

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO OSMÓTICO EN LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES DE *DUNALIELLA TERTIOLECTA* A TRAVÉS DE BIOBALÍSTICA**

Marycruz Quiñonez-Retana<sup>1</sup>, Karelía A. Meza-Ayala<sup>1</sup>, Ana M. Verástica-López<sup>1</sup>, José M. García-Padilla<sup>1</sup>, Héctor F. Nario-Álvarez<sup>2</sup>, Angel Valdez-Ortiz<sup>1</sup>, Lourdes J. Germán-Báez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Posgrado en Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética, Universidad Autónoma de Sinaloa; Culiacán, Sinaloa, México; CP 80030. <sup>2</sup>Centro Biotecnológico de Microalgas de México SA de CV (MICROCELL®); Culiacán, Sinaloa, México; CP 80050.

\*ljgerman@uas.edu.mx

*Palabras clave: Dunaliella tertiolecta; Pretratamiento osmótico; Bombardeo*

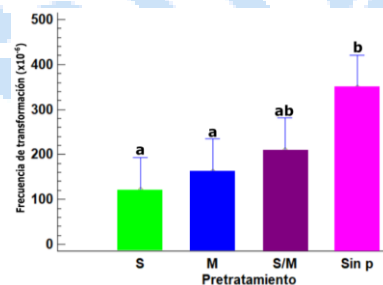
**Introducción.** Las microalgas son consideradas biofábricas productoras de una amplia gama de compuestos bioactivos de interés comercial tanto alimentario como para la producción de biofármacos, colorantes, cosméticos y biocombustibles. Además, su empleo en la expresión de proteínas recombinantes representa un modelo muy atractivo aunque poco explotado hasta hoy, debido en gran medida a la falta de métodos de transformación eficientes. *Dunaliella tertiolecta* es una microalga con alto potencial biotecnológico, especialmente para la expresión de proteínas recombinantes de interés, por lo que es importante desarrollar métodos eficientes para la manipulación de su genoma.

El objetivo del presente trabajo, fue establecer un sistema de transformación genética de *D. tertiolecta* (DUT) basado en biobalística.

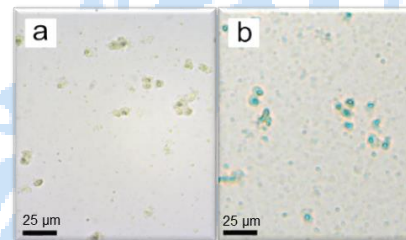
**Metodología.** A partir de un cultivo axénico de DUT, se prepararon cajas con 100x10<sup>6</sup> cel/mL, las cuales se sometieron a tres pretratamientos osmóticos: sorbitol (500 mM); manitol (500 mM); sorbitol (250 mM) + manitol (250 mM); y un control sin pretratamiento osmótico; para ello, se siguió la metodología descrita en [1], con modificaciones. Todos los tratamientos fueron posteriormente sometidos a bombardeos a 450 psi y una distancia de disparo de 10 cm. Los resultados fueron evaluados a través del número de UFC obtenidas en medio selectivo, y la expresión transitoria del gen *gus* siguiendo la metodología descrita en [2].

**Resultados.** Después del bombardeo, las células fueron colocadas en medio selectivo, obteniendo frecuencias de transformación de 120 a 350 UFC x 10<sup>-6</sup> células bombardeadas. Se encontró un efecto negativo de los pretratamientos con respecto al control (Fig. 1); lo que podría deberse a que los osmolitos empleados, inducen daños muy sensibles y letales en la permeabilidad celular. En concordancia con la literatura previa, el efecto del pretratamiento osmótico en ensayos de biobalística, dependerá en gran medida tanto del tipo y concentración de los osmolitos aplicados, como del modelo biológico empleado, por lo que los resultados obtenidos pueden ser muy variables

[1, 3]. Finalmente, para confirmar la funcionalidad del transgén incorporado en el genoma microalgal, se realizaron ensayos de expresión del gen *gus* en clonas obtenidas en medio selectivo y confirmadas a través de PCR (Fig. 2).



**Fig. 1.** Efecto de los pretratamientos osmóticos sobre la frecuencia de transformación de DUT.



**Fig. 2.** Expresión del gen *gus* en clonas de DUT bombardeadas crecidas en medio selectivo. (a) células sin bombardear; (b) clona PCR-positiva seleccionada al azar crecida en medio selectivo.

**Conclusiones.** La aplicación de pretratamientos osmóticos en ensayos de transformación de *D. tertiolecta* por biobalística, tuvo un efecto negativo significativo sobre la frecuencia de transformación de clonas recombinantes obtenidas.

**Bibliografía**

- Santos-Ballardo DU, Germán-Báez LJ, Ambriz-Pérez DL, Meza-Ayala KA, Luna-Avelar KD, Valdez-Ortiz A (2019). *South African Journal of Botany* 125: 329-336.
- Norzagaray-Valenzuela CD, Germán-Báez LJ, Valdez-Flores MA, Hernández-Verdugo S, Shelton LM, Valdez-Ortiz A (2018). *Journal of Microbiological Methods* 150: 9-17.
- Congping Tan, Song Qin, Qun Zhang, Peng Jiang (2005). *The Journal of Microbiology* 43(4): 361-365.