGARAALVVG  
DNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFHGDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNPHTVNINVS
```

Figura 18. Secuencia de aminoácidos del gen *mfc* de *Ampullaria crossean*

La secuencia nucleotídica fue traducida mediante herramienta ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal® reportada en el GenBank con el número de accesoión EU599577.1.

La secuencia optimizada y reportada por Chánez *et al.* (2013) fue traducida y alineada con respecto a la secuencia de aminoácidos del gen *mfc* reportada en el GenBank mediante el Software SerialCloner 2.6.1, obteniendo un 99.75% (Figura 19).

Similarity: 395/395 (99.75 %)

<i>mfc</i> Ori 1	MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPPFGTCVAAWAYN	60
<i>mfc</i> Mod 1	MPSGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPPFGTCVAAWAYN	60
<i>mfc</i> Ori 61	DGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKWSIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGKIKVRGHNL	120
<i>mfc</i> Mod 61	DGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKWSIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGKIKVRGHNL	120
<i>mfc</i> Ori 121	VWSVDNTVQNWVKALHGDLELRKVVHDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLND	180
<i>mfc</i> Mod 121	VWSVDNTVQNWVKALHGDLELRKVVHDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLND	180
<i>mfc</i> Ori 181	NGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVSNSYSTNDYLRQGGQFKAAANVGLYGLGAQCHF	240
<i>mfc</i> Mod 181	NGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNVVSNSYSTNDYLRQGGQFKAAANVGLYGLGAQCHF	240
<i>mfc</i> Ori 241	GDESPEPGTKQRLDTLAQVGVPWIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGIL	300
<i>mfc</i> Mod 241	GDESPEPGTKQRLDTLAQVGVPWIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGIL	300
<i>mfc</i> Ori 301	MWGFWDKAHWRGARAALVVGDNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFH	360
<i>mfc</i> Mod 301	MWGFWDKAHWRGARAALVVGDNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFH	360
<i>mfc</i> Ori 361	GDYEVQVIVQGGQEHNLNRQTFSLGNPHTVNINVS	395
<i>mfc</i> Mod 361	GDYEVQVIVQGGQEHNLNRQTFSLGNPHTVNINVS	395

Figura 19. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *mfc*.

La secuencia “*mfc* Ori” representa la secuencia obtenida del GenBank (EU599577.1) y la secuencia “*mfc* Mod” representa la secuencia modificada reportada por Chánez *et al.* (2013).

Se observó el cambio de una alanina por una prolina en la posición dos, este cambio fue producto de una optimización de codones. Al revisar la bibliografía se encontró que ambos aminoácidos tienen una carga neta de 0 (Zondlo, 2013).

Las secuencias de aminoácidos del gen *mfc*, tanto de la reportada por Chánez *et al.* (2013) como la del GenBank (EU599577.1) fueron modeladas tridimensionalmente utilizando el programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) y se analizaron las estructuras por medio del programa PyMOL ver. 2.0 (Pymol, 2010) (<http://pymol.org>) haciendo una superposición de ambas estructuras para verificar que el cambio de A por P en el segundo sitio no afectaba el sitio catalítico de la enzima.

Gómez-torres *et al.* (2018) analizó, expresó y caracterizó la celulasa *mfc*; en su estudio identificó el sitio activo de la celulasa multifuncional, este sitio activo presenta una forma

de hendidura (Figura 20), este tipo de estructura se ha reportado que permite la unión aleatoria de numerosas unidades de azúcares presentes en sustratos poliméricos, se sabe que esta estructura se presenta comúnmente en enzimas con actividades como: endocelulasas, quitinasas, α -amilasas, xilanasas, β -1,3-glucanasas y β -1,4-glucanasas (Davies y Henrissat, 1995).

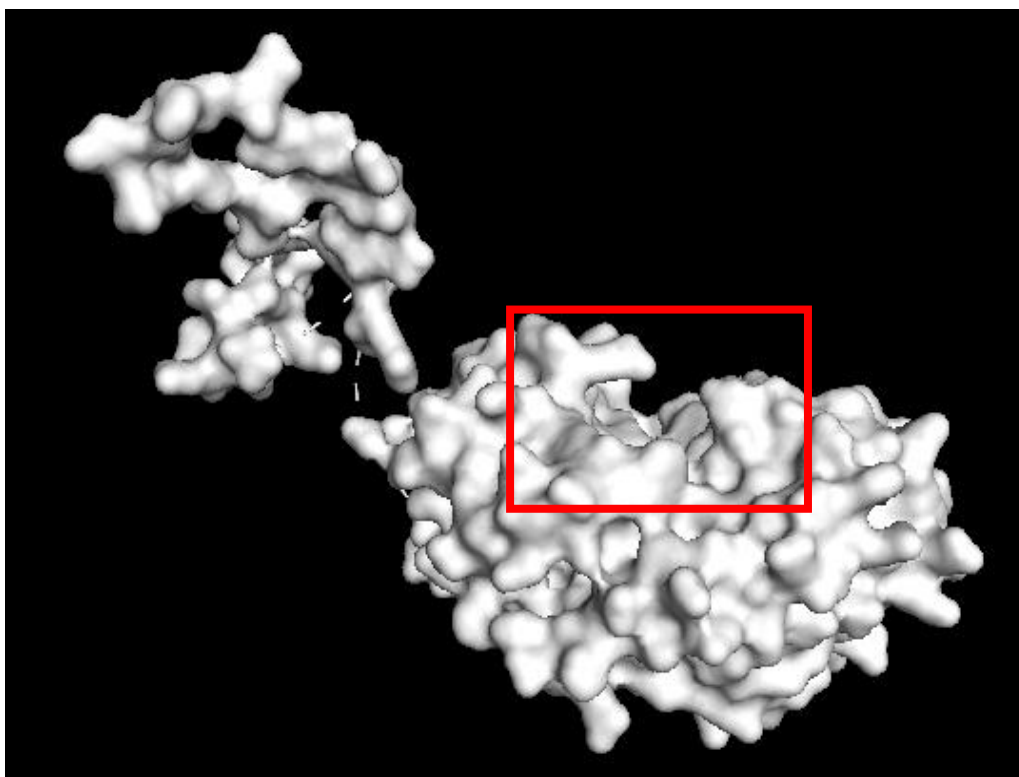


Figura 20. Sitio activo en forma de hendidura de celulasa multifuncional (*mfc*).

Imagen diseñada mediante PyMOL ver. 2.0. a partir de la secuencia reportada en el GenBank (EU599577.1) (Gómez-Torres *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2008).

Esto se relaciona con la actividad múltiple que presenta la enzima descrita por Wang *et al.* (2003). El sitio catalítico de la enzima codificada por el gen *mfc* está compuesto dos residuos de ácido glutámico, uno de estos (Glu¹⁷²) funciona como donador de protones y el segundo (Glu²⁷³) tiene una función de nucleófilo (Gómez-Torres *et al.*, 2018), al revisar ambas estructuras tridimensionalmente se observó que el sitio catalítico no se ve afectado estructuralmente por el cambio de aminoácidos, la prolina en la secuencia optimizada se representa en la región punteada de la Figura 21, así como también se representa la superposición de la estructura original así como la secuencia optimizada, por lo que este

cambio de aminoácidos no supondría un cambio en la actividad enzimática de la proteína codificada por el gen de *mfc*.

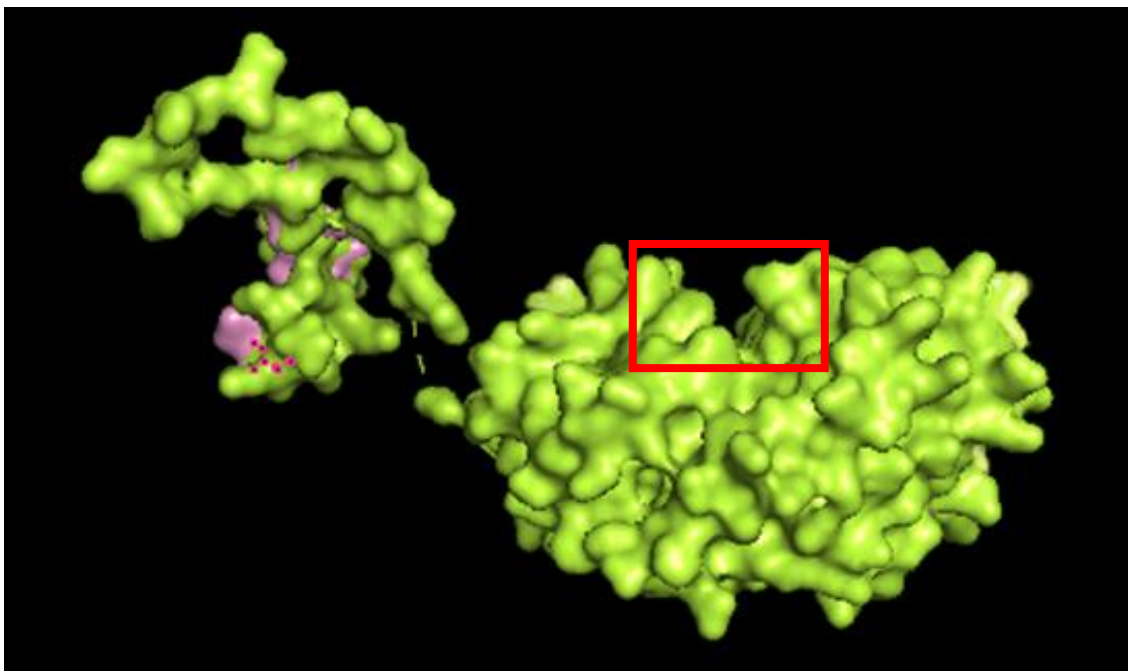


Figura 21. Superposición de las estructuras de la proteína EGX.

En color verde, estructura modelada a partir de la secuencia reportada en el GenBank (EU599577.1) (Cheng *et al.* 2009) y en color rosa la estructura modelada a partir de la secuencia reportada por Cháñez *et al.* (2013). Ambas estructuras fueron modeladas mediante PyMOL ver. 2.0. el recuadro rojo representa la región catalítica y la zona punteada representa la localización de la prolina en la secuencia optimizada.

De esta manera se pudo analizar que la optimización realizada por Cháñez *et al.* (2013) a pesar de tener un cambio de un aminoácido (A por P), al identificar la zona del sitio catalítico, así como la posición del cambio de aminoácidos no debería verse afectada su actividad enzimática.

7.3 Diseño *in silico* y análisis de restricción de vectores de expresión

Con el propósito de simular y detectar posibles errores durante el diseño de los dos vectores de expresión a utilizar en la transformación de cloroplastos del presente trabajo, se utilizó el software SnapGene ver. 2.4.1 para el análisis de secuencias, esto tomando como base el vector de expresión pES6 (Figura 9) (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016). Se

diseñó la construcción pRCY-1 (pES6 + *Ce/9A*) (Figura 22) de 9.501 kb conteniendo el gen de interés *Ce/9A* (1.842 kb) flanqueado con los sitios de restricción *EcoRI/HindIII*.

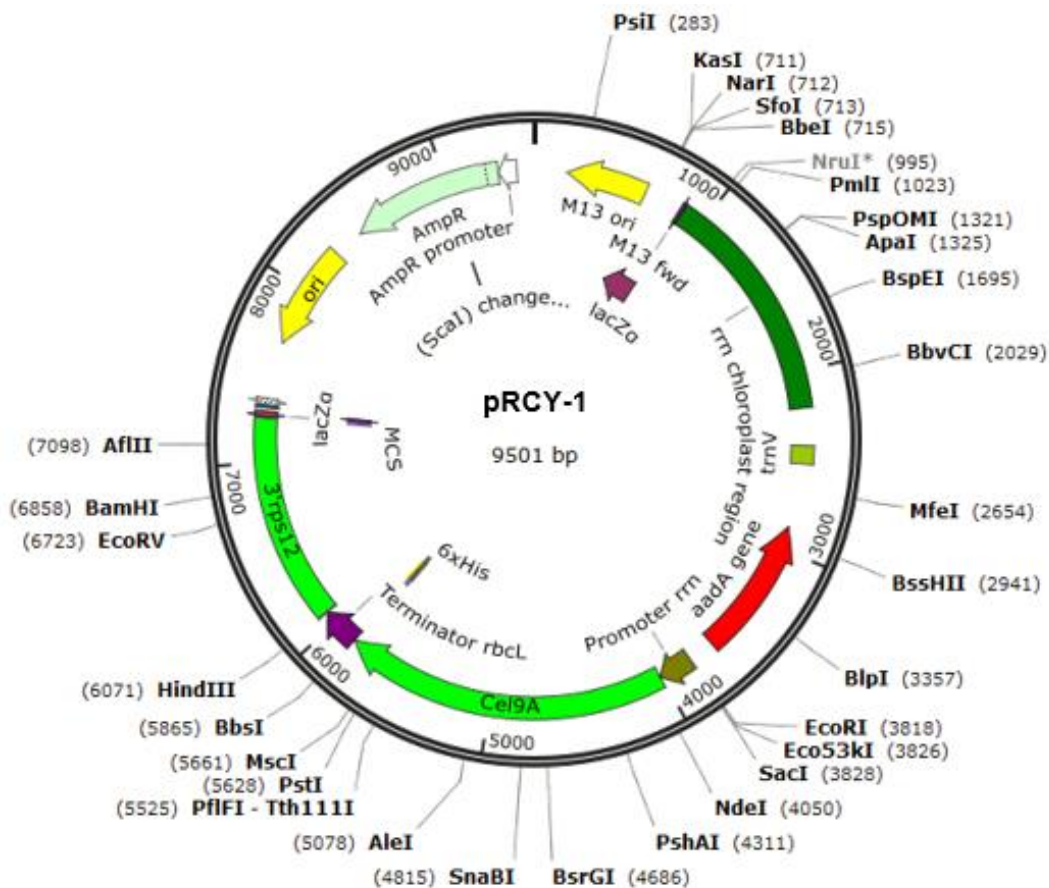


Figura 22. Vector pRCY-1.

El cual contiene el gen *Ce/9A* el cual codifica para una endoglucanasa (flecha verde), el vector de resistencia a ampicilina AmpR (flecha verde claro), un gen de resistencia a espectinomycin/estreptomycin *aadA* (flecha roja), un terminador *rbcL* (flecha morada) y un promotor *rrm* (flecha dorada) y los sitios de recombinación homóloga *rrn16S/3' rps12* (banda verde oscuro y verde), se eliminaron y repararon los sitios de restricción *NheI/XbaI* del vector pES6 para integrar el gen *Ce/9A* el cual esta flanqueado por los sitios de restricción *EcoRI/HindIII*. Este vector fue diseñado con el Software de SnapGene 2.4.1.

De igual manera se diseñó la construcción pRCY-2 (pES6 + *mfc*) (Figura 23) de 8.916 kb, con el gen *mfc* (1.257 kb) flanqueado con los sitios de restricción *EcoRI/HindIII*.

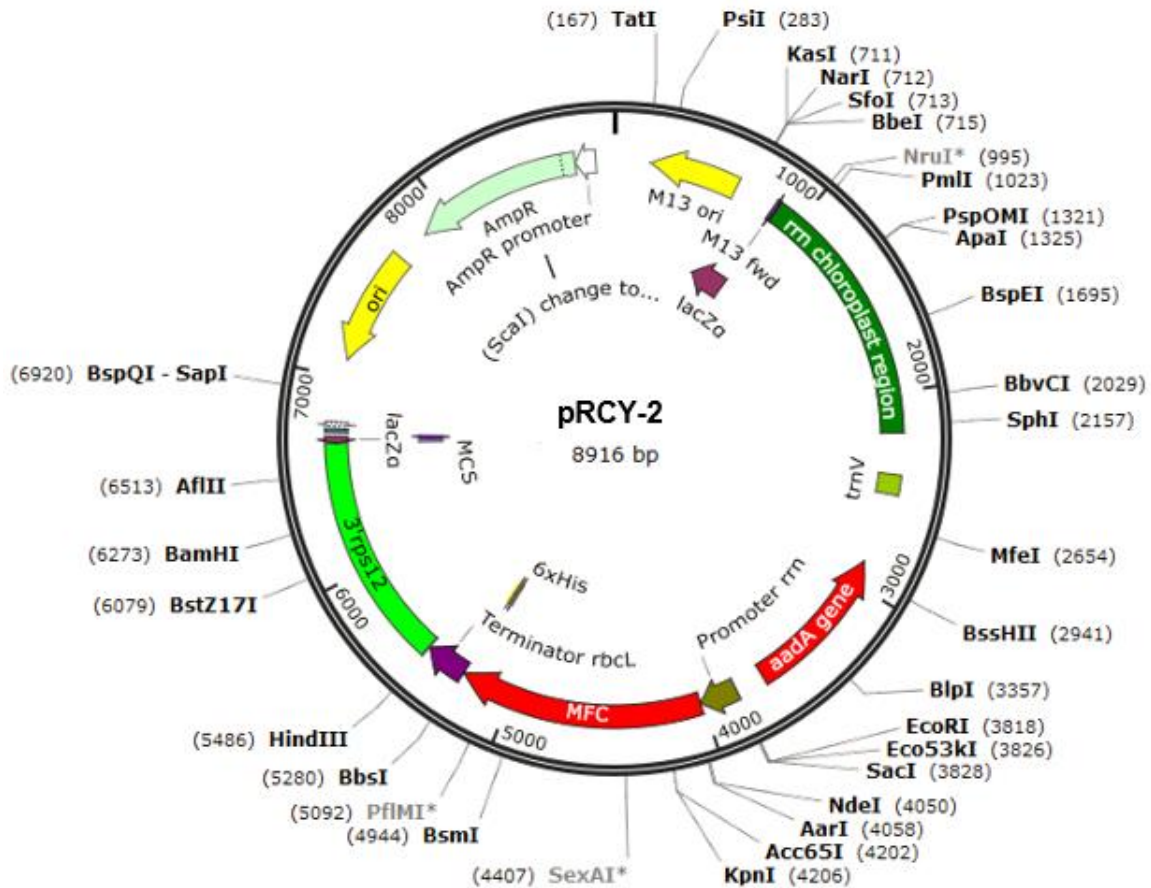


Figura 23. Vector pRCY-2.

El cual contiene el gen *mfc* que codifica para una celulasa multifuncional (flecha roja central), además contiene un gen de resistencia a ampicilina AmpR (flecha verde claro), un gen de resistencia a espectinomina/estreptomicina *aadA* (flecha roja derecha), un terminador *rbcl* y un promotor *rm* (flecha dorada) y los sitios de recombinación homóloga *rm16S/3'rps12* (banda verde oscuro y verde claro), se eliminaron y repararon los sitios de restricción *NheI/XbaI* del vector pES6 para integrar el gen *mfc* el cual esta flanqueado por los sitios de restricción *EcoRI/HindIII*. este vector fue diseñado con el Software de SnapGene 2.4.1.

A partir de ADN plasmídico de los vectores pES6, PJ401Cel9A y PJ404mfc, se realizaron dos ligaciones de los genes *Cel9A* y *mfc* con el vector pES6, eliminando la región codificante del gen *bgI1* (2,589 pb) que contenía este vector, el cual fue reemplazada por los genes de interés obteniendo los vectores pRCY-1 y pRCY-2.

Los vectores obtenidos a partir de la ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , estas células fueron subcultivadas para obtener una

biomasa suficiente de *E. coli* conteniendo el vector pRCY-1 (Figura 24A) y el vector pRCY-2 (Figura 24B) y así poder realizar una extracción de ADN plasmídico mediante el protocolo de TENS (He, 2011), posteriormente, se caracterizaron los vectores con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* y el vector pES6 fue caracterizado con *XbaI/NheI* (Figura 24C).

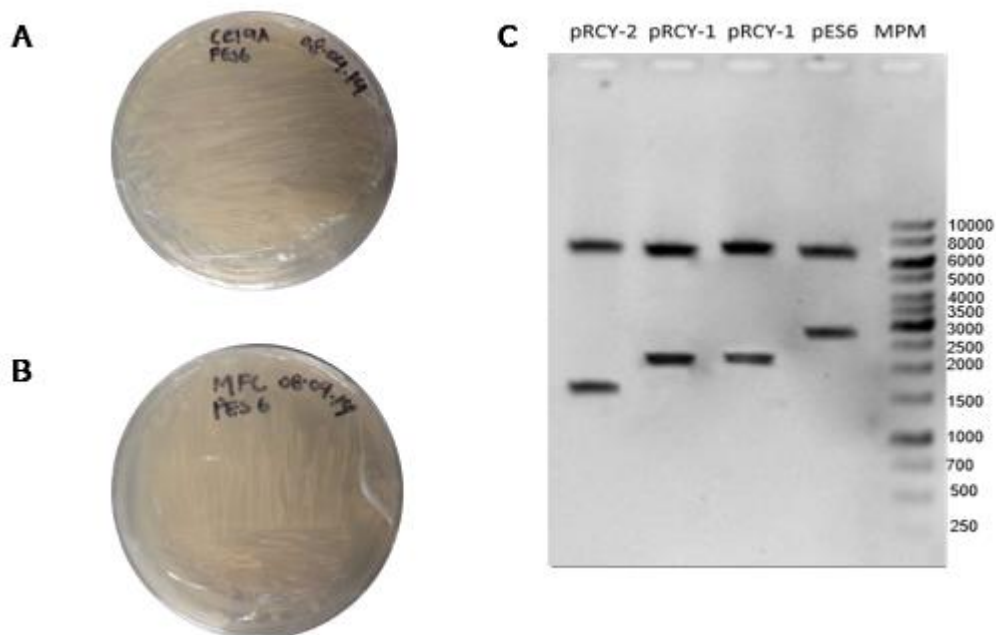


Figura 24. Cepas de *E. coli* DH5 α transformado con pRCY-1, pRCY-2.

A) Cepa subcultivada transformada con pRCY-1 B) Cepa subcultivada transformada con pRCY-2 C) Análisis de restricción pRCY-1 (7,248 pb y 2,253 pb) y pRCY-2 (7,248 pb y 1,668 pb) caracterizados con *EcoRI/HindIII* y pES6 (7,696 pb y 2,589 pb) caracterizado con *XbaI/NheI* (Invitrogen, California, Estados Unidos).

La caracterización del vector pRCY-2 resultante mostró dos fragmentos, uno de 7,248 pb que corresponde al vector pES6 linealizado y uno de 1,668 pb que corresponde al gen *mfc*. La caracterización de pRCY-1 presentó dos fragmentos, uno de 7,248 pb (vector pES6 linealizado) y otro de 2,253 pb correspondiente al gen *Cel9A*. La caracterización del vector pES6 presentó dos fragmentos uno de 7,696 pb y otro de 2,589 pb correspondiente al gen *bgl1*. Estos resultados muestran el patrón correspondiente a cada una de las bandas esperadas por lo que se confirma la construcción de pRCY-1 y pRCY-2 fueron realizadas de manera eficiente.

7.4 Transformación de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana por biobalística

De las plantas de tabaco cultivadas se tomaron hojas jóvenes para ser bombardeadas de acuerdo a Svab y Maliga (1993) y Lutz *et al.* (2006). Las hojas fueron sometidas a una pistola de bombardeo (Bio-Rad, Munich, Alemania), utilizando micropartículas de oro de 0.6 μm , las cuales son de un tamaño óptimo, ya que se ha reportado que en la transformación cloroplastídica partículas de oro dentro de un diámetro de 0.6 a 0.1 μm han dado como resultado, rangos altos de expresión estable (O'Brien y Lummis, 2011). Diez placas fueron bombardeadas con el vector pRCY-1 (Figura 25A) y diez cajas con el vector pRCY-2 (Figura 25B) con aproximadamente 15 μg de ADN (Maliga y Tungsuchat-Huang, 2014). Las hojas bombardeadas se incubaron por 24 h a 27°C en oscuridad para permitir la regeneración del tejido y posteriormente fueron cortadas en piezas de 3 x 3 mm (Figura 25C) y se colocaron en medio RMOP.

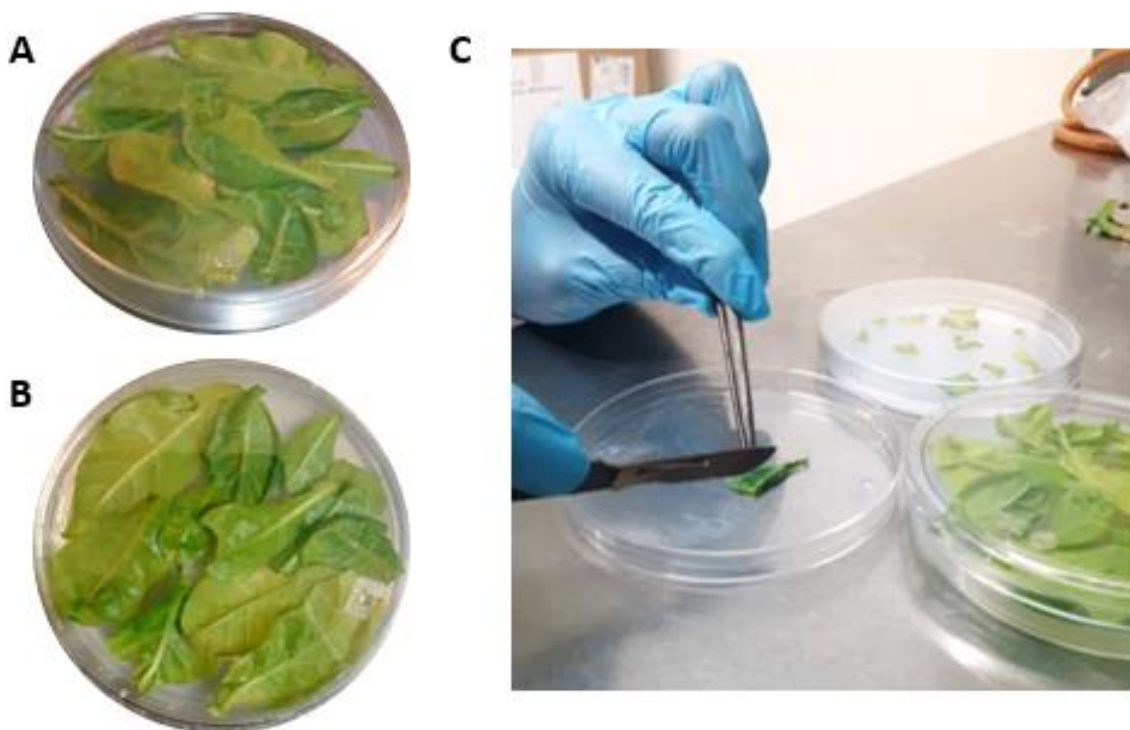


Figura 25. Tejido bombardeado de *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana.

- A) Plantas *N. tabacum* bombardeadas con pRCY-2 B) Plantas *N. tabacum* bombardeadas con pRCY-1
C) Corte de las hojas de tabaco bombardeadas.

7.5 Rondas de selección

Las rondas de selección se realizaron a partir del tejido bombardeado con $\sim 1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y cortado en piezas de 3 x 3 mm de pRCY-1 y pRCY-2 (Tabla 5). El evento de transformación se lleva a cabo solo en unos pocos plástidos y, mediante diversas rondas de selección, se eliminan poblaciones de plástidos no transformados (Nugent *et al.*, 2006). Se obtuvieron aproximadamente 600 explantes de cada construcción los cuales fueron subcultivados en medio RMOP para iniciar la selección de clonas transformantes, las hojas se presentaron cloróticas a partir de la tercera semana.

El proceso de regeneración, comenzó a partir de la quinta semana en medio suplementado con 500 mg L^{-1} de espectinomicina (Figura 26), se ha reportado que la velocidad de regeneración de explantes empieza a partir de dos a tres semanas posteriores al bombardeo (Maliga y Tungsuchat-Huang, 2014). Los explantes fueron nombrados conforme se fueron observando durante la primera ronda de selección y ese nombre permaneció hasta la regeneración de las plantas.

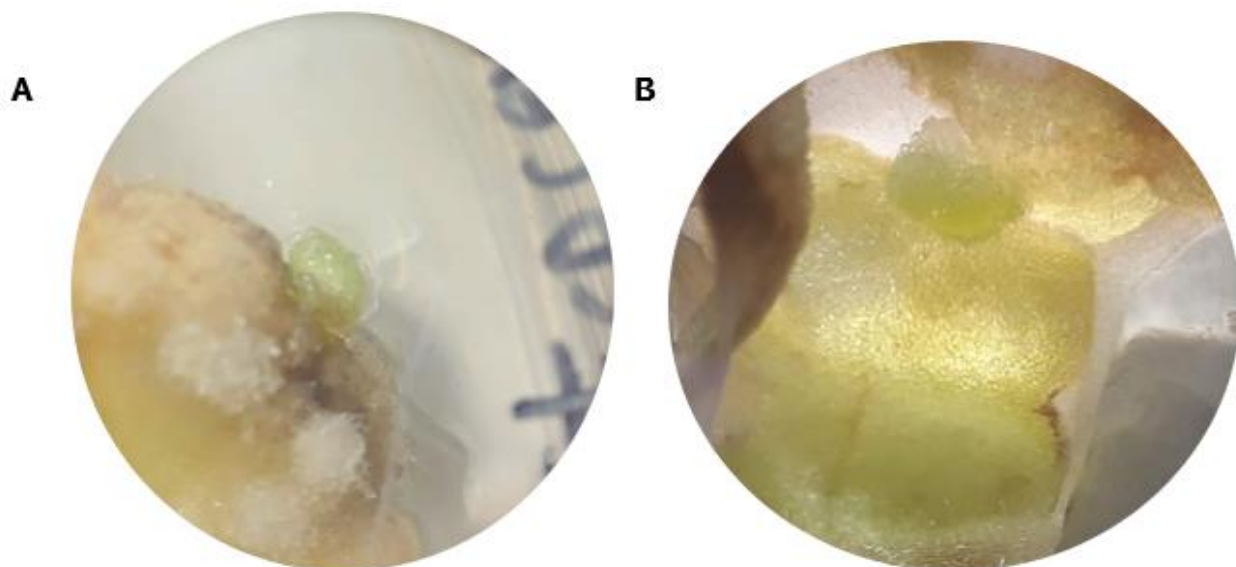


Figura 26. Observación de los primeros brotes y tejido clorótico cinco semanas posteriores a la transformación.

A) tejido bombardeado con el vector pRCY-1 (el cual contiene el gen *Ce/9A*) B) Tejido bombardeado con el vector pRCY-2 (el cual contiene el gen *mfc*).

La segunda ronda de selección es necesaria para evitar un brote quimérico de plástidos transformados y no transformados dando como resultado una baja producción de proteínas recombinantes (Skarjinskaia *et al.*, 2003). El gen marcador de selección utilizado fue *aadA*, que inactiva diversos antibióticos del tipo amino glucósido causado por una adenilación, esta enzima confiere resistencia a espectinomicina/estreptomicina (Davaranah *et al.*, 2009) y se ha reportado dar una resistencia hasta más de 100 veces que la conferida por la mutante rRNA 16S (Svab y Maliga, 1993).

En la primera ronda de selección para pRCY-1 (Figura 27A) se obtuvieron 18 brotes regenerantes, de los cuales 11 explantes fueron los que mostraron un crecimiento y desarrollo eficiente hasta formar plántulas (NtcppRCY-1-01, NtcppCRY-1-02, NtcppRCY-1-03, NtcppRCY-1-04, NtcppRCY-1-05, NtcppRCY-1-06, NtcppRCY-1-09, NtcppRCY-1-11, NtcppRCY-1-12, NtcppRCY-1-18 y NtcppRCY-1-20, respectivamente), mientras que para pRCY-2 (Figura 27D) se obtuvieron 21 brotes regenerantes, de los cuales siete explantes mostraron crecimiento y desarrollo eficiente hasta formar plántulas (NtcppRCY-2-06, NtcppRCY-2-07, NtcppRCY-2-16, NtcppRCY-2-17, NtcppRCY-2-18, NtcppRCY-2-19 y NtcppRCY-2-21, respectivamente).

De las 11 y 7 plántulas obtenidos de la primera selección, se obtuvo una hoja de cada plántula y se seccionaron por la mitad para una segunda ronda de selección. Una mitad de la hoja fue colocada en medio RMOP suplementado con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina mientras que la otra mitad fue colocada en medio RMOP suplementado con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina/estreptomicina para diferenciar las células mutantes de las transformantes (Figura 27B y 27E). De las 11 hojas de las plántulas regenerantes de pRCY-1 colocadas en segunda selección, únicamente cinco explantes fueron capaces de sobrevivir hasta desarrollar plántula (NtcppRCY-1-0, NtcppRCY-1-02, NtcppRCY-1-03, NtcppRCY-1-04, NtcppRCY-1-05), mientras que de las siete hojas de las plántulas transformantes con pRCY-2, únicamente tres fueron capaces de sobrevivir en la segunda selección hasta formar plántula (NtcppRCY-2-06, NtcppRCY-2-07, NtcppRCY-2-17).

Las plántulas NtcppRCY-1-01, NtcppRCY-1-02, NtcppRCY-1-03, NtcppRCY-1-04, NtcppRCY-1-05, NtcppRCY-2-06, NtcppRCY-2-07, NtcppRCY-2-17 obtenidas de segunda selección, fueron sometidas a una tercera selección para inducir un estado homoplásmico; para esto, una hoja de cada plántula fue cortada y colocada en medio RMOP suplementado

con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina (Figura 27C y 27F) obteniendo cuatro brotes para el vector pRCY-1 con capacidad de formar plántula (NtcppRCY1-02, NtcppRCY1-03, NtcppRCY1-04 y NtcppRCY1-05, respectivamente), mientras que para el vector pRCY-2 se obtuvieron dos plántulas regenerantes de tercera selección (NtcppRCY-2-07 y NtcppRCY-2-17, respectivamente).

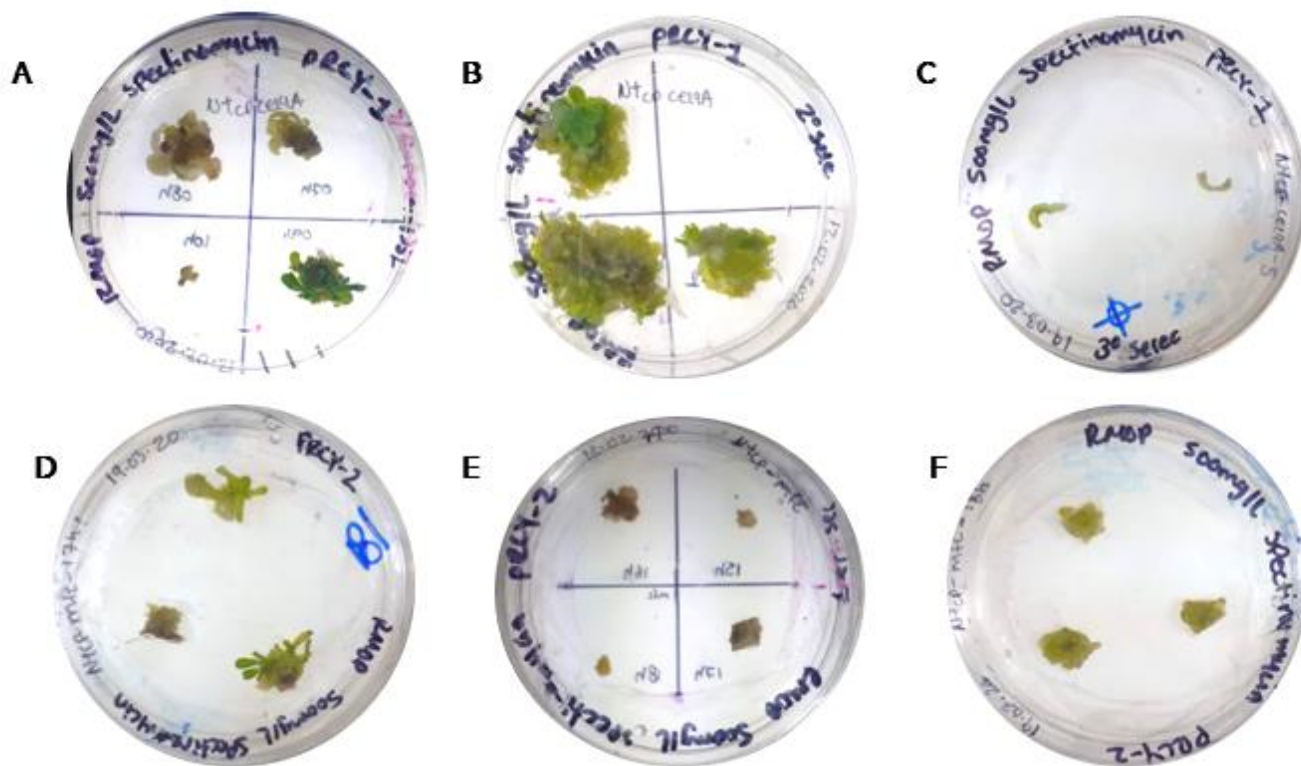


Figura 27. Rondas de selección de explantes transformados.

A) Primera ronda de selección explantes transformados con pRCY-1 B) Segunda ronda de selección explantes transformados con pRCY-1 C) Tercera ronda de selección explantes transformados con pRCY-1 D) Primer ronda de selección explantes transformados con pRCY-2 E) Segunda ronda de selección explantes transformados con pRCY-2 F) Tercera ronda de selección explantes transformados con pRCY-2.

Tabla 5. Explantes NtcpRCY-1 y NtcpRCY-2 obtenidos durante las rondas de selección.

NtcpRCY-1			NtcpRCY-2		
Primera Selección	Segunda Selección	Tercera Selección	Primera selección	Segunda selección	Tercera Selección
Espectinomicina	Estreptomina/ Espectinomicina	Espectinomicina	Espectinomicina	Estreptomina/ Espectinomicina	Espectinomicina
(500 mg L ⁻¹)	(500 mg L ⁻¹)	(500 mg L ⁻¹)	(500 mg L ⁻¹)	(500 mg L ⁻¹)	(500 mg L ⁻¹)
01	01		06	06	
02	02	02	07	07	07
03	03	03	16		
04	04	04	17	17	17
05	05	05	18		
06			19		
09			21		
11					
12					
18					
20					

Tomando en cuenta que el número de explantes bombardeados fueron alrededor de 600 para cada uno de los vectores, se realizó una relación obteniendo para el vector pRCY-1 un 0.6% de eficiencia de transformación mientras que para el vector pRCY-2 se obtuvo un 0.3%. Estos resultados se pueden comparar con otros análisis realizados anteriormente donde se han obtenido valores de eficiencia de transformación plasmídica de 2.2×10^{-4} % (Riggs y Bates, 1986) y 3.9×10^{-5} % (Deshayes *et al.*, 1985). Otros análisis más recientes han reportado valores entre 2.85% hasta 3.14%, en donde se ha logrado expresar de manera estable y eficiente diversas celulasas en el plasmoma de tabaco (Espinoza-Sánchez *et al.*, 2016).

7.6 Regeneración de plantas transformadas

Debido a que la transformación plastidal se llevó a cabo por recombinación homóloga de manera dirigida hacia la región *rrn16S/3'rps12* localizada en la zona de Repetidos Invertidos (IRA/IRB), se seleccionó un brote de cada línea de tercera selección para ser regeneradas en medio RM y posteriormente realizar los análisis de integración y posterior desarrollo en invernadero. Ya que todos los brotes fueron bombardeados bajo las mismas condiciones y al pasar las tres rondas de selección previamente descritas, el gen de interés se debe de encontrar en la misma región para todos los brotes de ambas líneas.

Para realizar posteriores análisis se seleccionó una plántula proveniente de tercera selección con buen crecimiento y desarrollo. Para la línea pRCY-1 se seleccionó el brote NtcppRCY-1-05 (Figura 28B y 28C) mientras que para la línea pRCY-2 el brote NtcppRCY-2-17 (Figura 28E y 28F). De igual manera se regeneraron plantas de tabaco de tipo silvestre como control (Figura 28A y 28D).



Figura 28. Regeneración de plantas *N. tabacum* var. *Petite Havana* transformadas.

A) *N. tabacum* tipo silvestre B) Planta regenerada NtcppRCY-1-05 C) Planta regenerada NtcppRCY-1-05 D) *N. tabacum* tipo silvestre E) Planta regenerada NtcppRCY-2-17 F) Planta regenerada NtcppRCY-2-17.

7.7 Análisis de integración mediante PCR

De las plantas desarrolladas de tercera selección (NtcppRCY-1-05 y NtcppRCY-2-17, respectivamente) se obtuvieron 200 mg de hoja para realizar extracción de ADN total el cual fue utilizado para realizar el análisis de integración utilizando primers específicos para cada uno de los genes. El análisis de PCR mostró la amplificación de fragmento de 736 pb (Figura 29) para el gen *mfc* los cuales amplifican una región específica dentro del gen de interés desde la posición 4084 a 4818 pb.

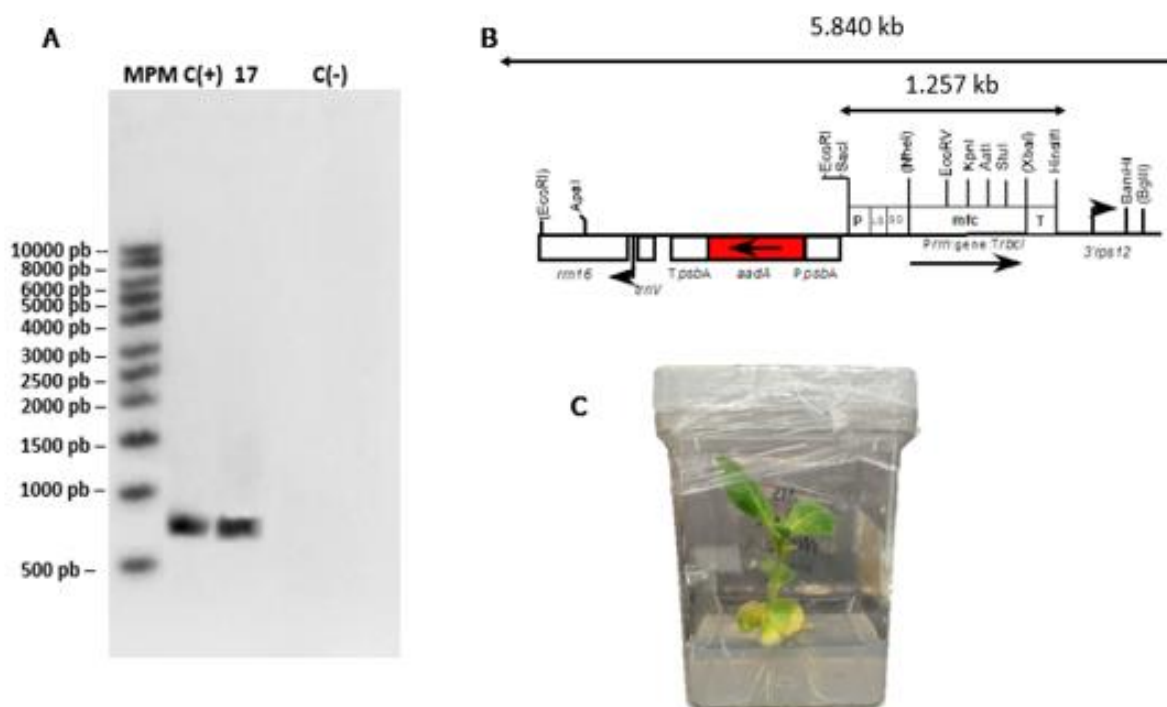


Figura 29. Análisis de integración por PCR de pRCY-2.

A) Carril 1: MPM 1kb Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), Carril 2: Control positivo (ADN plasmídico pRCY-2), Carril 3: Amplificación positiva de 736 pb de tejido vegetal NtcppRCY-2-17, Carril 5: Control negativo B) Construcción pRCY-2. Se Muestran los sitios de restricción más importantes, así como los elementos regulatorios y regiones de recombinación homóloga. La construcción se realizó sustituyendo el gen *bgl1* del vector pES6 eliminando los sitios de restricción *NheI/XbaI*. C) Planta transplastomérica regenerada NtcppRCY-2-17.

Para el análisis del gen *Ce19A* se obtuvo un amplicón de 705 pb (Figura 30), esta amplificación se encuentra dentro de la secuencia desde la posición 4354 hasta 5057 pb.

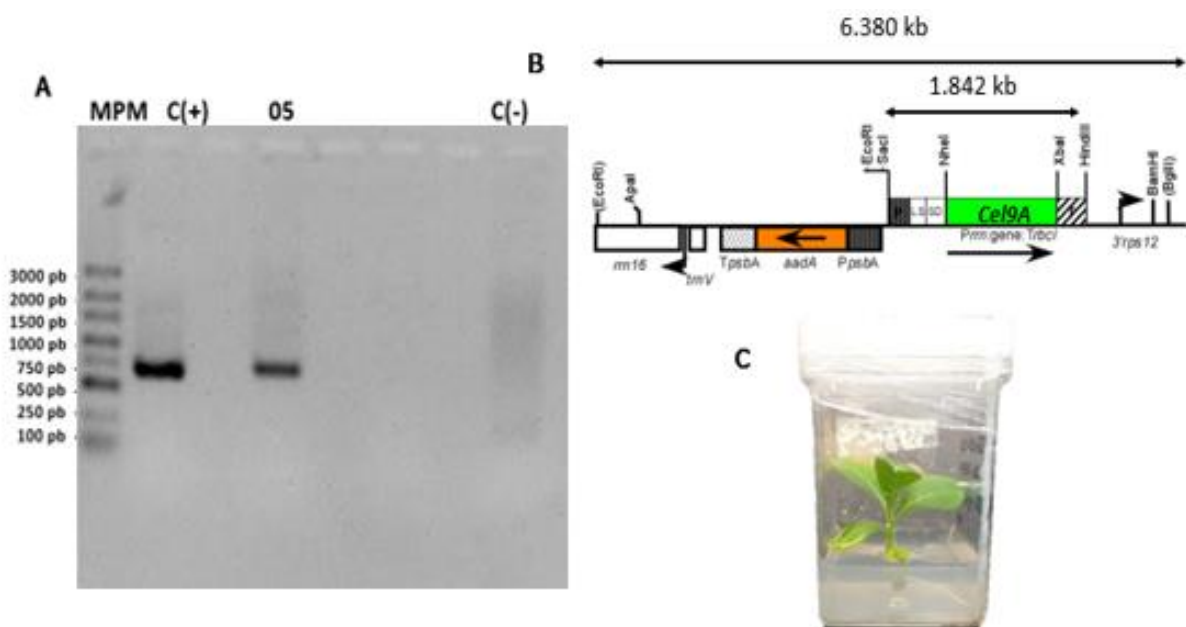


Figura 30. Análisis de integración por PCR de pRCY-1.

A) Carril 1: MPM 1kb Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), Carril 2: Control positivo (ADN plasmídico pRCY-1), ADN plasmídico pRCY-1, Carril 4: amplificación positiva de 705 pb ADN tejido regenerado de NtcpRCY-1-05, Carril 8: Control negativo. B) Construcción pRCY-1. Se Muestran los sitios de restricción más importantes, así como los elementos regulatorios y regiones de recombinación homóloga. La construcción se realizó sustituyendo el gen *bg/1* del vector pES6 eliminando los sitios de restricción *NheI/XbaI*. C) Planta transplastomérica regenerada NtcpRCY-1-05.

Ambos análisis de integración confirman que los genes de interés se encuentran presentes dentro del genoma de ambas plantas, ya que la integración específica de un sitio en el genoma del cloroplasto (*rrn16S/3'rps12*) mediante la recombinación homóloga de las secuencias de ADN del cloroplasto flanqueantes presentes en los vectores pRCY-1 y pRCY-2 diseñados para la integración en cloroplasto, elimina las preocupaciones del efecto de posición, que se observa con frecuencia en las líneas transgénicas nucleares (Daniell, 2002), con esta información se sustenta la afirmación de que la integración de los genes de interés se encuentran en cada una de las líneas de las plantas.

7.8 Traspaso de plantas a condiciones de invernadero

Después de la regeneración del tejido vegetal y la confirmación de la integración de los genes *Cel9A* y *mfc* en las plantas de tabaco, las plantas *in vitro* analizadas se pasaron a Peat Moss, lavando muy bien la raíz (Figura 31A) para ser aclimatadas durante tres semanas (Figura 31B) para posteriormente pasarlas a invernadero (Figura 32).

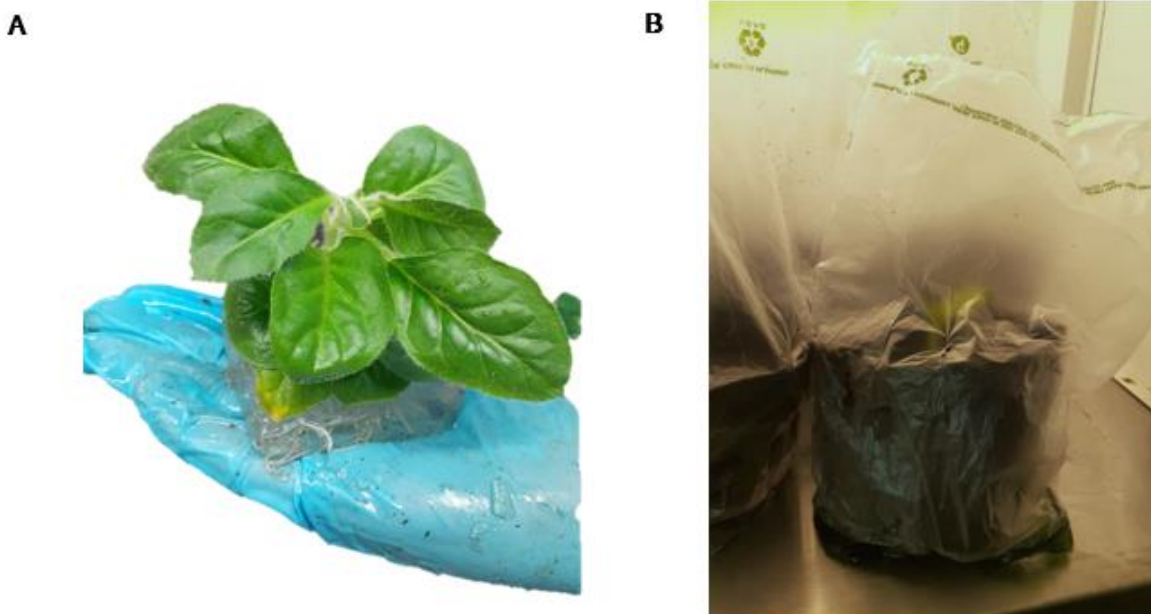


Figura 31. Traspaso y aclimatación de plantas transformadas de *N. tabacum* var. Petite Havana.

A) Traspaso de plantas de medio RM a Peat Moss B) Plantas en proceso de aclimatación con bolsas plásticas.

Durante el desarrollo de las dos líneas en invernadero se observó que la planta NtcppRCY-1-05 (Figura 32A) presentó una coloración más clara en hojas en comparación a las plantas silvestres (Figura 32C); por otro lado, la planta NtcppRCY-2-17 mostró un crecimiento retrasado y hojas cloróticas (Figura 32B) durante la regeneración en medio y durante el desarrollo en invernadero en comparación a las plantas tipo silvestres (Figura 32C).

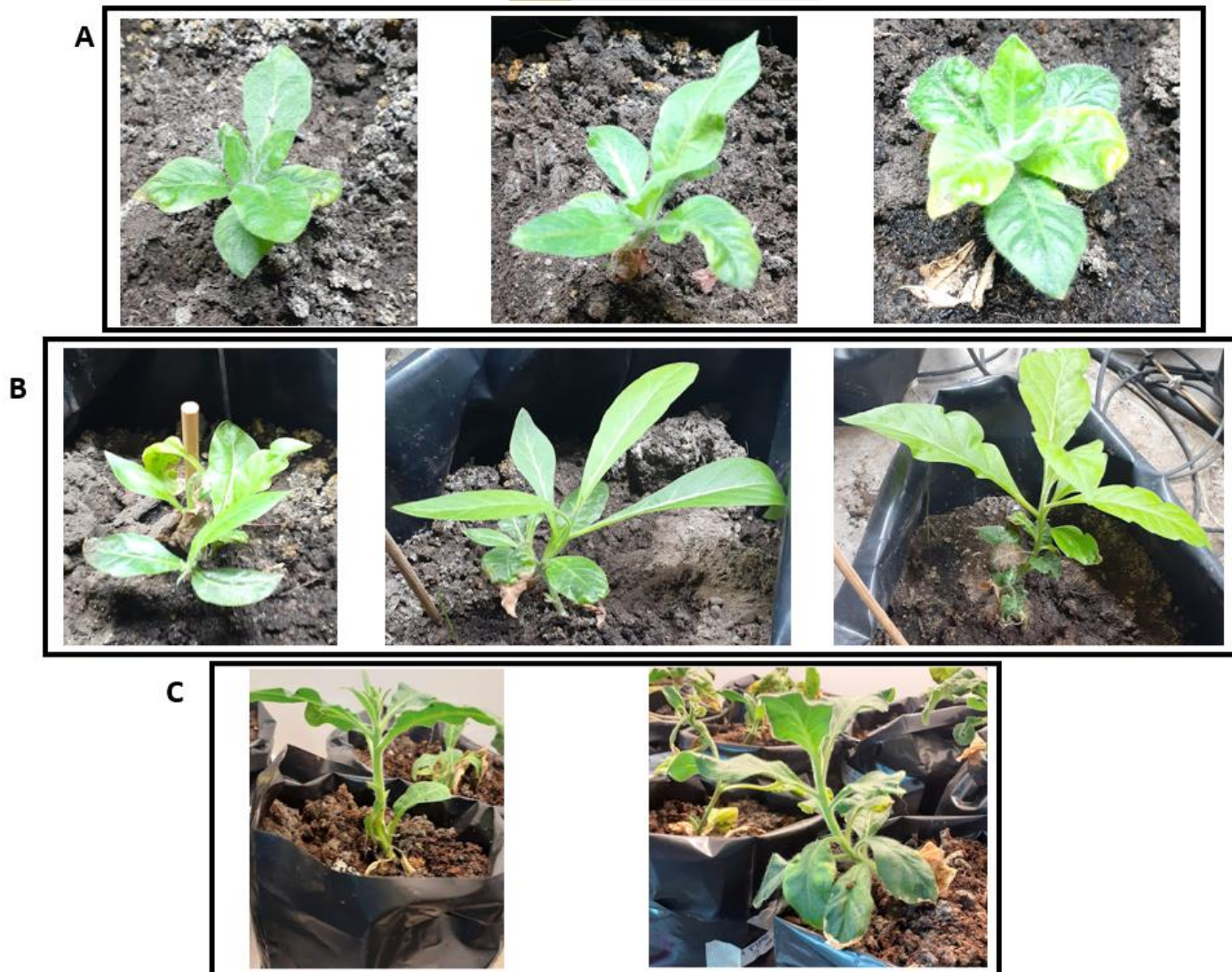


Figura 32. Desarrollo de plantas transformadas en Invernadero.

A) Plantas NtcpRCY-2-17. Donde se muestra un retraso en el crecimiento y hojas cloróticas en comparación a las plantas tipo silvestre B) Plantas NtcpRCY-1-05 donde se muestra un color mas claro en comparación a las plantas silvestres C) Plantas tipo silvestre.

Se ha reportado que probablemente los efectos pleiotrópicos puedan atribuirse a varios factores, como la interferencia de las proteínas recombinantes con la estructura y función de los tilacoides, la interferencia de nuevos marcos de lectura abiertos dentro del metabolismo citoplásmico o niveles más bajos de producción de ATP (Pelletier y Budar, 2007). Anteriormente se han analizado retrasos en el crecimiento de las plantas posteriores a la transformación cloroplastídica, Hasunuma *et al.* (2008) reportó tasas de

crecimiento lentas de sus partes aéreas en comparación con las plantas de tipo silvestre, pero la altura final de las plantas transplásticas no fueron significativamente diferentes de las plantas de tipo silvestre en la etapa de iniciación de la flor, por otro lado, Rigano *et al.* (2009) expresó la proteína inmunogénica A27L del virus de la vaccinia y reportó que las plantas transplásticas crecieron más lentamente y tenían un fenotipo clorótico y se relacionó directamente con el nivel reducido de subunidades grandes y pequeñas de Rubisco. Scotti *et al.* (2009) informó de un fenotipo de crecimiento más lento y clorótico desde el cultivo *in vitro* hasta la madurez y una disminución de proteínas de hasta el 50% cuando la poliproteína VIH-1 Pr55^{gag} se expresó en cloroplastos de tabaco. Se obtuvieron fenotipos similares con la expresión de la proteína VIH-1^{Nef} en plantas de tabaco y tomate; el 30% de las líneas transplásticas tenían tejidos amarillos (Zhou *et al.*, 2008). Lössl *et al.* (2003) expresaron polihidroxitirato (PHB) en plástidos de tabaco obteniendo un crecimiento retrasado de las plantas en comparación al tipo silvestre, concluyeron que las cantidades de PHB (1.7% TSP) que se encontraron en las hojas de material cultivado heterotróficamente pueden haber sido una consecuencia del crecimiento retardado en condiciones en las que la energía disponible para el crecimiento se utilizó para sintetizar el PHB. Sin embargo, Ruiz y Daniell (2005) propusieron que el fenotipo anormal se relaciona directamente con el gen expresado, ya que hay reportes con expresión de proteínas de menos del 2% TSP con efectos pleiotrópicos (Waheed *et al.*, 2011) e informes con una sobreexpresión de hasta del 72% TSP sin efectos adversos (Ruhlman *et al.*, 2010) sugiere que los efectos pleiotrópicos no son efecto de la sobreexpresión de proteínas.

VIII. CONCLUSIÓN

1. Se logró la integración de los genes *Cel9A* de *Phanerochaete Chrysosporium* y *mfc* de *Ampullaria crossean* en vectores de expresión diseñados para la recombinación homóloga en la región *rrn16S/3'rps12* de cloroplastos de tabaco.
2. Dos líneas de plantas fueron desarrolladas conteniendo los genes *Cel9A* y *mfc*, lo cual fue confirmado mediante tres rondas de selección de espectinomicina/estreptomicina y posteriormente los análisis de integración mediante PCR.

IX. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la integración y expresión de los genes *Cel9A* y *mfc* mediante Southern blot y Northern blot.
2. Realizar un análisis enzimático de ambas líneas y evaluar su actividad.
3. Evaluar el fenotipo de las plantas de tabaco.
4. Recolectar semillas de las plantas transformadas y analizar si los genes de interés (*Cel9A* y *mfc*) fueron segregados a la descendencia.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adem, M., Beyene, D., y Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 13(1), 30. doi:10.1186/s13007-017-0179-1
- Albarracín, R. M., Becher, M. L., Farran, I., Sander, V. A., Corigliano, M. G., Yácono, M. L., Pariani, S., López, E. S., Veramendi, J., y Clemente, M. (2015). The fusion of *Toxoplasma gondii* SAG1 vaccine candidate to *Leishmania infantum* heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts. *Biotechnology journal*, 10(5), 748-759. doi:10.1002/biot.201400742
- Alcarraz-Curi, M., Flores-Paucarima, A., y Godoy-Alcarraz, J. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. *Instituto De Investigación De La Facultad De Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica Y Geográfica*, 13, 97-102.
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, A. R., Waqas, M., Kang, S.-M., Khan, M. A., Lee, S.-M., y Lee, I.-J. (2016). Complete Chloroplast Genome of *Nicotiana otophora* and its Comparison with Related Species. *Frontiers in Plant Science*, 7(843). doi:10.3389/fpls.2016.00843
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., y Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, 93(4), 614-636. doi:10.1111/tpj.13807
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411-421. doi:10.1016/s0958-1669(99)00003-8
- Barla, F. G., y Kumar, S. (2019). Tobacco biomass as a source of advanced biofuels. *Biofuels*, 10(3), 335-346. doi:10.1080/17597269.2016.1242684
- Becerra-Pérez, L. A. (2009). La industria del etanol en México *Economía UNAM*, 6, 82-98.
- Béné, C., Barange, M., Subasinghe, R., Pinstrop-Andersen, P., Merino, G., Hemre, G.-I., y Williams, M. J. F. S. (2015). Feeding 9 billion by 2050—Putting fish back on the menu. *Food Security*, 7(2), 261-274. doi:10.1007/s12571-015-0427-z
- Bhalla, A., Bischoff, K. M., Sani, R. K. J. F. i. b., y biotechnology. (2015). Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 84. doi:10.3389/fbioe.2015.00084
- Bo, Y., Wang, K., Wu, Y., Cao, H., Cui, Y., y Wang, L. (2020). Establishment of a chloroplast transformation system in *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2959-2965. doi:10.1007/s10811-020-02159-4

- Bobik, K., y Burch-Smith, T. M. (2015). Chloroplast signaling within, between and beyond cells. *Frontiers in Plant Science*, 6(781). doi:10.3389/fpls.2015.00781
- Bock, R. (2015). Engineering Plastid Genomes: Methods, Tools, and Applications in Basic Research and Biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 211-241. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040212
- Boynton, J., Gillham, N., Harris, E., Hosler, J., Johnson, A., Jones, A., Randolph-Anderson, B., Robertson, D., Klein, T., y Shark, K. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240(4858), 1534. doi:10.1126/science.2897716
- Brown, R., Saxena, M., y Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*, 1(5), 149-156. doi:10.1016/S1360-1385(96)80050-1
- Callejas, E., y Quezada, V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*(157), 75-82.
- Calviño, M., y Messing, J. (2012). Sweet sorghum as a model system for bioenergy crops. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 323-329. doi:10.1016/j.copbio.2011.12.002
- Caroca, R., Howell, K. A., Hasse, C., Ruf, S., y Bock, R. (2013). Design of chimeric expression elements that confer high-level gene activity in chromoplasts. *The Plant Journal*, 73(3), 368-379. doi:10.1111/tpj.12031
- Carrer, H., Hockenberry, T. N., Svab, Z., y Maliga, P. (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Molecular and General Genetics MGG*, 241(1), 49-56. doi:10.1007/BF00280200
- Castiglia, D., Sannino, L., Marcolongo, L., Ionata, E., Tamburino, R., De Stradis, A., Cobucci-Ponzano, B., Moracci, M., Cara, F., y Scotti, N. (2016). High-level expression of thermostable cellulolytic enzymes in tobacco transplastomic plants and their use in hydrolysis of an industrially pretreated *Arundo donax* L. biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 9. doi:10.1186/s13068-016-0569-z
- Castilho, L., Medronho, R., y Alves, T. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71, 45-50. doi:10.1016/S0960-8524(99)00058-9
- Ceccarelli, S., Grando, S., Maatougui, M., Michael, M., Slash, M., Haghparast, R., Rahmanian, M., Taheri, A., Al-Yassin, A., Benbelkacem, A., Labdi, M., Mimoun, H., y Nachit, M. (2010). Plant breeding and climate changes. *The Journal of Agricultural Science*, 148(6), 627-637. doi:10.1017/S0021859610000651
- Chávez, S., Rascón, Q., y Siqueiros, T. (2013). *Clonación, caracterización y expresión de genes codificantes para celulasas*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, Chih., México.
-



- Chen, C.-C., Luo, H., Han, X., Lv, P., Ko, T., Peng, W., Huang, C., Wang, K., Gao, J., Zheng, Y., Yunyun, Y., Zhang, J., Yao, B., y Guo, R.-T. (2014). Structural perspectives of an engineered β -1,4-xylanase with enhanced thermostability. *Journal of Biotechnology*, 189. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.030
- Cheng, L., Li, H.-P., Qu, B., Huang, T., Tu, J.-X., Fu, T.-D., y Liao, Y.-C. (2010). Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. *Plant cell reports*, 29(4), 371-381. doi:10.1007/s00299-010-0828-6
- Cheng, S., Yang, P., Guo, L., Lin, J., y Lou, N. (2009). Expression of multi-functional cellulase gene *mfc* in *Coprinus cinereus* under control of different basidiomycete promoters. *Bioresource Technology*, 100, 4475-4480. doi:10.1016/j.biortech.2009.04.021
- Chiyoda, S., Linley, P. J., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., Yokota, A., y Kohchi, T. (2007). Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Research*, 16(1), 41-49. doi:10.1007/s11248-006-9027-1
- Christopherson, M., Suen, G., Bramhacharya, S., Jewell, K. A., Aylward, F. O., Mead, D., y Brumm, P. (2013). The genome sequences of *Cellulomonas fimi* and “*Cellvibrio gilvus*” reveal the cellulolytic strategies of two facultative anaerobes, transfer of “*Cellvibrio gilvus*” to the genus *Cellulomonas*, and proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. *PloS one*, 8(1), e53954. doi:10.1371/journal.pone.0053954
- Coconi-Linares, N., Magaña-Ortíz, D., Guzmán-Ortiz, D. A., Fernández, F., Loske, A. M., y Gómez-Lim, M. A. (2014). High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(22), 9283-9294. doi:10.1007/s00253-014-6105-9
- Daniell, H. (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature biotechnology*, 20(6), 581-586. doi:10.1038/nbt0602-581
- Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M., y Chang, W.-J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17(1), 134. doi:10.1186/s13059-016-1004-2
- Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., y Streatfield, S. J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science*, 14(12), 669-679. doi:10.1016/j.tplants.2009.09.009
- Davarpanah, S., Jung, S., Kim, Y., Park, Y.-I., Min, S., Liu, J., y Jeong, W. (2009). Stable Plastid Transformation in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Biology*, 52(3), 244-250. doi:10.1007/s12374-009-9023-0

- Davarpanah, S. J., Jung, S. H., Kim, Y. J., Park, Y.-I., Min, S. R., Liu, J. R., y Jeong, W. J. (2009). Stable plastid transformation in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Biology*, 52(3), 244-250. doi:10.1007/s12374-009-9023-0
- Davies, G., y Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859. doi:10.1016/S0969-2126(01)00220-9
- De Marchis, F., Wang, Y., Stevanato, P., Arcioni, S., y Bellucci, M. (2008). Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Research*, 18(1), 17. doi:10.1007/s11248-008-9193-4
- de Vries, J., Sousa, F. L., Bölter, B., Soll, J., y Gould, S. B. (2015). YCF1: A Green TIC? *The Plant cell*, 27(7), 1827-1833. doi:10.1105/tpc.114.135541
- Deshayes, A., Herrera-Estrella, L., y Caboche, M. J. T. E. J. (1985). Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France)*, 4(11), 2731-2737. doi:10.1002/j.1460-2075.1985.tb03996.x
- Ding, M., Teng, Y., Yin, Q., Zhao, J., y Zhao, F. (2008). The N-terminal cellulose-binding domain of EGXA increases thermal stability of xylanase and changes its specific activities on different substrates. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(11), 949-954. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00481.x
- Dively, G. P., Huang, F., Oyediran, I., Burd, T., y Morsello, S. (2020). Evaluation of gene flow in structured and seed blend refuge systems of non-Bt and Bt corn. *Journal of Pest Science*, 93(1), 439-447. doi:10.1007/s10681-016-1637-y
- Doetsch, N. A., Favreau, M. R., Kuscuoglu, N., Thompson, M. D., y Hallick, R. B. (2001). Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic psbK operon. *Current genetics*, 39(1), 49-60. doi:10.1007/s002940000174
- Drechsel, O., y Bock, R. (2010). Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids. *Nucleic acids research*, 39(4), 1427-1438. doi:doi.org/10.1093/nar/gkq978
- Dufourmantel, N., Pelissier, B., Garçon, F., Peltier, G., Ferullo, J. M., y Tissot, G. (2004). Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant molecular biology*, 55(4), 479-489. doi:10.1007/s11103-004-0192-4
- Dutra, J. C., da Terzi, S. C., Bevilaqua, J. V., Damaso, M. C., Couri, S., Langone, M. A., y Senna, L. F. (2007). Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 431-443): Springer.
- Escudero, J., Tatiana, Z., Merchán, D., Javier, N., Zapata, G., Yesid, O., y Muñoz, M. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de

caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología, Volumen 15, número 1. 2013*, 108-117.

Espinoza-Sánchez, E. A., Álvarez-Hernández, M. H., Torres-Castillo, J. A., Rascón-Cruz, Q., Gutiérrez-Díez, A., Zavala-García, F., y Sinagawa-García, S. R. (2015). Stable expression and characterization of a fungal pectinase and bacterial peroxidase genes in tobacco chloroplast. *Electronic Journal of Biotechnology, 18*, 161-168. doi:10.1016/j.ejbt.2015.03.002

Espinoza-Sánchez, E. A., Torres-Castillo, J. A., Rascón-Cruz, Q., Zavala-García, F., y Sinagawa-García, S. R. (2016). Production and characterization of fungal β -glucosidase and bacterial cellulases by tobacco chloroplast transformation. *Plant Biotechnology Reports, 10*(2), 61-73. doi:10.1007/s11816-016-0386-7

Farquhar, J., Zerkle, A. L., y Bekker, A. (2011). Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis. *Photosynthesis Research, 107*(1), 11-36. doi:10.1007/s11120-010-9594-0

Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., y Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology, 19*, 1-13. doi:10.1590/S1677-04202007000100001

Gan, Q., Jiang, J., Han, X., Wang, S., y Lu, Y. (2018). Engineering the chloroplast genome of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Front Plant Sci, 9*, 439. doi:10.3389/fpls.2018.00439

Garvey, M., Klinger, J., Klose, H., Fischer, R., y Commandeur, U. (2014). Expression of Recombinant Cellulase *Cel5A* from *Trichoderma reesei* in Tobacco Plants. *Journal of Visualized Experiments*(88), e51711. doi:10.3791/51711

Gautam, S., Bundela, P., Pandey, A., Awasthi, M., y Sarsaiya, S. J. I. j. o. e. s. (2010). Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *International journal of environmental sciences, 1*(4), 656.

Georgianna, D. R., Hannon, M. J., Marcuschi, M., Wu, S., Botsch, K., Lewis, A. J., Hyun, J., Mendez, M., y Mayfield, S. P. (2013). Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Research, 2*(1), 2-9. doi:10.1016/j.algal.2012.10.004

Goldschmidt-Clermont, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic acids research, 19*(15), 4083-4089. doi:10.1093/nar/19.15.4083

- Gómez-Romero, J., Villarreal-Solís, M., y Villarreal-Solís, F. (2014). La cultura empresarial y su relación con los estilos de aprendizaje en la industria de celulosa, cartón y papel en México. *Investigación administrativa*, 43(113), 7-27.
- Gómez-Torres, I., Rascón, Q., y Siqueiros, T. (2018). *Caracterización y expresión de una enzima celulasa multifuncional (mfc) recombinante*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, Chih., México.
- González, A., y Castañeda, Y. (2008). Biocombustibles, biotecnología y alimentos: Impactos sociales para México. *Argumentos (México, D.F.)*, 21, 55-83.
- Gopi, S., Balakrishnan, P., Chandradhara, D., Poovathankandy, D., y Thomas, S. (2019). General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field. *Materials Today Chemistry*, 13, 59-78. doi:10.1016/j.mtchem.2019.04.012
- Green, B. R. (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The Plant Journal*, 66(1), 34-44. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04541.x
- Greiner, S., Golczyk, H., Malinova, I., Pellizzer, T., Bock, R., Börner, T., y Herrmann, R. G. (2020). Chloroplast nucleoids are highly dynamic in ploidy, number, and structure during angiosperm leaf development. *The Plant Journal*, 102(4), 730-746. doi:10.1111/tpj.14658
- Gruenstaeudl, M., Nauheimer, L., y Borsch, T. (2017). Plastid genome structure and phylogenomics of *Nymphaeales*: conserved gene order and new insights into relationships. *Plant Systematics and Evolution*, 303(9), 1251-1270. doi:10.1007/s00606-017-1436-5
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A. A., Jimenez-Gutierrez, L., y Sotelo-Mundo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *BIOtecnia*, 15, 8. doi:10.18633/bt.v15i3.152
- Guo, R., Ding, M., Zhang, S.-L., Xu, G.-J., y Zhao, F.-K. (2008). Molecular cloning and characterization of two novel cellulase genes from the mollusc *Ampullaria crossean*. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 178, 209-215. doi:10.1007/s00360-007-0214-z
- Guo, R., Ding, M., Zhang, S., Xu, G., y Zhao, F. (2008). Expression and characterization of two secreted His 6 -tagged endo- β -1,4-glucanases from the mollusc *Ampullaria crossean* in *Pichia pastoris*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40, 419-425. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00413.x
- Guo, X., Lin, S.-L., Guo, L.-Q., Lin, J.-F., y Zhi-Wei, Y. (2016). Heterologous expression of the multi-functional cellulase gene (mfc) from the mollusc *Ampullaria crossean* ,

in *Volvariella volvacea*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91, 1-7. doi:10.1080/14620316.2016.1160541

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., y Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. doi:10.1016/j.riam.2013.10.009
- Gutiérrez, C. L., Gimpel, J., Escobar, C., Marshall, S. H., y Henríquez, V. (2012). Chloroplast genetic tool for the green microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Journal of phycology*, 48(4), 976-983. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01178.x
- Hackenberg, N., y Cerrillo, R. N. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *REDESMA*, 2, 49.
- Hasunuma, T., Miyazawa, S. I., Yoshimura, S., Shinzaki, Y., Tomizawa, K. I., Shindo, K., Choi, S. K., Misawa, N., y Miyake, C. (2008). Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *The Plant Journal*, 55(5), 857-868. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03559.x
- He, F. (2011). Plasmid DNA extraction from *E. coli* using alkaline Lysis method. *Biology Protocol*, 30, 1-3.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280 (Pt 2)(Pt 2), 309-316. doi:10.1042/bj2800309
- Hou, B.-K., Zhou, Y.-H., Wan, L.-H., Zhang, Z.-L., Shen, G.-F., Chen, Z.-H., y Hu, Z.-M. (2003). Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Research*, 12(1), 111-114. doi:10.1023/A:1022180315462
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A. J. I. J. o. E. S., y Technology. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3(1), 25-34.
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., y Hidema, J. (2017). Entire Photodamaged Chloroplasts Are Transported to the Central Vacuole by Autophagy. *The Plant cell*, 29(2), 377-394. doi:10.1105/tpc.16.00637
- Jin, S., y Daniell, H. (2015). The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter. *Trends in Plant Science*, 20(10), 622-640. doi:10.1016/j.tplants.2015.07.004
- Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T., y Daniell, H. (2011). Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of β -glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection

from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters. *Plant Physiol*, 155(1), 222-235. doi:10.1104/pp.110.160754

Johar, N., Ahmad, I., y Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 93-99. doi:10.1016/j.indcrop.2011.12.016

Jones, P., y Vasudevan, P. (2010). Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase. *Biotechnology letters*, 32(1), 103-106. doi:10.1007/s10529-009-0119-x

Joshi, C. P., Thammannagowda, S., Fujino, T., Gou, J. Q., Avci, U., Haigler, C. H., McDonnell, L. M., Mansfield, S. D., Mengesha, B., Carpita, N. C., Harris, D., Debolt, S., y Peter, G. F. (2011). Perturbation of wood cellulose synthesis causes pleiotropic effects in transgenic aspen. *Mol Plant*, 4(2), 331-345. doi:10.1093/mp/ssq081

Jung, S., Lee, D.-S., Kim, Y.-O., Joshi, C. P., y Bae, H.-J. (2013). Improved recombinant cellulase expression in chloroplast of tobacco through promoter engineering and 5' amplification promoting sequence. *Plant molecular biology*, 83(4), 317-328. doi:10.1007/s11103-013-0088-2

Juturu, V., y Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203. doi:10.1016/j.rser.2014.01.077

Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yokota, A., y Tomizawa, K.-I. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Research*, 15(2), 205-217. doi:10.1007/s11248-005-3997-2

Kang, S., Park, Y., Lee, J., Hong, S., y Kim, S. W. J. B. t. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91(2), 153-156. doi:10.1016/S0960-8524(03)00172-X

Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S., y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227. doi:10.1016/S0960-8524(00)00118-8

Kaushal, C., Abdin, M. Z., y Kumar, S. (2020). Chloroplast genome transformation of medicinal plant *Artemisia annua*. *Plant biotechnology journal*. doi:10.1111/pbi.13379

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., y Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845. doi:10.1038/nprot.2015.053

- Khan, M. S., y Maliga, P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature biotechnology*, 17(9), 910-915. doi:10.1038/12907
- Kikuchi, S., Asakura, Y., Imai, M., Nakahira, Y., Kotani, Y., Hashiguchi, Y., Nakai, Y., Takafuji, K., Bédard, J., Hirabayashi-Ishioka, Y., Mori, H., Shiina, T., y Nakai, M. (2018). A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import. *The Plant cell*, 30(11), 2677-2703. doi:10.1105/tpc.18.00357
- Kim, J. S., Kim, H. T., y Kim, J.-H. (2015). The Largest Plastid Genome of Monocots: a Novel Genome Type Containing AT Residue Repeats in the Slipper Orchid *Cypripedium japonicum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(5), 1210-1220. doi:10.1007/s11105-014-0833-y
- Klinger, J., Fischer, R., y Commandeur, U. (2015). Comparison of *Thermobifida fusca* Cellulases Expressed in *Escherichia coli* and *Nicotiana tabacum* Indicates Advantages of the Plant System for the Expression of Bacterial Cellulases. *Frontiers in Plant Science*, 6(1047). doi:10.3389/fpls.2015.01047
- Kolotilin, I., Kaldis, A., Pereira, E. O., Laberge, S., y Menassa, R. (2013). Optimization of transplastomic production of hemicellulases in tobacco: effects of expression cassette configuration and tobacco cultivar used as production platform on recombinant protein yields. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 65. doi:10.1186/1754-6834-6-65
- Kong, F., Zhao, H., Liu, W., Li, N., y Mao, Y. (2017). Construction of plastid expression vector and development of genetic transformation system for the seaweed *Pyropia yezoensis*. *Marine Biotechnology*, 19(2), 147-156. doi:10.1007/s10126-017-9736-x
- Kormos, J., Johnson, P. E., Brun, E., Tomme, P., McIntosh, L. P., Haynes, C. A., y Kilburn, D. G. J. B. (2000). Binding site analysis of cellulose binding domain CBDN1 from endoglucanase C of *Cellulomonas fimi* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 39(30), 8844-8852. doi:10.1021/bi000607s
- Kota, S., Lakkam, R., Kasula, K., Narra, M., Qiang, H., Rao Allini, V., Zanmin, H., y Abbagani, S. (2019). Construction of a species-specific vector for improved plastid transformation efficiency in *Capsicum annuum* L. *Biotech*, 9(6), 226. doi:10.1007/s13205-019-1747-z
- Kramzar, L. M., Mueller, T., Erickson, B., y Higgs, D. C. (2006). Regulatory Sequences of Orthologous petD Chloroplast mRNAs are Highly Specific among *Chlamydomonas* Species. *Plant molecular biology*, 60(3), 405-422. doi:10.1007/s11103-005-4477-z
- Kuhad, R. C., Gupta, R., y Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
-

- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. J. I., y research, e. c. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729. doi:10.1021/ie801542g
- Kumar, S., Dhingra, A., y Daniell, H. (2004). Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 136(1), 2843-2854. doi:10.1104/pp.104.045187
- Kumar, S., Dhingra, A., y Daniell, H. (2004). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant molecular biology*, 56(2), 203-216. doi:10.1007/s11103-004-2907-y
- Kuroda, H., y Maliga, P. (2001). Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. *Nucleic acids research*, 29, 970-975. doi:10.1093/nar/29.4.970
- Kusnetsov, V. V. (2018). Chloroplasts: Structure and Expression of the Plastid Genome. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(4), 465-476. doi:10.1134/S1021443718030044
- Lapidot, M., Raveh, D., Sivan, A., Arad, S. M., y Shapira, M. (2002). Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* Species. *Plant Physiol*, 129(1), 7-12. doi:10.1104/pp.011023
- Lee, S., Kang, K., Chung, H., Yoo, S., Xu, X., Lee, S., Cheong, J., Daniell, H., y Kim, M. (2006). Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, 21(3), 401-410.
- Leelavathi, S., Gupta, N., Maiti, S., Ghosh, A., y Siva Reddy, V. (2003). Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Molecular Breeding*, 11(1), 59-67. doi:10.1023/A:1022168321380
- Leister, D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics*, 19(1), 47-56. doi:10.1016/S0168-9525(02)00003-3
- Lelivelt, C., McCabe, M., Newell, C., Bastiaan deSnoo, Van Dun, K., Birch-Machin, I., Gray, J., Mills, K., y Nugent, J. (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant molecular biology*, 58(6), 763-774. doi:10.1007/s11103-005-7704-8
- Li, Fei, J., Cai, Y., Li, Y., Feng, J., y Yao, J. (2009). Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 94-99. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.034
-

- Li, W., Ruf, S., y Bock, R. (2011). Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant molecular biology*, 76(3), 443-451. doi:10.1007/s11103-010-9678-4
- Li, Y., Yin, Q., Ding, M., y Zhao, F. (2009). Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-b-1,4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullaria crosseana*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 153, 149-156. doi:10.1016/j.cbpb.2009.02.011
- Lin, C.-H., Chen, Y. Y., Tzeng, C. C., Tsay, H.-S., y Chen, L.-J. (2003). Expression of a *Bacillus thuringiensis cry1C* gene in plastid confers high insecticidal efficacy against tobacco cutworm. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, 199-210.
- Liu, C., Lin, C., Chen, J., y Tseng, M. (2007). Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep*, 26(10), 1733-1744. doi:10.1007/s00299-007-0374-z
- Longoni, P., Leelavathi, S., Doria, E., Reddy, V. S., y Cella, R. (2015). Production by Tobacco Transplastomic Plants of Recombinant Fungal and Bacterial Cell-Wall Degrading Enzymes to Be Used for Cellulosic Biomass Saccharification. *BioMed Research International*, 2015, 289759. doi:10.1155/2015/289759
- Madanala, R., Gupta, V., Pandey, A. K., Srivastava, S., Pandey, V., Singh, P. K., y Tuli, R. (2015). Tobacco Chloroplasts as Bioreactors for the Production of Recombinant Superoxide Dismutase in Plants, an Industrially Useful Enzyme. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(4), 1107-1115. doi:10.1007/s11105-014-0805-2
- Maliga, P. (2004). Plastid Transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 289-313. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141633
- Maliga, P., y Svab, Z. (2010). Engineering the plastid genome of *Nicotiana sylvestris*, a diploid model species for plastid genetics. In J. Birchler (Ed.), *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols* (Vol. 701). Totowa, NJ: Humana Press.
- Maliga, P., y Tungsuchat-Huang, T. (2014). Plastid transformation in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana sylvestris* by biolistic DNA delivery to leaves. In *Chloroplast Biotechnology* (pp. 147-163): Springer.
- Mejias-Brizuela, N. Y., Orozco Guillén, E., y Galan, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2, 27-41.
- Mett, V., Farrance, C. E., Green, B. J., y Yusibov, V. J. B. (2008). Plants as biofactories. *Biologicals*, 36(6), 354-358. doi:10.1016/j.biologicals.2008.09.001
- Meyers, B., Zaltsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S. V., y Krichevsky, A. J. B. a. (2010). Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and

challenges. *Biotechnology advances*, 28(6), 747-756.
doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.022

Monroy-Licht, A. (2016). *Phanerochaete chrysosporium*, hongo ligninolítico, promisorio en biorremediación, una mirada global. *Micro-Ciencia. Investigación, Desarrollo e Innovación.*, 5, 11-25.

Morgenfeld, M., Lentz, E., Segretin, M. E., Alfano, E. F., y Bravo-Almonacid, F. (2014). Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to enhance accumulation of Human papillomavirus E7 antigen in tobacco chloroplasts. *Mol Biotechnol*, 56(11), 1021-1031. doi:10.1007/s12033-014-9781-x

Morgenfeld, M., Vater, C., Alfano, F., Boccardo, N., y Bravo-Almonacid, F. (2020). Translocation from the chloroplast stroma into the thylakoid lumen allows expression of recombinant epidermal growth factor in transplastomic tobacco plants. *Transgenic Research*, 29, 295-305. doi:10.1007/s11248-020-00199-7

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., y Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673-686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

Muralikrishna, N., Srinivas, K., Kumar, K. B., y Sadanandam, A. (2016). Stable plastid transformation in *Scoparia dulcis* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(4), 575-581. doi:10.1007/s12298-016-0386-7

Murphy, J., y McCarthy, K. (2005). Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, 82(2), 148-166. doi:10.1016/j.apenergy.2004.10.004

Narra, M., Kota, S., Velivela, Y., Ellendula, R., Allini, V. R., y Abbagani, S. (2018). Construction of chloroplast transformation vector and its functional evaluation in *Momordica charantia* L. *Biotech*, 8(3), 140. doi:10.1007/s13205-018-1160-z

Newell, C., Birch-Machin, I., Hibberd, J., y Gray, J. (2003). Expression of Green Fluorescent Protein from Bacterial and Plastid Promoters in Tobacco Chloroplasts. *Transgenic Research*, 12(5), 631-634. doi:10.1023/A:1025812309254

Nugent, G., Coyne, S., Nguyen, T., Kavanagh, T., y Dix, P. (2006). Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. botrytis (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Science*, 170(1), 135-142. doi:10.1016/j.plantsci.2005.08.020

Nugent, G. D., Coyne, S., Nguyen, T. T., Kavanagh, T. A., y Dix, P. J. (2006). Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. botrytis (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Sci*, 170(1), 135-142. doi:10.1016/j.plantsci.2005.08.020

- O'Brien, J., y Lummis, S. (2011). Nano-bioliistics: a method of bioliistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC Biotechnology*, 11(1), 66. doi:10.1186/1472-6750-11-66
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B., y Bock, R. (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The Plant Journal*, 57(3), 436-445. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03702.x
- Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S., Kimura, T. J. B., y reviews, G. e. (1997). Structure of cellulases and their applications. *Biotechnology and Genetic engineering reviews*, 14(1), 365-414. doi:10.1080/02648725.1997.10647949
- Okumura, S., Sawada, M., Park, Y. W., Hayashi, T., Shimamura, M., Takase, H., y Tomizawa, K.-I. (2006). Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Research*, 15(5), 637-646. doi:10.1007/s11248-006-9009-3
- Oliveira, L., Porto, A., y Tambourgi, E. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 97(6), 862-867. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.017
- Payne, Sluiter, y Wolfrum. (2019). El papel del sorgo en energías renovables y biocombustibles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1931(Humana Press). doi:10.1007/978-1-4939-9039-9_18
- Pelletier, G., y Budar, F. (2007). The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 121-125. doi:10.1016/j.copbio.2006.12.002
- Petersen, K., y Bock, R. (2011). High-level expression of a suite of thermostable cell wall-degrading enzymes from the chloroplast genome. *Plant molecular biology*, 76(3-5), 311-321. doi:10.1007/s11103-011-9742-8
- Petersen, K., y Bock, R. (2011). High-level expression of a suite of thermostable cell wall-degrading enzymes from the chloroplast genome. *Plant Mol Biol*, 76(3-5), 311-321. doi:10.1007/s11103-011-9742-8
- Pymol, T. (2010). The PyMOL molecular graphics system. Version 2.0 Schrödinger, LLC. . In: Version.
- Queiroz, L., Maldaner, F., Mendes, É., Sousa, A., D'Allastta, R., Mendonça, G., Mendonça, D., y Aragão, F. (2019). Evaluation of lettuce chloroplast and soybean cotyledon as platforms for production of functional bone morphogenetic protein 2. *Transgenic Research*, 28(2), 213-224. doi:10.1007/s11248-019-00116-7
- Rigano, M. M., Manna, C., Giulini, A., Pedrazzini, E., Capobianchi, M., Castilletti, C., Di Caro, A., Ippolito, G., Beggio, P., De Giuli Morghen, C., Monti, L., Vitale, A., y Cardi,

- T. (2009). Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells. *Plant biotechnology journal*, 7(6), 577-591. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00425.x
- Riggs, C. D., y Bates, G. W. (1986). Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(15), 5602-5606. doi:10.1073/pnas.83.15.5602
- Rodionova, M., Poudyal, R., Tiwari, I., Voloshin, R., Zharmukhamedov, S., Nam, H. G., Zayadan, B., Bruce, B., Hou, H., y Allakhverdiev, S. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8450-8461. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.125
- Romero, S. (2010). Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. *Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 104(2), 331-345.
- Rudsander, U., Denman, S., Raza, S., y Teeril, T. T. J. J. o. a. g. (2003). Molecular features of family GH9 cellulases in hybrid aspen and the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of applied glycoscience*, 50(2), 253-256.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H., y Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature biotechnology*, 19(9), 870. doi:10.1038/nbt0901-870
- Ruhlman, T., Verma, D., Samson, N., y Daniell, H. (2010). The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiol*, 152(4), 2088-2104. doi:10.1104/pp.109.152017
- Ruiz, O., y Daniell, H. (2005). Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of β -ketothiolase. *Plant Physiol*, 138(3), 1232-1246. doi:10.1104/pp.104.057729
- Rye, C., y Withers, S. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current opinion in chemical biology*, 4, 573-580. doi:10.1016/S1367-5931(00)00135-6
- Saba, K., Gottschamel, J., Younus, I., Syed, T., Gull, K., Lössl, A. G., Mirza, B., y Waheed, M. T. (2019). Chloroplast-based inducible expression of ESAT-6 antigen for development of a plant-based vaccine against tuberculosis. *Journal of Biotechnology*, 305, 1-10. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.08.016
- Sánchez, A., Morales, A., Hernández, J., y Barrero, C. (2010). Artículo de revisión: Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1, 61-91.
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 206-209. doi:10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x

- Saranraj, P., Stella, D., Reetha, D. J. I. J. o. B., y Science, B. (2012). Microbial cellulases and its applications. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology Science*, 1, 1-12.
- Saxena, B., Subramaniyan, M., Malhotra, K., Bhavesh, N. S., Potlakayala, S. D., y Kumar, S. (2014). Metabolic engineering of chloroplasts for artemisinic acid biosynthesis and impact on plant growth. *Journal of Biosciences*, 39(1), 33-41. doi:10.1007/s12038-013-9402-z
- Schmidt, J., McGrath, J., Hanson, M., Long, S., y Ahner, B. (2019). Field-grown tobacco plants maintain robust growth while accumulating large quantities of a bacterial cellulase in chloroplasts. *Nature Plants*, 5(7), 715-721. doi:10.1038/s41477-019-0467-z
- Scotti, N., Alagna, F., Ferraiolo, E., Formisano, G., Sannino, L., Buonaguro, L., De Stradis, A., Vitale, A., Monti, L., y Grillo, S. (2009). High-level expression of the HIV-1 Pr55 gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta*, 229(5), 1109-1122. doi:10.1007/s00425-009-0898-2
- Serna, F., Barrera, L., y Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el uso de Biocombustibles. *Journal of technology management & innovation*, 6, 100-114. doi:10.4067/S0718-27242011000100009
- Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., y Fando-Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(2).
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., y Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *Embo j*, 5(9), 2043-2049. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x
- Sidorov, V., Kasten, D., Pang, S. Z., Hajdukiewicz, P., Staub, J., y Nehra, N. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal*, 19(2), 209-216. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00508.x
- Sikdar, S., Serino, G., Chaudhuri, S., y Maliga, P. (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 18(1-2), 20-24. doi:10.1007/s002990050525
- Sims, R., Mabee, W., Saddler, J., y Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570-1580. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.046
-

- Singh, A. K., Verma, S. S., y Bansal, K. C. (2010). Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Research*, 19(1), 113-119. doi:10.1007/s11248-009-9290-z
- Singh, D., y Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(3), 399-417. doi:10.1007/s00253-008-1706-9
- Skarjinskaia, M., Svab, Z., y Maliga, P. (2003). Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae*. *Transgenic Res*, 12(1), 115-122. doi:10.1023/A:1022110402302
- Skarjinskaia, M., Svab, Z., y Maliga, P. (2003). Plastid Transformation in *Lesquerella Fendleri*, an Oilseed *Brassicaceae*. *Transgenic Research*, 12(1), 115-122. doi:10.1023/A:1022110402302
- Smith, D., y Keeling, P. (2015). Mitochondrial and plastid genome architecture: Reoccurring themes, but significant differences at the extremes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10177. doi:10.1073/pnas.1422049112
- Stephen, J. L., y Periyasamy, B. (2018). Innovative developments in biofuels production from organic waste materials: a review. *Fuel*, 214, 623-633. doi:10.1016/j.fuel.2017.11.042
- Su, J., Sherman, A., Doerfler, P., Byrne, B., Herzog, R., y Daniell, H. (2015). Oral delivery of Acid Alpha Glucosidase epitopes expressed in plant chloroplasts suppresses antibody formation in treatment of Pompe mice. *Plant biotechnology journal*, 13(8), 1023-1032. doi:10.1111/pbi.12413
- Sugimoto, N., Igarashi, K., y Samejima, M. (2012). Cellulose affinity purification of fusion proteins tagged with fungal family 1 cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 82(2), 290-296. doi:10.1016/j.pep.2012.01.007
- Sugiura, C., y Sugita, M. (2004). Plastid transformation reveals that moss tRNAArg-CCG is not essential for plastid function. *The Plant Journal*, 40(2), 314-321. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02202.x
- Sukumaran, R., Singhanian, R., y Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8526-8530. doi:10.1073/pnas.87.21.8526
- Svab, Z., y Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), 913-917. doi:10.1073/pnas.90.3.913
-

- Svab, Z., y Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3), 913-917. doi:10.1073/pnas.90.3.913
- Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., y Pettersson, G. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Separation of functional domains. *FEBS Letters*, 204(2), 223-227. doi:10.1016/0014-5793(86)80816-X
- Tiller, N., y Bock, R. (2014). The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development. *Mol Plant*, 7(7), 1105-1120. doi:10.1093/mp/ssu022
- Tissot, G., Canard, H., Nadai, M., Martone, A., Botterman, J., y Dubald, M. (2008). Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal*, 6(3), 309-320. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00321.x
- Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A., y Ma, S. (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology advances*, 28(2), 214-221. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.11.008
- Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., y Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol*, 21(12), 570-578. doi:10.1016/j.tibtech.2003.10.002
- Valkov, V., Gargano, D., Manna, C., Formisano, G., Dix, P., Gray, J., Scotti, N., y Cardi, T. (2011). High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. *Transgenic Research*, 20(1), 137-151. doi:10.1007/s11248-010-9402-9
- Valkov, V. T., Gargano, D., Manna, C., Formisano, G., Dix, P. J., Gray, J. C., Scotti, N., y Cardi, T. (2011). High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. *Transgenic Research*, 20(1), 137-151. doi:10.1007/s11248-010-9402-9
- Verhounig, A., Karcher, D., y Bock, R. (2010). Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), 6204-6209. doi:10.1073/pnas.0914423107
- Verma, D., y Daniell, H. (2007). Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. *Plant Physiol*, 145(4), 1129. doi:10.1104/pp.107.106690
- Verma, D., Kanagaraj, A., Jin, S., Singh, N., Kolattukudy, P., y Daniell, H. (2010). Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and

release fermentable sugars. *Plant biotechnology journal*, 8(3), 332-350. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00486.x

Vijayaraghavan, P., Vijayan, A., Arun, A., Jenisha, J. K., y Vincent, S. (2012). Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic *Bacillus subtilis* strain VV. In Elsevier (Ed.), *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* (Vol. 1, pp. 1-9). San Diego, California.

Villalta-Villalobos, J., y Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 30, 577-599. doi:10.15517/am.v30i2.34173

Voiniciuc, C., Pauly, M., y Usadel, B. (2018). Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. *Plant Physiol*, 176(4), 2590-2600. doi:10.1104/pp.17.01776

Voloshin, R., Rodionova, M., Zharmukhamedov, S., Nejat Veziroglu, y Allakhverdiev, S. (2016). Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(39), 17257-17273. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.07.084

Waheed, M., Thönes, N., Müller, M., Hassan, S., Gottschamel, J., Lössl, E., Kaul, H. P., y Lössl, A. (2011). Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. *Plant biotechnology journal*, 9(6), 651-660. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00612.x

Waheed, M. T., Thönes, N., Müller, M., Hassan, S. W., Gottschamel, J., Lössl, E., Kaul, H. P., y Lössl, A. G. (2011). Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. *Plant Biotechnol J*, 9(6), 651-660. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00612.x

Waheed, M. T., Thönes, N., Müller, M., Hassan, S. W., Razavi, N. M., Lössl, E., Kaul, H. P., y Lössl, A. G. (2011). Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Research*, 20(2), 271-282. doi:10.1007/s11248-010-9415-4

Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T., y Sugiura, M. (1998). Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16, 231-241. doi:10.1023/A:1007564209282

Wang, Ding, M., Li, Y.-H., Chen, Q.-X., Xu, G.-J., y Zhao, F.-K. (2003). Isolation of a multi-functional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crossean*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 35(10), 941-946.



- Wang, Ding, M., Li, Y., Chen, Q.-X., Xu, G.-J., y Zhao, F.-K. (2003). A monovalent anion affected multi-functional cellulase EGX from the mollusca, *Ampullaria crosseana*. *Protein Expression and Purification*, 31, 108-114. doi:10.1016/S1046-5928(03)00131-1
- Wang, Y.-P., Wei, Z.-Y., Zhang, Y.-Y., Lin, C.-J., Zhong, X.-F., Wang, Y.-L., Ma, J.-Y., Ma, J., y Xing, S.-C. (2015). Chloroplast-expressed MSI-99 in tobacco improves disease resistance and displays inhibitory effect against rice blast fungus. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 4628-4641. doi:10.3390/ijms16034628
- Wang, Y., Wei, Z., y Xing, S. (2018). Stable plastid transformation of rice, a monocot cereal crop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(4), 2376-2379. doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.164
- Wei, H., Xu, Q., Taylor, L., Baker, J., Tucker, M., y Ding, S.-Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 330-338. doi:10.1016/j.copbio.2009.05.008
- Wei, Z., Liu, Y., Lin, C., Wang, Y., Cai, Q. a., Dong, Y., y Xing, S. (2011). Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnol Lett*, 33(12), 2487-2494. doi:10.1007/s10529-011-0709-2
- Weisser, N. E., y Hall, J. C. J. B. a. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology advances*, 27(4), 502-520. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.004
- Wilson, D. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259-263. doi:10.1016/j.mib.2011.04.004
- Wurbs, D., Ruf, S., y Bock, R. (2007). Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *The Plant Journal*, 49(2), 276-288. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02960.x
- Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Holtzapple, M., Ladisch, M., y Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18), 1959-1966. doi:10.1016/j.biortech.2005.01.010
- Wymelenberg, A., Denman, S., Dietrich, D., Bassett, J., Yu, X., Atalla, R., Predki, P., Rudsander, U., Teeri, T. T., y Cullen, D. (2002). Transcript analysis of genes encoding a family 61 endoglucanase and a putative membrane-anchored family 9 glycosyl hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5765-5768. doi:10.1128/aem.68.11.5765-5768.2002
- Xie, W.-H., Zhu, C.-C., Zhang, N.-S., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Sathishkumar, R., y Li, H.-Y. (2014). Construction of novel chloroplast expression vector and development of an efficient transformation system for the diatom *Phaeodactylum*
-

tricornutum. *Marine Biotechnology*, 16(5), 538-546. doi:10.1007/s10126-014-9570-3

- Xu, J.-H., Liu, Q., Hu, W., Wang, T., Xue, Q., y Messing, J. (2015). Dynamics of chloroplast genomes in green plants. *Genomics*, 106(4), 221-231. doi:10.1016/j.ygeno.2015.07.004
- Xu, J., Ge, X., y Dolan, M. C. J. B. a. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology advances*, 29(3), 278-299. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.002
- Yin, Huang, P., y Lin, H. (2010). Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9833-9837. doi:10.1021/jf1019104
- Yin, Q., Teng, Y., Li, Y., Ding, M., y Zhao, F. (2011). Expression and Characterization of Full-Length *Ampullaria crossean* Endoglucanase EG65s and Their Two Functional Modules. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75, 240-246. doi:10.1271/bbb.100529
- Yu, L.-X., Gray, B. N., Rutzke, C. J., Walker, L. P., Wilson, D. B., y Hanson, M. R. (2007). Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *Journal of Biotechnology*, 131(3), 362-369. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.942
- Yue, F., Cui, L., dePamphilis, C. W., Moret, B. M. E., y Tang, J. (2008). Gene rearrangement analysis and ancestral order inference from chloroplast genomes with inverted repeat. *BMC Genomics*, 9(1), S25. doi:10.1186/1471-2164-9-S1-S25
- Zeng, G.-M., Zhao, M.-H., Huang, D.-L., Lai, C., Huang, C., Wei, Z., Xu, P., Li, N.-J., Zhang, C., y Li, F.-L. (2013). Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete Chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 166-172. doi:10.1016/j.ibiod.2013.07.005
- Zhang, J., Ruf, S., Hasse, C., Childs, L., Scharff, L. B., y Bock, R. (2012). Identification of cis-elements conferring high levels of gene expression in non-green plastids. *The Plant Journal*, 72(1), 115-128. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05065.x
- Zhao, F.-Y., Lin, J.-F., Zeng, X.-L., Guo, L.-Q., Wang, Y.-H., y You, L.-R. (2010). Improvement in fruiting body yield by introduction of the *Ampullaria crossean* multi-functional cellulase gene into *Volvariella volvacea*. *Bioresource Technology*, 101, 6482-6486. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.035
- Zhou, F., Badillo-Corona, J., Karcher, D., Gonzalez-Rabade, N., Piepenburg, K., Borchers, A. M., Maloney, A. P., Kavanagh, T., Gray, J., y Bock, R. (2008). High-

level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant biotechnology journal*, 6(9), 897-913. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00356.x

Zhou, F., Badillo-Corona, J. A., Karcher, D., Gonzalez-Rabade, N., Piepenburg, K., Borchers, A. M. I., Maloney, A. P., Kavanagh, T. A., Gray, J. C., y Bock, R. (2008). High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J*, 6(9), 897-913. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00356.x

Zicker, A., Kadakia, C., y Herrin, D. (2007). Distinct roles for the 5' and 3' untranslated regions in the degradation and accumulation of chloroplast tufA mRNA: identification of an early intermediate in the in vivo degradation pathway. *Plant molecular biology*, 63(5), 689-702. doi:10.1007/s11103-006-9117-8

Ziegelhoffer, T., Will, J., y Austin-Phillips, S. (1999). Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Molecular Breeding*, 5(4), 309-318. doi:10.1023/A:1009646830403

Zienkiewicz, M., Krupnik, T., Drożak, A., Golke, A., y Romanowska, E. (2017). Transformation of the *Cyanidioschyzon merolae* chloroplast genome: prospects for understanding chloroplast function in extreme environments. *Plant molecular biology*, 93(1), 171-183. doi:10.1007/s11103-016-0554-8

Zondlo, N. (2013). Aromatic-proline interactions: electronically tunable CH/ π interactions. *Accounts of chemical research*, 46(4), 1039-1049. doi:10.1021/ar300087y

Zoubenko, O., Allison, L., Svab, Z., y Maliga, P. (1994). Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic acids research*, 22(19), 3819-3824. doi:10.1093/nar/22.19.3819

Zubko, M., Zubko, E., Zuilen, K. v., Meyer, P., y Day, A. (2004). Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Research*, 13(6), 523-530. doi:10.1007/s11248-004-2374-x