

## Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas

Helena Porta

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62210, México

helena.porta@ibt.unam.mx

### Resumen

Las algas son un grupo de organismos fotosintéticos muy diverso del que se conocen cerca de 30,000 ejemplares diferentes. Dentro del ecosistema de la Tierra, generan gran parte del oxígeno que consumimos los seres vivos, sostienen la biodiversidad de las comunidades marinas, y son, también, organismos modelo para la bioingeniería de enzimas, la producción de biocombustibles y para la biorremediación, además de que brindan una alternativa más amable con el ambiente para la obtención de biomoléculas. De tal forma que la ingeniería genética de las microalgas es uno de los campos de la biotecnología más interesantes y con un desarrollo intensivo. En esta breve revisión se describen algunos eventos históricos; los sistemas más populares debido a su efectividad, como el uso de vectores empleados para transformar plantas y animales, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o la biobalística; y algunos sistemas novedosos como la generación de librerías de herramientas para transformar el genoma de *Chlamydomonas reinhardtii*; las ventajas de conocer el genoma y plastoma para desarrollar vectores y elegir el uso de los sistemas de edición con nucleasas programables, entre los otros. El propósito general de esta revisión es proporcionar un panorama de los éxitos y de las dificultades enfrentados en este campo y que parecen estar directamente relacionados con la diversidad de este grupo de organismos.

**Palabras clave:** Transformación genética, microalgas.

### Abstract

Coral Algae are a very diverse group of photosynthetic organisms of which about 30,000 different specimens are known. Within the Earth's ecosystem, they generate much of the oxygen that living beings consume, they also sustain the biodiversity of marine communities, and are model organisms for the bioengineering of enzymes, the production of biofuels, and bioremediation. In addition, algae provide a more friendly environmentally alternative to obtain biomolecules. Then, the genetic engineering of microalgae is one of the most interesting and intensively developed biotechnology fields. This brief review describes some historical events, the most popular systems due to their effectiveness, such as the use of vectors used to transform plants and animals, transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and the use of microprojectiles to deliver DNA into the cell; and some novel systems such as the generation of "tool" libraries to transform the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*; the advantages of knowing the genome and the plastome to develop vectors, and the use of editing systems with programmable nucleases. The general purpose of this review is to provide an overview of the successes and difficulties faced in this field that seems to be directly related to the algae of interest.

**Key words:** Microalgae, genetic transformation.

## Introducción

El término “alga” no se refiere a un grupo taxonómico, si no que, define a un grupo polifilético de organismos que no son plantas superiores, comparten un origen, pero a través de su evolución, adquirieron características similares que incluyen la capacidad de generar oxígeno a través de la fotosíntesis. Evolutivamente están relacionadas a las plantas superiores ya que, además de la fotosíntesis, comparten la mayoría de sus procesos metabólicos y producen compuestos de almacenamiento similares. Sin embargo, las plantas son organismos ampliamente diferenciados en comparación con las algas (Barsanti and Gualtieri 2014).

El tamaño y la forma de las algas es muy diverso, existen macroalgas gigantes de hasta 100 m de longitud y microalgas unicelulares como el plancton vegetal de entre 0.2 y 2  $\mu\text{m}$ . Existen microalgas marinas y de agua dulce, también las hay terrestres creciendo en ambientes húmedos como rocas y troncos. Las algas se clasifican en algas procariontas verde-azules (cianobacterias), y

eucariotas como las rodofitas, feofitas, clorofitas, euglenofitas, carofitas, diatomeas, dinoflagelados, y criptofitas (Figura1)(<http://www.keweenawalgae.mtu.edu/>).

Algunas algas marinas pueden sobrevivir en profundidades de más de 200 m, en donde la penetración de la luz solar es escasa y debido a que poseen pigmentos accesorios pueden absorber y dirigir la energía luminosa a las clorofilas verdes a y b. Estas son las únicas moléculas que pueden convertir energía luminosa en energía química, pero no pueden absorber energía en el espectro luminoso que llega a esa profundidad. En contraste, las algas que viven expuestas a energía luminosa alta, poseen pigmentos que las protegen del foto-daño y de la fotooxidación. Además de vivir en diversos ambientes acuáticos y húmedos algunas microalgas son tolerantes a un amplio rango de temperatura, pH, turbidez, y concentraciones de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ .

A través de los años de generar conocimiento acerca de la biología de las microalgas, surgió gran interés en emplearlas para obtener la biomasa para la alimentación de peces, ganado y humanos. Actualmente,

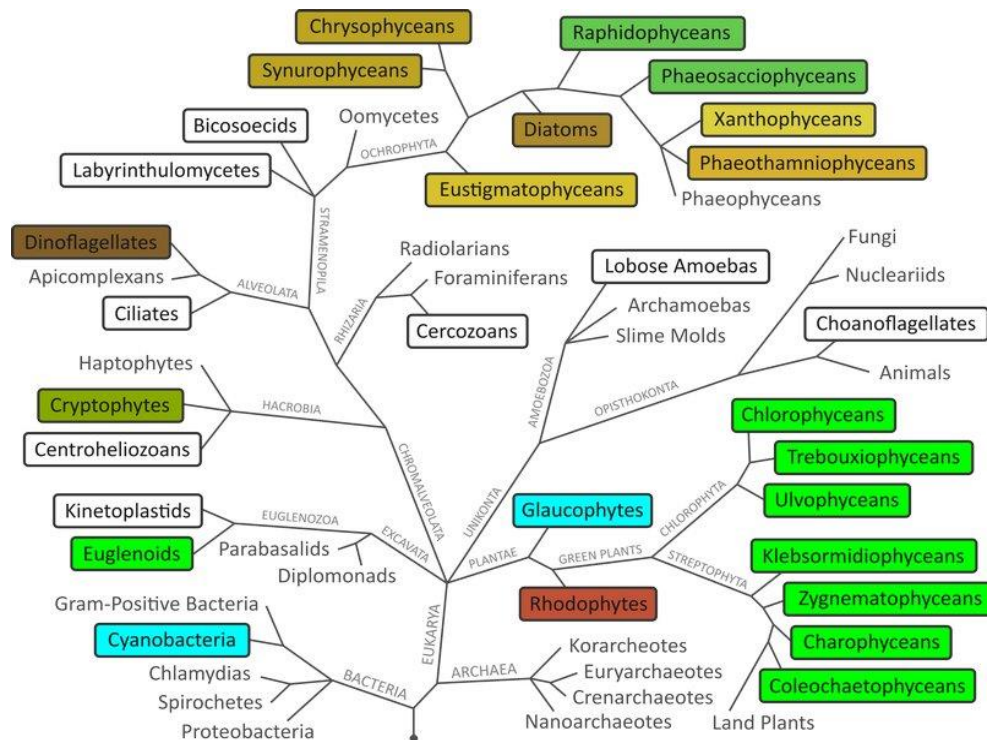


Figura 1. Relación filogenética de los diferentes grupos de organismos que incluyen en la base bacterias, eucariotas y archa. Se puede observar la diversidad de las algas que se encuentran enmarcadas.

Tomado de <http://www.keweenawalgae.mtu.edu/> (agosto 2021).

también hay un gran interés en la generación de biocombustibles, pigmentos como las ficobiliproteínas con colores azules y rojos (ficocianina, aloficociana, ficoeritrina) carotenoides (caroteno, xantofilas) y almidón y almidón florídeo, (polisacárido  $\alpha$ -1,4-glucano), por citar algunos ejemplos que se describen a mayor detalle en otros capítulos de este número especial de la revista BioTecnología. En esta revisión se mencionarán algunas consideraciones y de los sistemas mas populares para la transformación genética en algas.

## **Modificación genética de las microalgas**

Debido a su diversidad, la generación de microalgas genéticamente modificadas es inherente al organismo ya que puede haber una gran cantidad de variables que la dificultan. En esta breve revisión se hablará de los métodos mas comunes y prometedores para conseguir la sobreexpresión o la supresión de genes que permitan entender con mayor profundidad mecanismos de regulación genética, aspectos de biología molecular y fisiología en microalgas, así como la obtención de productos con interés biotecnológico en estos microorganismos.

Las modificaciones genéticas se utilizan en muchas áreas de la investigación científica como las levaduras, las bacterias, las algas, las plantas y las células de mamíferos. A la transferencia del gen deseado, su integración estable en el genoma de la célula blanco y a su expresión se le conoce como transformación genética; a el gen transferido se le conoce como "transgén" y a los organismos que se desarrollan después de una transferencia genética exitosa se les conoce como "transgénicos" (Babaoglu et al. 2000). El conocimiento relacionado a la modificación genética de microalgas tiene sus raíces en la transformación de plantas y como las algas forman parte del reino las plantas, las técnicas de transformación genética de las plantas se han empleado para expresar o inactivar genes en las microalgas.

Conceptualmente, la modificación genética de plantas y otros organismos, implica la inserción de ADN de otro organismo en el genoma del organismo de interés. Por ejemplo, insertar un gen que codifica para la enzima estilbeno sintasa de la uva en el tomate, para permitir la producción del compuesto nutraceutico resveratrol en niveles altos en los tomates (Giovinazzo et al. 2005). En las plantas, se emplean las modificaciones genéticas para

estudiar el efecto de genes de interés y para mejorar los rasgos de las plantas como: el rendimiento, la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés y producción de nutrientes. Estos conceptos aplican sin duda a la transformación de microalgas.

## **Sistemas de transformación**

Existen dos sistemas básicos para estudiar el efecto de una modificación genética en un organismo blanco: la transformación transitoria y la estable. Ambos se emplean en microalgas.

La expresión de un gen de forma transitoria en células de plantas u otros organismos se puede definir como la producción del mRNA y consecuentemente, de una proteína recombinante durante un período corto de tiempo (2-4 días) después de la transferencia de un ADN exógeno a las células blanco. La expresión es baja tanto en el número de células que expresan como en el nivel de la expresión. Los métodos de transformación transitoria son simples y rápidos y se emplea para contestar el efecto de introducir un gen en la célula y para probar la efectividad de un vector, de un promotor fusionado a un gen reportero. Por ejemplo, la transformación transitoria del gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa (*gusA*) y la viabilidad de las células transformadas se ha empleado para determinar las condiciones óptimas de transformación, a la que se le denominó el índice de eficiencia de transformación. Este índice permitió definir las condiciones óptimas previas a la selección y obtención de transformantes estables en *Dunaliella tertiolecta* facilitando y asegurando éxito en la obtención del organismo transgénico (Norzagaray-Valenzuela et al. 2018).

La transformación estable se utiliza para la introducción y mantenimiento permanente de un gen en una planta, un alga, en general en cualquier organismo. El gen de interés estará completamente integrado en el genoma del hospedero. Igualmente, que, en la transformación transitoria, es fundamental el uso de marcadores, generalmente antibióticos, para una selección adecuada del organismo modificado, el cual se expresará de forma continua y también se expresará en generaciones posteriores del organismo.

Este tipo de transformación en algas se utiliza para, 1) la investigación de la función de los genes a largo plazo, 2) la producción a largo plazo de un rasgo genético y 3) la producción de

un compuesto a gran escala. En Rathod et al., se puede consultar una tabla con información histórica acerca de los métodos de transformación usados exitosamente en algas (Rathod et al. 2017).

## **La construcción de vectores y estrategias de selección empleados en algas**

Para modificar un gen de interés en un alga se requiere del diseño y construcción de un vector de clonación. Los vectores de clonación son moléculas circulares de ADN extracromosomal que se auto replican independientemente del ADN que llevan insertado y que corresponde al gen se quiere introducir y expresar en el hospedero.

Los vectores para transformar algas se construyen típicamente con base en la selección de un segmento cromosómico propio del organismo de interés. El vector debe llevar: **1) una región promotora**, algunos ejemplos de promotores propios de algas son: el promotor de la proteína de choque térmico (heatshock protein 70, gen *hsp70A*) (Schroda et al. 2000); la región 5' no traducida del gene de la subunidad pequeña de la Ribulosa Bisfosfato carboxilasa (RuBisCO, gen *rbcS2*) de *C. reinhardtii* (Stevens et al. 1996); el promotor de la anhidrasa carbonica1 (DCA1) de *Dunaliella* sp. (Li et al. 2010); el promotor de la proteína de unión de fucoxantina-clorofila a/c (*fcp*) de una diatomea marina (Apt et al. 1996; Miyagawa-Yamaguchi et al. 2011); el promotor del gen de la *actina1* (*PyAct1*) de *Porphyra yezoensis* (Hirata et al. 2011) y el de la proteína de unión de la violaxantina/clorofila a (VCP) de *Nannochloropsis* sp. (Kilian et al. 2011). Recientemente, se reportó que los promotores endógenos de los genes *hsp90* y *epssII* de *Nannochloropsis gaditana* regulan eficientemente la expresión de la proteína reportera mCherry y los proponen como una herramienta útil para la expresión de genes de interés en esta microalga (Ramarajan M. et al. 2019). Se han propuesto el uso de promotores inducibles químicamente, por ejemplo, con L-ramnosa (Kelly et al. 2018), L-arabinosa (Cao et al. 2017), isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Nozzi et al. 2017), y níquel (Santos-Merino et al. 2018), para regular la expresión del gen de interés; sin embargo, no han resultado atractivos pues algunos son costosos y/o presentan dificultades para su remoción del producto final. En *Synechocystis* sp. se ha empleado el

promotor del gen *cpcG2*, el cual codifica para una proteína de unión del ficobilisoma, y tiene la virtud de responder a la luz que recibe el organismo: la luz verde reprime la expresión del gen reportero y la luz roja lo induce (Shono et al. 2021). Este sistema brinda la ventaja de no utilizan moléculas inductoras difíciles de remover o económicamente desfavorables para un proceso a escala de producción.

## **Importancia del conocimiento de la secuencia genómica**

El conocimiento completo de la secuencia del genoma es una característica relevante para la manipulación genética en las algas y otros organismos, ya que permite conocer si existe homología de genes de diferentes fuentes y sitios de integración dentro del genoma. Hasta el momento se han secuenciado mas de 120 diferentes algas que incluyen fila como Miozoa, Bacillariophyta, Chlorophyta, Careohyta, Rodofitas, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Euglenozoa, y Cercozoa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <https://www.algaebase.org/>). En la tabla 1 se muestran una selección de estos proyectos de secuenciación genómica de algas con interés biotecnológico. También se cuenta con varios reportes de análisis de transcriptoma que permitirán un diseño adecuado del proyecto de transformación con una base de información genómica sólida (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>; <http://amoebidia.bcm.umontreal>).

Algunos promotores usados en plantas y animales se han empleado con éxito razonable, en la transformación de algas cuando no se cuenta con información de su genoma. Por ejemplo, el promotor del virus vacuolizante de simio 40 (SV40) se empleó con éxito para transformar el alga verde *Haematococcus pluvialis* (Teng et al. 2002). En un estudio reportado más recientemente, se evaluó la eficiencia de transformación transitoria del promotor SV40, el promotor del citomegalovirus de humano (CMV) y el del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV 35S), usando como gen reportero a la proteína verde fluorescente (eGFP), en la clorofita *Tetraselmis subcordiformis*. Interesantemente se obtuvo la mejor tasa de transformación con el promotor CaMV 35S (Cui et al. 2016). Cuando no se tiene información suficiente de la secuencia del alga blanco se pueden emplear vectores de

# Artículos

Tabla 1. Algas con interés biotecnológico de las que se conoce la secuencia genómica. (-) no se ha publicado.

Nombre	Filo	Tamaño (MB)	Cepa	Acceso en NCBI	Referencias
<i>Botryococcus braunii</i>	Chlorophyta	184.38	Mf 1.05b.01	GCA_000507305	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta	120.40	CC-503 cw92 mt+	GCA_000002595	(Barolo et al. 2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorophyta	58.53	1230	ASM313072v1	-
<i>Chlorella variabilis</i>	Chlorophyta	46.15	NC64A	GCA_000147415	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	39.08	NJ-7	ASM972020v1	-
<i>Desmodesmus armatus</i>	Chlorophyta	116.30	SE107	GCA_007449985	-
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta	121.87	CCAP 19/18	GCA_002284615	-
<i>Euglena gracilis</i>	Euglenozoa	1435.52	Z	GCA_900893395	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyta	363.77	SAG 192.80	GCA_003970955	-
<i>Haematococcus sp</i>	Chlorophyta	77.83	NG2	ASM433557v1	-
<i>Nannochloris sp.</i>	Chlorophyta	13.74	RS	GCA_004335565	-
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Chlorophyta	33.98	CCMP526	GCA_000240725	-
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Chlorophyta	29.26	LAMB2011	GCA_004519485	(Brown et al. 2019)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Chlorophyta	26.27	CCMP525	GCA_004335455	-
<i>Porphyridium purpureum</i>	Rhodophyta	22.19	CCMP1328	GCA_008690995	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	Chlorophyta	151.89	PABB004	GCA_014905635	-
<i>Volvox carteri</i>	Chlorophyta	137.68	Eve	GCA_000143455	-
<i>Tetraselmis striata</i>	Chlorophyta	227.90	LANL1001	GCA_006384855	-
<i>Ulva mutabilis</i>	Chlorophyta	98.48	Wild Type	GCA_900538255	-
<i>Ulva prolifera</i>	Chlorophyta	87.89	YS-2018	GCA_004138255	-

*Escherichia coli*. Por ejemplo, la transformación exitosa de cepas de las microalgas verdes oleaginosas *Acutodesmus obliquus* y *Neochloris oleoabundans* se logró mediante la transferencia de un vector de expresión de *E. coli* y a través del sistema de conjugación propio de esta bacteria, y se reportó como una herramienta genética novedosa, que abre la posibilidad de transformación de estas microalgas para la obtención de grandes cantidades de triacilglicerol (Muñoz et al. 2019; Muñoz et al. 2019). Evidentemente con las facilidades actuales de obtención de la secuencia genómica se podrán diseñar vectores con promotores *ad hoc* para la transformación eficiente de la microalga de interés.

El vector también debe contener **2) un regulador de la transcripción**. En los vectores de expresión la inclusión de regiones

5' y 3' no traducidas impactan positivamente la expresión de los genes. Con construcciones químicas que incluyen el promotor y las regiones 5' y 3' de los genes codificados en el plasmido de *C. reinhardtii*, *atpA*, *rbcl*, *psbA*, *psbD* y *16sRNA*, flanqueando al gen reportero *gfp* se observaron diferentes niveles de expresión en cada una de estas construcciones y que la región 3' básicamente no afecta estos niveles (Barnes et al. 2005). El sitio de unión a ribosoma (Ribosome binding site, RBS) también tiene un papel importante en la regulación de la transcripción de genes de cianobacterias de agua dulce y salada (Markley et al. 2015; Wang et al. 2018).

Una de las aplicaciones biotecnológicas más atractivas y de actualidad, radica en la obtención de proteínas de otros organismos en microalgas, para lo cual se han obtenido mejores resultados con la optimización del uso

de codones de la proteína exógena con el propio de la microalga blanco. Tal es el caso de la expresión de gen *ant1* en el cloroplasto de *Haematococcus pluvialis* para la producción de un péptido antimicrobiano propio de los peces teleósteos, la piscidina-4 (Wang et al. 2020). Actualmente, se han desarrollado aplicaciones bioinformáticas de libre acceso para la optimización del uso de codones y para determinar RBS.

En los vectores **3) los genes marcadores de la selección** forman una parte integral de estos y, en términos prácticos, son indispensables en el proceso de transformación. Como la mayoría de los organismos transformados, las células de microalgas transformadas se pueden diferenciar de las células no transformadas mediante la expresión de genes que codifican para proteínas que generan color, fluorescencia, permiten complementar una auxotrofia o que generan resistencia a un antibiótico u otro compuesto químico.

La expresión de genes que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*), la  $\beta$ -galactosidasa (*LacZ*) o la proteína fluorescente (*GFP*, *mCherry*, entre otras), se usan cotidianamente como **4) genes reporteros** para seleccionar colonias transformadas y estables. Una nota importante, debido a que algunas algas tienen pigmentos fotosintéticos endógenos y otras sustancias fluorescentes se requiere un promotor fuerte para inducir la expresión de *gfp* y de esta manera prevenir la interferencia del fondo de fluorescencia endógeno (Watanabe et al. 2011).

Los métodos de selección más comúnmente usados se basan en la resistencia a antibióticos y marcadores metabólicos basados en la generación de mutantes auxotróficas. En contraste con las plantas superiores, las algas son resistentes a la neomicina, la kanamicina, y al cloranfenicol (Zienkiewicz et al. 2017), pero son típicamente sensible a la cloromicetina, la higromicina y al herbicida glufosinato. El uso de gen de la resistencia al bialafos (*bar*), que codifica para otro herbicida, se ha empleado exitosamente en la generación de vectores y expresión transgénica en *H. pluvialis* (Wang et al. 2020).

Los avances más importantes en la generación de vectores, la selección de promotores, de regiones reguladoras de la transcripción y marcadores de selección, se

han desarrollado en las cianobacterias, principalmente y en la microalga modelo *C. reinhardtii*. La información generada se encuentra agrupada en una biblioteca de herramientas moleculares denominado "Golden Gate Molecular Cloning" (MoClo) que incluye varios microorganismos con importancia biotecnológica (Crozet et al. 2018). MoClo contiene la información acerca de la generación de vectores y está organizada en "bloques" que se pueden usar como guías para el diseño y la generación de vectores. Aunque esta información se generó a partir de la investigación en organismos modelo como las cianobacterias, es atractiva para planear estrategias similares para algas eucariotas.

### **Métodos exitosos para la introducción de genes en algas**

Para introducir una secuencia de ADN e integrarla en el genoma de la célula huésped, se han descritos sistemas no-biológicos que incluyen métodos físicos o químicos y sistemas biológicos. Con cualquiera de ellos, se desea obtener una eficiencia de transformación alta y estable. También se debe considerar que el sistema de transformación sea económico, reproducible, que genere múltiples eventos de transformación, y simplicidad técnica, por ejemplo, que no requiera el uso de protoplastos. Patrones simples de integración y un bajo número de copias del gen introducido, son factores importantes para minimizar la probabilidad de alteración génica no deseada en los sitios de inserción o el silenciamiento transgénico asociado a múltiples copias. Los sistemas más populares para la transformación de algas no biológicos son: la biobalística, la electroporación y la transformación mediada por partículas de vidrio o de carburo de silicio; y biológicos: transformación mediada por *Agrobacterium*, conjugación y transformación de protoplastos (Qin et al. 2012), (Ortiz-Matamoros, 2018 #40).

### **Biobalística**

Micro proyectiles de tungsteno u oro cubiertos con ADN se "disparan" a las células de microalgas con un sistema de liberación de partículas que acelera los micro proyectiles con una ráfaga de gas presurizado. Las partículas portadoras de ADN penetran en el citoplasma, los orgánulos como cloroplastos y mitocondrias y el núcleo, introduciendo, así, el transgén al ADN contenido en los orgánulos

de la célula blanco. Una de las ventajas de este sistema es que atraviesa la pared celular y en principio, se pueden transformar microalgas recalcitrantes. Alguna de sus desventajas de este sistema son el alto costo y, que comparado con la transformación mediada por *A. tumefaciens*, puede ser menos eficiente. El bombardeo de partículas se ha utilizado con éxito para transformar una variedad de especies de microalgas, con y sin paredes celulares (Rathod et al. 2017).

## **Electroporación**

La electroporación consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y afectar la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente. Este método es útil para transformar protoplastos y células con paredes delgadas y se emplea exitosamente para transformar *Cyanidioschyzon merolae*, *D. salina*, *Chlorella vulgaris* y *C. reinhardtii* (Rathod et al. 2017).

## **Transformación mediada por partículas inertes**

Un método económico y menos complejo para transformar microalgas se basa en el uso de perlas de vidrio inertes. Involucra la agitación de una preparación homogénea de las células en presencia de las partículas inertes, el ADN y polietilenglicol. También se emplean “bigotes” de carburo de silicio. Estas partículas funcionan, aunque con baja eficiencia, para transformar algas con pared celular gruesa. Se ha empleado para transformar los dinoflagelados *Amphidinium* sp. y *Symbiodinium microadriaticum* (Te et al. 1998).

La transconjugación se ha empleado para la transferencia de ADN entre cianobacterias y una bacteria, generalmente *E. coli*, por vía directa de célula a célula (Tolonen et al. 2006). La transformación de protoplastos y polietilenglicol es una alternativa cuando hay dificultades para que el ADN penetre la pared celular. Sin embargo, la generación de protoplastos no es un procedimiento sencillo, ya que se requiere del establecimiento de las condiciones de las enzimas que degradan la pared celular para generarlos. Con este método se obtuvo la transformación estable del cocolitóforo *Pleurochrysis carterae* (Endo et al. 2016).

## **Transformación mediada por Agrobacterium**

*Agrobacterium* es una bacteria patógena de plantas que se encuentra en el suelo y tiene la capacidad única de transferir parte de su propio ADN a las células vegetales. En la naturaleza, la transferencia del ADN bacteriano provoca una rápida división de las células vegetales y el desarrollo de un tumor vegetal. La transformación mediada por *Agrobacterium* se emplea ampliamente para la transformación genética de las plantas (Gelvin 2003). La selección de la cepa de *Agrobacterium* y el uso de D-glucosa y de la acetosiringona (compuesto fenólico atrayente de *Agrobacterium* que las plantas heridas liberan), mejoran la eficiencia de transformación de *Dunaliella* (Srinivasan and Gothandam 2016)). Diferentes tipos de algas se han transformado utilizando *Agrobacterium* (Rathod et al. 2017; Sproles et al. 2021).

## **Transformación de protoplastos**

Los protoplastos se han utilizado ampliamente como una herramienta biotecnológica de transformación. Los protoplastos son células vivas que carecen de pared celular, básicamente homogéneas y totipotenciales. Su aislamiento, transformación y regeneración han sido de particular interés para el estudio de las algas rojas marinas *Porphyra* y *Gracilaria*, ya que constituyen una fuente importante de alimentación (nori) y para la obtención de productos biotecnológicos, en países como Japón. Se han reportado diferentes protocolos para la obtención de protoplastos en microalgas rojas en los que se considera el tipo de enzima para degradar la pared celular, pH, tiempo, azúcares para el equilibrio osmótico y la integridad de los protoplastos (Reddy et al. 2010).

## **Ingeniería genética del cloroplasto**

La ingeniería genética del cloroplasto es una tecnología emergente que se puede utilizar para producir proteínas recombinantes a escala industrial o con fines medicinales y otras nuevas aplicaciones para mejorar las cepas de algas silvestres.

La ingeniería de plastomas (genoma del cloroplasto) es una herramienta versátil y útil para la expresión transgénica (Siddiqui et al. 2020). Los beneficios de la transformación

del plastoma comparada con la transformación nuclear, incluyen un mayor nivel de expresión transgénica, integración a través de recombinación homóloga, contención del transgén, carencia de silenciamiento de genes y defectos de posición. Expresar genes exógenos en el cloroplasto permite su localización específica en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga, comparando con la transformación nuclear en la que los eventos de integración al genoma son aleatorios. Estas características impactan en una mayor acumulación de las proteínas transgénicas cuando se expresan en cloroplastos que cuando se encuentra en el ADN nuclear. El mejor rendimiento de acumulación de proteínas exógenas cuyo transgén se integra en el genoma nuclear es de alrededor del 0.2% de la proteína soluble total (TSP) en comparación con casi el 10% de TSP obtenido en plástidos (Manuell et al. 2007). Para la transformación del plastoma también son importantes los sistemas de selección, promotores eficientes y las regiones reguladoras 5´y 3´ no traducidas flanqueando al gen de interés (Yarra 2020). Los cloroplastos pueden transformarse con múltiples genes en un solo evento, debido a la disponibilidad de múltiples sitios de inserción, así como a la capacidad de procesar policistrones, permitiendo que todo un casete de genes se regule por un solo promotor (Rymarquis et al. 2006; Larrea-Alvarez and Purton 2020).

El uso de marcadores metabólicos para la selección en la transformación del cloroplasto basados en enzimas metabólicas se considera más amigable con el medio ambiente que los antibióticos y los herbicidas tradicionalmente usados en la transformación nuclear. Algunos ejemplos de estos marcadores incluyen a la mutante de *Chlamydomonas* de la acetilornitina aminotransferasa (síntesis de Arg, ARG9), auxotrófica para este aminoácido (Remacle et al. 2009). Recientemente, se propuso al gen bacteriano de la fosfito oxidoreductasa (*ptxD*), que se expresa abundantemente en el cloroplasto, pero contiene un codón Trp-Opl que le impide expresarse fuera del cloroplasto y por lo tanto la expresión del gen de selección está contenida en este orgánulo. Este vector se ha usado con éxito para producir en algas una vacuna contra un virus que afectan peces de granja (Changko et al. 2020). En el capítulo

“El potencial del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes” de este número especial de la Revista BioTecnología, se describen varios ejemplos de transformación mediante ingeniería genética del cloroplasto.

## **Edición del genoma de las microalgas con nucleasas programables**

Los sistemas de nucleasas programables (NP) para la edición del ADN, se basan en la inducción de una ruptura de la doble cadena en un sitio específicamente diseñado en el genoma, seguido de la reparación de ésta. Estos sistemas están dirigidos a escindir una secuencia genómica elegida, lo cual es una gran ventaja cuando se requieren eliminar secciones precisas en los genomas o bien integrar en regiones específicas de algún cromosoma información genética, además de ser un tipo de edición indispensable para trabajos de ingeniería metabólica y biología sintética.

Las principales NP incluyen a las nucleasas “proteína de dedo de zinc”, las meganucleasas (del inglés ZFN y MN, respectivamente), la NP del tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés), y el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas). El evento de escisión inducido por las NP provoca procesos de reparación celular que a su vez median la modificación eficiente del ADN blanco.

El sistema ZFN es una endonucleasa artificial que consiste en una proteína de dedo de zinc (ZFP) fusionada al dominio de escisión de la enzima de restricción *FokI* (Urnov et al. 2010). Las meganucleasas son endonucleasas naturales que se pueden modificar para reconocer sitios específicos de entre 12 y 30 nucleótidos en el ADN blanco y se ha analizado su efectividad en la edición del genoma de diatomeas (Huang and Daboussi 2017).

Uno de los sistemas más populares empleados para la edición mediante NP es el del tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés). Este sistema está constituido por enzimas de restricción diseñadas específicamente para cortar secuencias de ADN. Se construyen fusionando un dominio de unión al ADN efector una región activadora de la



transcripción TAL (del inglés: transcription activator-like), con un dominio de escisión del ADN. Los efectores de tipo activador de la transcripción (TALE) se pueden diseñar para unirse a prácticamente cualquier secuencia deseada del ADN, editando en ubicaciones específicas y se han reportado algunos ejemplos de su uso en algas (Razzaq et al. 2019).

Otro de los sistemas NP con gran popularidad actualmente es el sistema CRISPR-Cas. Biológicamente hablando, es un sistema inmunológico procarionte que confiere resistencia contra elementos genéticos extraños, como regiones de plásmidos y fagos; en los procariontes evolucionó para proporcionar una forma de inmunidad adquirida. CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas, por sus siglas en inglés) es una familia de secuencias de ADN que se encuentran en los genomas de bacterias y arqueas. Estas secuencias se derivan de fragmentos de ADN de bacteriófagos que previamente habían infectado al procarionte. Se utilizan para detectar y destruir el ADN de bacteriófagos similares durante infecciones posteriores. Cas9 (o "proteína 9 asociada a CRISPR") es una enzima que utiliza secuencias CRISPR como guía para reconocer y escindir cadenas específicas de ADN que son complementarias a la secuencia CRISPR. Las enzimas Cas9 junto con las secuencias CRISPR forman la base de una tecnología conocida como CRISPR-Cas9 que se puede utilizar para editar genes dentro de organismos, incluidas las algas (Razzaq et al. 2019).

En el 2013, Sisova et al., demostraron la utilidad del sistema ZFN para editar los genes del canal de protones de apertura por luz de rodopsina (COP3 y COP4) de *C. reinhardtii* (Sizova et al. 2013). Más adelante, se demostró que mediante las NP MN y TALEN la edición del gen de la uridil difosfato (UDP)-glucosa pirofosforilasa mejoró la acumulación de lípidos en la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* (Daboussi et al. 2014). También, en *P. tricorutum* se exploró la edición del gen de la uridina monofosfato sintasa (UMP) con TALEN, para su uso como marcador de

selección, pero la eficiencia para la obtención de mutantes nulas se consideró baja, de alrededor del 16% (Serif et al. 2018).

El sistema mas exitoso para la edición de genes en microalgas es CRISPER/Cas9, sobre todo en *C. reinhardtii*. Sin embargo, se han enfrentado varios retos, principalmente evitar el efecto citotóxico de la expresión constitutiva de Cas9. Con tal fin, se implementaron métodos que incluyen su expresión transitoria y el uso de homólogos como Cpf1 (CRISPER/Cpf1) (Ferenczi et al. 2017). La eficiencia de transformación obtenida por varios grupos empleando diferentes estrategias para evitar la toxicidad de Cas9 va de 3 a 30% dependiendo de la estrategia empleada (Razzaq et al. 2019).

La adaptabilidad del sistema CRISPER se ha demostrado en *P. tricorutum*. Optimizando el uso de codones de Cas9 de *Staphylococcus pyogenes* al de *P. tricorutum*, se logró la disrupción del gen de la proteína cloroplástica SRP54 (CpSRP54), con una eficiencia de transformación del 30% y sin una aparente toxicidad por la expresión de Cas9 para esta diatomea (Nymark et al. 2016). Otro ejemplo exitoso del uso de CRISPER/Cas es la disrupción del gen de la ureasa de *Thalassiosira pseudonana*, otra diatomea, con una eficiencia del 60% (Hopes et al. 2016). El sistema CRISPER también se ha empleado para la disrupción del gen de la nitrato reductasa de *Nannochloropsis oceanica*, una microalga marina de uso biotecnológico para la producción de lípidos, sin embargo la eficiencia reportada es de apenas el 1% (Wang et al. 2017). Interesantemente, se ha desarrollado una línea de *N. gaditana* que produce lípidos eficientemente y que expresa constitutivamente Cas9 sin intoxicarse. Además, su eficiencia de transformación es de cerca del 78% (Ajjawi et al. 2017). La diferencia en la eficiencia de la edición genética de los sistemas NP muy probablemente depende de la diversidad de este grupo de organismos, por lo tanto, se requiere de ingenio y trabajo intenso para lograr el impacto biotecnológico deseado.

## Conclusiones

En poco más de una década, los avances reportados acerca de la transformación de algas son significativos y en algunos casos impactantes, no solo por investigar el comportamiento básico de estos importantes organismos, sino también por la generación de herramientas biotecnológicas específicas. Como se mencionó al inicio de esta revisión, las algas incluyen una gran diversidad de organismos, desde cianobacterias hasta algas macroscópicas, y por lo tanto no hay métodos o sistemas generales aplicables para su mejoramiento genético. Sin embargo, en estos años, se han descrito una serie de “bloques” con los que se ha logrado construir vectores con promotores regulables, métodos de selección, de transformación, la transformación de núcleo o cloroplasto y sistemas de edición del genoma muy diversos, y métodos más accesibles para estudios de genómica, transcriptómica y proteómica. Con todo el desarrollo científico y biotecnológico, seguramente en los años por venir veremos la generación de tecnología y conocimiento básico novedoso para la transformación genética de las microalgas.

## Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119.

## Referencias

- Ajjawi I, Verruto J, Aqui M, Soriaga LB, Coppersmith J, Kwok K, Peach L, Orchard E, Kalb R, Xu W, Carlson TJ, Francis K, Konigsfeld K, Bartalis J, Schultz A, Lambert W, Schwartz AS, Brown R, Moellering ER (2017) Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nat Biotechnol* 35 (7):647-652. doi:10.1038/nbt.3865
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* 252 (5):572-579. doi:10.1007/BF02172403
- Babaoglu M, Davey MR, Power JB (2000) Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. *Agri Biotech Net* 2:1-12
- Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A, Mayfield SP (2005) Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* 274 (6):625-636. doi:10.1007/s00438-005-0055-y
- Barolo L, Abbriano RM, Commault AS, George J, Kahlke T, Fabris M, Padula MP, Lopez A, Ralph PJ, Pernice M (2020) Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae. *Cells* 9 (3). doi:10.3390/cells9030633
- Barsanti L, Gualtieri P (2014) *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Second Edition. CRS Press.
- Brown RB, Wass TJ, Thomas-Hall SR, Schenk PM (2019) Chromosome-Scale Genome Assembly of Two Australian *Nannochloropsis oceanica* Isolates Exhibiting Superior Lipid Characteristics. *Microbiol Resour Announc* 8 (48). doi:10.1128/MRA.01288-19
- Cao YQ, Li Q, Xia PF, Wei LJ, Guo N, Li JW, Wang SG (2017) AraBAD based toolkit for gene expression and metabolic robustness improvement in *Synechococcus elongatus*. *Sci Rep* 7 (1):18059. doi:10.1038/s41598-017-17035-4
- Changko S, Rajakumar PD, Young REB, Purton S (2020) The phosphite oxidoreductase gene, *ptxD* as a bio-contained chloroplast marker and crop-protection tool for algal biotechnology using *Chlamydomonas*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104 (2):675-686. doi:10.1007/s00253-019-10258-7
- Crozet P, Navarro FJ, Willmund F, Mehrshahi P, Bakowski K, Lauersen KJ, Perez-Perez ME, Auroy P, Gorchs Rovira A, Sauret-Gueto S, Niemeyer J, Spaniol B, Theis J, Trosch R, Westrich LD, Vavitsas K, Baier T, Hubner W, de Carpentier F, Cassarini M, Danon A, Henri J, Marchand CH, de Mia M,

- Sarkissian K, Baulcombe DC, Peltier G, Crespo JL, Kruse O, Jensen PE, Schroda M, Smith AG, Lemaire SD (2018) Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth Biol* 7 (9):2074-2086. doi:10.1021/acssynbio.8b00251
- Cui Y, Qu L, Zhao J, Qin S (2016) Transient expression of the enhanced green fluorescence protein (egfp) gene in *Tetraselmis subcordiformis* (Chlorodendrales, Chlorophyta) with three exogenous promoters. *Phycologia* 55 (5):564-567. doi:10.2216/15-136.1
- Daboussi F, Leduc S, Marechal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, Voytas DF, Cavarec L, Duchateau P (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat Commun* 5:3831. doi:10.1038/ncomms4831
- Endo H, Yoshida M, Uji T, Saga N, Inoue K, Nagasawa H (2016) Stable nuclear transformation system for the coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *Sci Rep* 6:22252. doi:10.1038/srep22252
- Ferenczi A, Pyott DE, Xipnitou A, Molnar A (2017) Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (51):13567-13572. doi:10.1073/pnas.1710597114
- Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (1):16-37, table of contents. doi:10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003
- Hirata R, Jeong WJ, Saga N, Mikami K (2011) Heterologous activation of the *Porphyra tenera* HSP70 promoter in Bangiophycean algal cells. *Bioeng Bugs* 2 (5):271-274. doi:10.4161/bbug.2.5.16938
- Hopes A, Nekrasov V, Kamoun S, Mock T (2016) Editing of the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Methods* 12:49. doi:10.1186/s13007-016-0148-0
- Huang W, Daboussi F (2017) Genetic and metabolic engineering in diatoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372 (1728). doi:10.1098/rstb.2016.0411
- Kelly CL, Taylor GM, Hitchcock A, Torres-Mendez A, Heap JT (2018) A rhamnase-Inducible system for precise and temporal control of gene expression in cyanobacteria. *ACS Synth Biol* 7 (4):1056-1066. doi:10.1021/acssynbio.7b00435
- Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK, Vick B (2011) High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (52):21265-21269. doi:10.1073/pnas.1105861108
- Larrea-Alvarez M, Purton S (2020) Multigenic engineering of the chloroplast genome in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology (Reading)* 166 (6):510-515. doi:10.1099/mic.0.000910
- Li J, Lu Y, Xue L, Xie H (2010) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 37 (2):1143-1154. doi:10.1007/s11033-009-9901-z
- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*. *Plant Biotechnol J* 5 (3):402-412. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x
- Markley AL, Begemann MB, Clarke RE, Gordon GC, Pflieger BF (2015) Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *ACS Synth Biol* 4 (5):595-603. doi:10.1021/sb500260k
- Miyagawa-Yamaguchi A, Okami T, Kira N, Yamaguchi H, Onhishi K, Adaci M (2011) Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp. *Phycological Research* 59 (2):113-119. doi:https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00607.x

- Muñoz CF, Sturme MHJ, D'Adamo S, Weusthuis RA, Wijffels RH (2019) Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. *Algal Research* 39
- Muñoz CF, Weusthuis RA, D'Adamo S, Wijffels RH (2019) Effect of single and combined expression of lysophosphatidic acid acyltransferase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase on lipid accumulation and composition in *Neochloris oleoabundans*. *Front Plant Sci* 10:1573. doi:10.3389/fpls.2019.01573
- Norzagaray-Valenzuela CD, German-Baez LJ, Valdez-Flores MA, Hernandez-Verdugo S, Shelton LM, Valdez-Ortiz A (2018) Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Microbiol Methods* 150:9-17. doi:10.1016/j.mimet.2018.05.010
- Nozzi NE, Case AE, Carroll AL, Atsumi S (2017) Systematic approaches to efficiently produce 2,3-butanediol in a marine cyanobacterium. *ACS Synth Biol* 6 (11):2136-2144. doi:10.1021/acssynbio.7b00157
- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, Bones AM, Winge P (2016) A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci Rep* 6:24951. doi:10.1038/srep24951
- Ortiz-Matamoros MF, Villanueva MA, Islas-Flores T (2018) Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief Funct Genomics* 17 (1):26-33. doi:10.1093/bfpg/elx014
- Qin S, Lin H, Jiang P (2012) Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol Adv* 30 (6):1602-1613. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.05.004
- Ramarajan M. FM, Abbriano R., Pernice M., P.J. R (2019) Novel endogenous promoters for genetic engineering of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* CCMP526. *Algal Research* 44:101708
- Rathod JP, Gade MR, Rathod DR, Dudhare M (2017) A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *Int J of Curr Microbiol and Appl Sci* 6 (12):3191-3207. doi:https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.6.12.373
- Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM, Hameed MK, Khan MS, Joyia FA (2019) Modern trends in plant genome editing: An inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *Int J Mol Sci* 20 (16). doi:10.3390/ijms20164045
- Reddy CRK, Gupta V, Jha B (2010) Developments in biotechnology of red algae. In: Seckbach J, Chapman DJ (eds) *Red algae in the genomic age*. Springer, London, New York, pp 309-342
- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri MR, Coosemans N, Hamel PP (2009) The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 8 (9):1460-1463. doi:10.1128/EC.00108-09
- Rymarquis LA, Higgs DC, Stern DB (2006) Nuclear suppressors define three factors that participate in both 5' and 3' end processing of mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant J* 46 (3):448-461. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02711.x
- Santos-Merino M, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F (2018) Engineering the fatty acid synthesis pathway in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production. *Biotechnol Biofuels* 11:239. doi:10.1186/s13068-018-1243-4
- Schroda M, Blocker D, Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* 21 (2):121-131. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00652.x
- Serif M, Dubois G, Finoux AL, Teste MA, Jallet D, Daboussi F (2018) One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by DNA-free genome editing. *Nat Commun* 9 (1):3924. doi:10.1038/s41467-018-06378-9

- Shono C, Ariyanti D, Abe K, Sakai Y, Sakamoto I, Tsukakoshi K, Sode K, Ikebukuro K (2021) A green light-regulated T7 RNA polymerase gene expression system for Cyanobacteria. *Mar Biotechnol (NY)* 23 (1):31-38. doi:10.1007/s10126-020-09997-w
- Sizova I, Greiner A, Awasthi M, Kateriya S, Hegemann P (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J* 73 (5):873-882. doi:10.1111/tpj.12066
- Sproles AE, Fields FJ, Smalley TN, Le CH, Badary A, Mayfield SP (2021) Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. *Algal Research* 53:102158
- Srinivasan R, Gothandam KM (2016) Synergistic action of D-glucose and acetosyringone on *Agrobacterium* strains for efficient *Dunaliella* transformation. *PLoS One* 11 (6):e0158322. doi:10.1371/journal.pone.0158322
- Stevens DR, Rochaix JD, Purton S (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* 251 (1):23-30. doi:10.1007/BF02174340
- Te MR, Lohuis, Miller DJ (1998) Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *The Plant Journal* 13:427-435
- Teng C, Quin S, Liu J, Yu D, Liang C, Tseng C (2002) Transient expression of *lacZ* in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J of Appl Phycol* 14:495-500
- Tolonen AC, Liszt GB, Hess WR (2006) Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Appl Environ Microbiol* 72 (12):7607-7613. doi:10.1128/AEM.02034-06
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11 (9):636-646. doi:10.1038/nrg2842
- Wang B, Eckert C, Maness PC, Yu J (2018) A genetic toolbox for modulating the expression of heterologous genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth Biol* 7 (1):276-286. doi:10.1021/acssynbio.7b00297
- Wang K, Cui Y, Wang Y, Gao Z, Liu T, Meng C, Qin S (2020) Chloroplast genetic engineering of a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* with expression of an antimicrobial peptide. *Mar Biotechnol (NY)* 22 (4):572-580. doi:10.1007/s10126-020-09978-z
- Wang Y, Lee YY, Santaus TM, Newcomb CE, Liu J, Geddes CD, Zhang C, Hu Q, Li Y (2017) In situ enzymatic conversion of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 biomass into fatty acid methyl esters. *Bioenergy Res* 10 (2):438-448. doi:10.1007/s12155-016-9807-2
- Yarra R (2020) Plastome engineering in vegetable crop: current status and future prospects. *Mol Biol Rep* 47 (10):8061-8074. doi:10.1007/s11033-020-05770-3
- Zienkiewicz M, Krupnik T, Drozak A, Golke A, Romanowska E (2017) Chloramphenicol acetyltransferase-a new selectable marker in stable nuclear transformation of the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 254 (1):587-596. doi:10.1007/s00709-015-0936-9