

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE PARED  
CELULAR EN CLOROPLASTOS DE TABACO**

**PRESENTA**

**MC. EDWARD ALEXANDER ESPINOZA SÁNCHEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**ESCOBEDO, N.L.**

**JULIO DE 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE PARED  
CELULAR EN CLOROPLASTOS DE TABACO**

**PRESENTA**

**MC. EDWARD ALEXANDER ESPINOZA SÁNCHEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**ESCOBEDO, N.L.**

**JULIO DE 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE PARED  
CELULAR EN CLOROPLASTOS DE TABACO**

**PRESENTA**

**MC. EDWARD ALEXANDER ESPINOZA SÁNCHEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**ESCOBEDO, N.L.**

**JULIO DE 2015**

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL  
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

COMITÉ PARTICULAR

---

Dra. Sugey R. Sinagawa García  
Asesor Principal

---

Dr. Francisco Zavala García  
Asesor Auxiliar

---

Dra. Adriana Gutiérrez Díez  
Asesor Auxiliar

---

Dr. Jorge Ariel Torres Castillo  
Asesor Externo

---

Dr. Quintín Rascón Cruz  
Asesor Externo

---

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido obtener otro grado más de estudios y haberme dado la fortaleza para afrontar los obstáculos en mi vida.

A mis padres María Guadalupe Sánchez Coronel y Manuel Alejandro Espinoza Hernández por haberme apoyado incansablemente en cada etapa de mi vida afrontando conmigo tristezas y alegrías, a ellos que han permitido que hoy pueda escribir estas palabras en este documento, porque sin ellos mis ideas habrían sido sordas y efímeras, a ellos porque por más adulto que me vuelva, para ellos sigo siendo el niño que apoyaron a que cumpliera sus sueños.

A mis hermanos Xindy Emmanuel Espinoza Sánchez y Christiam Espinoza Sánchez, por tantos momentos de alegrías en estos 30 años de vida, porque sin ellos mi vida sería solitaria y no tendría sentido el esfuerzo y los logros... si no se tiene con quien compartirlos.

A mi sobrina Emma Alessandra, porque aunque aún no entiendes lo que esto significa, cuando logres entenderlo quizá comprendas que los sueños pueden alcanzar si es que existe una idea que crece cual semilla en un gran huerto.

A mi sobrina Enit Eleanny que aunque aún no te conozco estoy seguro que tu vida traerá alegría a la mía, y que el logro que hoy obtengo sea un ejemplo que puedas seguir.

A mi abuelo Valentín Sánchez molinos (Papá Vale) (QEPD), que se me fue antes de tiempo, pero que aunque no está, sé que me apoya. A mi abuelita Faustina coronel Salazar (Ma'tina) que aunque suelo darle dolores de cabeza, siempre me da palabras de aliento.

A mis padres, que aunque ya han sido mencionados, su importancia en mi vida es tal que merecen una doble mención.

A mis cuñadas, Celenita Felipe y Rubí Medina por saber hacer felices a mis hermanos, y haberme dado los más hermosos sobrinos que pueda uno desear.

A mis primos, Jonathan, Jennifer, Luis “Sangronio”, Maykary, Xiadany Citlaly, Junuethe, Vivían, Tristan, Mayán, Erick, Valentín, a mis sobrinos Eduardo y Yolotzin, a mis tíos Valentín, Genny, Toño, Lina, Xóchitl, Nacho, Homero y Ernesta porque han estado en mi vida.

*A todos ellos que hacen recordarme que lo único valioso que tengo, es mi familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Sugey R. Sinagawa García porque aun sin conocerme me aceptó como su estudiante permitiéndome desarrollarme profesionalmente; además, con su invaluable apoyo académico y moral ha permitido que pueda obtener un grado y una amiga.

Al Dr. Héctor Silos Espino, por haberme apoyado y alentado a superarme, y que aun con el paso de los años puedo seguir llamándolo mi amigo.

A Ignacio Escamilla, Xochitl, Gennifer, Homero, Ernesta, Valentín, José Antonio, Bernardina por sus incesantes palabras de aliento, haciéndome saber que siempre se puede obtener más de uno mismo.

A mis amigos Félix Valera Gonzales, Irving Michel López, Cristian Martínez Ávila, Blanca Flor Iglesias Figueroa, Jennifer Denisse Andrade Esparza, Sophy Ocampo porque aun con mi carácter accedieron a conocerme un poco más e hicieron más llevadera mi estancia.

A Erika del Rocío Gonzáles, Gabriela Zenteno Ramírez, Jesús López, Mario Sánchez, Edgardo Bernal, Edgar Saay, por su amistad durante la maestría y que aun hasta el día de hoy seguimos siendo amigos.

A los compañeros de posgrado Ivón Cerda, Fernando Villela, Eleazar Lugo, Zahidd Meza, Manuel y Pablo Alan por las pláticas amenas que surgieron.

A la Dra. Irene Victoria Vitela Mendoza por verme como a un hijo, y apoyarme en cada oportunidad que tiene.

Al Dr. Jorge Ariel Torres Castillo por brindarme su amistad y haberme apoyado durante mi estancia doctoral.

Al Dr. Quintín Rascón Cruz por haberme apoyado durante el desarrollo del proyecto, y haberme recibido en una estancia.

Al Dr. Alejandro I. Luna Maldonado por esas pláticas que me alentaron a seguir esforzándome.

A la Dra. Adriana Gutiérrez y al Dr. Francisco Zavala García por haber fungido como mis asesores en la investigación.

Al Ing. Guillermo Batista Ortiz por el apoyo que me brindó para seguir con mis estudios.

A la Lic. Claudia Rodríguez Silva por el apoyo que me proporcionó durante el periodo de doctorado.

A mis compañeros de laboratorio Jesús, Paola, Josué, Abraham, Pepe Walls, Erick, Cecilia y a su “muro de la vergüenza” por esas risas que provocaron haciendo divertida la investigación.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme permitido concluir mis estudios en su programa de Doctorado.

A Conacyt por haberme brindado la beca con la cual pude obtener un grado más de estudios.

A todos los que de algún modo me han ayudado para cumplir mis metas, pero que para su mención aquí tendríamos que ocupar un número similar de hojas a las que comprenden esta tesis.

*Todo mi patrimonio son mis amigos  
(Emily Dickinson).*



## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HIPOTESIS</b>	<b>6</b>
<b>1.2 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1 Objetivos Específicos</b>	<b>7</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Ingeniería de Cloroplastos</b>	<b>8</b>
2.1.1. Cloroplastos	9
2.1.2. Genes Plastídicos	12
2.1.3. Código Genético en Cloroplastos	12
2.1.4. Integración de Transgenes en Plástido	14
2.1.5. Regulación de la Expresión Genética	15
<b>2.2. Transformación Genética de Cloroplastos</b>	<b>18</b>
2.2.1. Vectores de Transformación	18
2.2.2. Secuencias de Recombinación Homóloga	20
2.2.3. Promotores	21
2.2.4. Secuencias no Traducidas (5'/3' UTR)	23
2.2.5. Secuencias Shine-Dalgarno	25
<b>2.3. Métodos de Transformación</b>	<b>27</b>
2.3.1. Marcadores de selección	28
2.3.2. Selección y regeneración	31
2.3.2.1. Estado heteroplásmico y estado homoplásmico	31
<b>2.4. Aplicaciones Actuales de la Biotecnología Plastídica</b>	<b>33</b>
2.4.1. Aplicaciones Básicas	33
2.4.2. Investigaciones Aplicadas	34
2.4.2.1. Acumulación de proteínas recombinantes	35
2.4.2.2. Biofarmacéutica	36
2.4.2.3. Ingeniería metabólica	38
2.4.2.4. Aplicaciones agronómicas	39
2.4.2.5. Enzimas hidrolíticas de paredes celulares	41
2.4.2.6. Métodos de acción de enzimas hidrolíticas: pectin liasas, manganeso peroxidasas y celulasas	44
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Materiales</b>	<b>47</b>
3.1.1. Material Vegetal	47
3.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	47
<b>3.2. Métodos</b>	<b>48</b>
3.2.1. Cepas de <i>E. coli</i>	48

3.2.2. Aislamiento de ADN Plasmídico (Miniprep)	48
3.2.3. Transformación de <i>E. coli</i>	49
3.2.4. Vectores de Transformación de Cloroplastos	50
3.2.5. Clonación de los Genes de Interés en los Vectores de Expresión para Cloroplastos	50
3.2.6. Transformación genética de cloroplasto	51
3.2.6.1. Preparación de partículas de oro	51
3.2.6.2. Preparación de material utilizado para bombardeo	52
3.2.7. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco	52
3.2.7.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN plasmídico	52
3.2.8. Bombardeo de Hojas de Tabaco	53
3.2.9. Selección y Regeneración de los Explantes Transformados	54
3.2.10. Análisis de la Integración del ADN en las Plantas Transplastómicas por Southern blot	55
3.2.10.1. Extracción de ADN	55
3.2.11. Detección de la Integración de los Transgenes en el Genoma de los Cloroplastos Mediante PCR	56
3.2.11.1. Marcaje de sondas para Southern blot condigoxigenina	56
3.2.11.2. Digestión de ADN de las plantas y su separación en geles de agarosa	57
3.2.11.3. Transferencia de ADN a las membranas de nylon	58
3.2.11.4. Prehibridación e hibridación	59
3.2.11.5. Lavado de membranas	59
3.2.12. Análisis de acumulación de mRNA en plantas transplastómicas por Northern blot	61
3.2.12.1. Extracción de ARN	61
3.2.12.2. Marcaje de las sondas con digoxigenina-11-dUTP para Northern blot	62
3.2.12.3. Separación de ARN en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes	63
3.2.12.4. Transferencia de ARN a membranas de nylon	63
3.2.12.5. Prehibridación e hibridación	64
3.2.12.6. Lavados de membranas	64
3.2.12.7. Buffer de prehibridación High SDS y lavado de membranas reutilizadas	65
3.2.13. Extracción de proteínas	66
3.2.14. Detección de actividad hidrolítica en solución empleando sustratos comerciales	66
3.2.14.1. Actividad enzimática de pectin liasa	66
3.2.14.2. Actividad enzimática de $\beta$ -glucosidasa	67
3.2.14.3. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa	68
3.2.14.4. Actividad enzimática de celulasa	68
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Diseño de las Secuencias de los Genes <i>PelA</i>, <i>MnP-2</i>, <i>Bgl-1</i>, <i>CelA-B</i></b>	<b>70</b>
<b>4.2. Clonación de los Genes de Interés: Construcción de Vectores de Expresión Cloroplastídicos</b>	<b>78</b>

<b>4.3. Transformación de Cloroplastos</b>	82
4.3.1. Pureza de ADN Plasmídico	82
4.3.2. Bombardeo y Regeneración de Tejido Transformado	82
<b>4.4. Fenotipos de Plántulas de Tabaco Transformadas por Biobalística</b>	86
4.4.1. Condiciones <i>in vitro</i>	86
4.4.2. Fenotipos de plantas maduras en invernadero	87
<b>4.5. Producción de Semillas de Plantas Transplastómicas</b>	90
<b>4.6. Análisis Molecular de Plantas Transplastómicas</b>	90
4.6.1. Análisis de Integración de ADN en las Plantas Transplastómicas: PCR y Southern-blot	90
4.6.2. Análisis de la Expresión de ARN Mensajeros por Northern blot	91
4.6.3. Análisis de la expresión de ARN Mensajero de pHM4 ( <i>CelA-CelB</i> ) por Northern blot	93
4.6.4. Segregación de Genes de Interés	94
<b>4.7. Análisis Enzimáticos</b>	96
4.7.1. Actividad <i>PeIA</i>	96
4.7.2. Actividad de Manganeso peroxidasa	98
4.7.3. Actividad de Celulasas <i>Bgl1</i> , <i>CelA</i> y <i>CelB</i>	98
<b>4.8. Niveles de Actividad en Hojas de las Enzimas <i>PeIA</i>, <i>MnP-2</i>, <i>Bgl1</i>, <i>CelA-CelB</i>, <i>CelA</i> y <i>CelB</i></b>	102
<b>5. DISCUSIÓN</b>	105
<b>6. CONCLUSIONES</b>	112
<b>7. LITERATURA CITADA</b>	114

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Produccion de proteínas de <i>PeIA</i> y <i>MnP-2</i> en plantas transplastmicas de tabaco de acuerdo a Jin <i>et al.</i> (2011). Una unidad de actividad de pectin liasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu\text{mol}$ de ácido poligalacturónico por minuto bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad para MnP es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 $\mu\text{mol}$ de sustrato por minuto bajo las condiciones del ensayo. Los resultados se muestran como el promedio de tres plantas transplastómicas (NtpES4A, B, C y NtpES5A, B, C).	103
2	Produccion de proteínas de <i>Bgl1</i> , <i>CelA-CelB</i> , <i>CelA</i> y <i>CelB</i> en plantas transplastmicas de tabaco de acuerdo a Jin <i>et al.</i> (2011). Una unidad de actividad $\beta$ -Glucosidasa es definida como 1 $\mu\text{mol}$ de <i>p</i> -nitrophenol liberado por minuto bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad de celulasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu\text{mol}$ de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. Los resultados se muestran como el promedio de tres plantas transplastómicas (NtpES6A, B, C, NtpHM4A, B, C, NtpHM5A, B, C, NtpHM6A, B, C).	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Mapa circular del genoma del cloroplasto de tabaco, constituido por dos regiones de repetidos invertidos (IRA e IRA), separado por la región pequeña (SSC) y grande (LSC) de copia única. Los genes internos son transcritos en dirección a las agujas del reloj, mientras que los exteriores son transcritos en contra de este. Los IR se muestran con líneas más grandes del círculo. Los genes con intrones son marcados con asterisco (*). Las flechas entre los nombres de los genes representan los operones que se sabe que existen en el genoma del tabaco. Los genes que codifican para productos que intervienen en la síntesis de proteína son marcadas en rojo y café; los genes que codifican para productos que intervienen la fotosíntesis están indicados en verde, y los genes que codifican a productos que realizan varias funciones están marcados en amarillo (Daniell, 2006b).	11
2	Código genético universal, optimizado en cloroplastos: 64 codones (tres codones de paro) de acuerdo a Koonin y Novozhilov (2009).	13
3	Secuencia del vector pES4. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-PelA-TrbcL</i> ).	72
4	Secuencia del vector pES5. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-MnP-2-TrbcL</i> ).	73
5	Secuencia del vector pES6. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-Bgl1-</i>	74

	<i>TrbcL</i> ).	
6	Secuencia del vector pHM4. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-CelA-CelB-TrbcL</i> ).	75
7	Secuencia del vector pHM5. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-CelA-TrbcL</i> ).	76
8	Secuencia del vector pHM6. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete fue ordenado colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb ( <i>Prrn16S</i> , SD, LS <i>rbcL-CelB-TrbcL</i> ).	77
9	Mapa de restricción de vectores de transformación de plástidos en el vector pSS24. a) vector pSS24 mostrando el sitio múltiple de clonación, y regiones <i>rbcL/accD</i> como sitio de recombinación homóloga. b) vector pES1 conteniendo el gen <i>PelA</i> , c) vector pES2 con el gen <i>MnP-2</i> , d) vector pES3 conteniendo el gen <i>Bgl1</i> ; estos vectores cuentan con el gen <i>aadA</i> como gen marcador de selección. Los genes están bajo el promotor <i>rrn16S</i> y una secuencia terminadora del gen <i>rbcL</i> .	79
10	Mapa de restricción de vectores de transformación de plástidos. a) vector pES4 conteniendo el gen <i>PelA</i> , b) vector pES5 con el gen <i>MnP-2</i> , c) vector pES6 conteniendo el gen <i>Bgl1</i> , d) vector pHM4 conteniendo el dicistrón <i>CelA-CelB</i> , e) vector pHM5 conteniendo el gen <i>CelA</i> , f) vector pHM6 conteniendo el gen <i>CelB</i> para clonación en los sitios de recombinación homóloga <i>rrn16</i> y <i>3'rps12</i> en el genoma de cloroplasto; estos vectores cuentan con el gen <i>aadA</i> como gen marcador de selección. Los genes están bajo el promotor <i>rrn16S</i> y una secuencia terminadora del gen <i>rbcL</i> .	80
11	Regeneración de plántulas de tabaco. a) explantes en expansión de primera selección de dos semanas de edad empezando el proceso de selección, b,c) explante regenerado de primera selección a las tres semanas mostrando resistencia a espectinomicina 500 mg L <sup>-1</sup> . d) explantes regenerados de segunda	84

- selección en medio RMOP suplementado con 500 mg L<sup>-1</sup> de espectinomycin.
- 12** Producción de semillas de plantas transplastómicas de tabaco en invernadero. *a)* planta transplastómicas de siete semanas de edad en floración, *b)* flor, *c)* vainas con semillas de tabaco, *d)* planta wild type en floración. Las plantas de todas las líneas transformadas no mostraron retrasos en el periodo de floración y/o producción de semillas; los fenotipos de las flores fueron normales. 85
- 13** Hojas de plantas de tabaco aclimatadas en invernadero de tres semanas de edad (joven) y dos meses de edad (madura). *a,b)* hojas de plantas wild type, *a)* madura *b)* joven; *c,d)* hojas de plantas de línea NtpES4/*PeIA*, *c)* madura *d)* joven; *e,f)* hojas de plantas de línea NtpES5/*MnP-2*, *e)* madura *f)* joven; *g,h)* hojas de plantas de línea NtpES5/*Bgl1*, *g)* madura *h)* joven; *i,j)* hojas de plantas de línea NtpHM4/*CelA-CelB*, *i)* madura *j)* joven; *k,l)* hojas de plantas de línea NtpHM5/*CelA*, *k)* madura *l)* joven. Los fenotipos fueron normales en cinco líneas de plantas transplastómicas (NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM5 y NtpHM6); sin embargo, en la línea NtpHM4 las hojas mostraron fenotipo variegado en ~30% de las hojas en etapa juvenil y 10% de la hoja en etapa adulta. 88
- 14** Plantas de tabaco aclimatadas en invernadero. *a,b)* plantas de la línea NtpES4, *c,d)* NtpES5, *e,f)* NtpES6, *g,h)* NtpHM4, *i,j)* NtpHM5, *k,l)* NtpHM6. *a,c,e,g,i,k)* plantas jóvenes de tres semanas de edad, *b,d,f,h,j,l)* Plantas maduras de siete semanas de edad en floración. 89
- 15** Análisis moleculares de plantas transplastómicas. *a)* análisis de PCR de seis líneas transplastómicas (NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5, NtpHM6) marcadas con digoxigenina, la integración de dig-11-dUTP se observa por diferencia de peso molecular. Las flechas indican los fragmentos obtenidos. *b, c)* análisis de Southern blot de las líneas NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5 y NtpHM6 (*PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA*, *CelB* respectivamente) mostrando la integración en la región *rr16/3'rps12* de la región IR del genoma del cloroplasto. 92
- 16** Análisis Northern blot de las seis líneas transplastómicas (NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5, NtpHM6) modificadas con los genes *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA*, *CelB*. Se muestran los transcritos primarios generados por los genes de 93

- interés. Imágenes obtenidas por marcación con digoxigenina (dig-11-dUTP).
- 17** Obtención de plántulas de tabaco a partir de semillas de plantas transplastómicas. Las semillas no mostraron problemas en germinación y/o retardo del mismo. Las plántulas mostraron un fenotipo similar a las plantas no transplastómicas, *a*) semillas de siete días en medio de cultivo RM suplementado con espectinomicina 500 mg L<sup>-1</sup>, *b*) plántulas de tabaco de dos semanas de edad, *c*) plántulas de tabaco de cuatro semanas de edad colocadas en medio RM sin antibiótico para su desarrollo, *d*) plántulas de tabaco de cinco semanas mostrando desarrollo normal. 95
- 18** Análisis enzimático de plantas transplastómicas de tabaco modificadas con los genes *PelA* y *MnP-2*, (*a, d*) actividad enzimática de *PelA* y *MnP-2* en hojas jóvenes de tres semanas de edad y maduras de siete semanas de edad. (*b, c*) actividad enzimática de *PelA* de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura. (*d, e*) actividad enzimática de *MnP-2* de plantas maduras bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. El análisis muestra mayor actividad en plantas transplastómicas comparadas con plantas no transformadas en todas las condiciones. Los resultados se muestran como un promedio de tres plantas (NtpES4A, B, C y NtpES5A, B, C). 97
- 19** Actividad enzimática en plantas transplastómicas de tabaco. (*a*) actividad enzimática de '*Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* y *CelB*' en plantas jóvenes (tres semanas de edad) y maduras (siete semanas de edad), (*b, c*) Actividad enzimática de proteínas '*CelA-CelB*' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de temperatura y pH, (*d, e*) Actividad enzimática de proteínas de '*CelA*' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura, (*f, g*) Actividad enzimática de proteínas de '*CelB*' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura, (*h, i*) Actividad enzimática de proteínas '*Bgl1*' e hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura. Los análisis muestran mayor actividad en plantas transplastómicas con respecto a plantas de tipo silvestre en todas las condiciones. Los resultados son mostrados como un promedio de tres plantas (NtpES6-A, B, C, NtpHM4-A, B, C, NtpHM5-A, B, C, NtpHM6-A, B, C). 101



## RESUMEN

La alta capacidad del genoma del cloroplasto para integrar y expresar transgenes en altos niveles, hace de la tecnología transplastómica una buena opción para producir proteínas de interés. Este reporte presenta la expresión estable de una pectinasa (gen *PeIA*), una  $\beta$ -glucosidasa (gen *Bgl1*), dos celulasas (genes *CelA* y *CelB*) y la primer expresión estable de una manganeso peroxidasa (gen *MnP-2*) en el genoma de cloroplastos de tabaco. Se construyeron seis vectores: pES4, pES5, pES6, pHM4, pHM5 y pHM6 derivados de pPRV111A conteniendo los genes sintéticos *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* y *CelB*, respectivamente. Los genes se flanquearon por un promotor sintético del gen *rrn16S* y una secuencia sintética 3'UTR del gen *rbcL*. La integración en la región intergénica *rrn16S* y *3'rps12* se confirmó por análisis de Southern blot. El procesamiento estable de los transcritos se confirmó por un análisis de Northern blot. Se realizó un análisis enzimático para detectar la expresión y funcionalidad de las enzimas recombinantes, las plantas maduras mostraron mayor actividad comparado con plantas de tipo silvestre. Las plantas transplastómicas exhibieron 58.5% más actividad de pectinasa a pH neutro y a 60°C, mientras que manganeso peroxidasa mostró alta actividad a pH 6 y 65°C; en el caso de las celulasas, todas las enzimas mostraron mayor actividad a pH 5 ( $\beta$ -glucosidasa: 30.45

U/mg, CelA-CelB 58 U/mg, CelA 49.10 U/mg y CelB 48.72 U/mg) a 40°C para  $\beta$ -glucosidasa y 65°C para celulasas. Las plantas transplastómicas mostraron un desarrollo similar a las plantas de tipo silvestre; sin embargo, la línea pHM4 mostró fenotipos variegados en hojas. Los análisis mostraron que los genes de enzimas hidrolíticas *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* y *CelB* pueden integrarse y expresarse en el genoma de cloroplastos con alta actividad; de este modo, debido a que una planta madura en promedio cuenta con ~ 470 g de biomasa, es posible producir 66,676.25 unidades de pectinasa, 21,715.46 unidades de manganeso peroxidasa, 338,081.0 unidades de celulasas A-B, 231,456.7 unidades de celulasa A, 206,669.8 unidades de celulasa B y 139,395.0 unidades de  $\beta$ -glucosidasa por planta. Este estudio sustenta información sobre métodos y estrategias de expresión de enzimas hidrolíticas con potencial aplicación biotecnológica utilizando plantas transplastómicas.

*Palabras clave: Transformación genética, cloroplastos de tabaco, celulasas, pectinasa, ligninasas, expresión estable*

## ABSTRACT

The high capacity of chloroplast genome to integrate and express transgenes in high levels, make of the transplastomic technology a good option to produce proteins of interest. This report, show the stable expression of a pectinase (*PelA* gene), a  $\beta$ -glucosidase (*Bgl1* gene), two cellulases (*CelA* and *CelB* genes) and the first stable expression of a manganese peroxidase (*MnP-2* gene) in the tobacco chloroplast genome. Six vectors were constructed: pES4, pES5, pES6, pHM4, pHM5 y pHM6 derived from pPRV111A containing the synthetic genes *PelA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* and *CelB*, respectively. The genes were flanked by a synthetic promoter from *rrn16S* gene and a synthetic sequence 3'UTR from *rbcL* gene. The integration in the intergenic region *rrn16S* and *3'rps12* was confirmed por Southern blot analysis. The stable processing of transcripts was confirmed by Northern blot analysis. An enzymatic analysis was performed to detect the expression and functionality of recombinant enzymes, the mature plants showed more activity compared with wild type plants. The transplastomic plants showed 58.5% more pectinase activity at neutral pH and 60°C, whereas that manganese peroxidase showed more activity at pH 6 and 65°C; in the case of cellulases, all enzymes showed higher activity at pH 5 ( $\beta$ -glucosidase: 30.45 U/mg, *CelA-CelB* 58 U/mg, *CelA* 49.10 U/mg and *CelB* 48.72 U/mg) at 40°C to  $\beta$ -glucosidase and 65°C to cellulases. The transplastomic plants

showed a similar development to wild type plants; however, the pHM4 lines showed variegate phenotypes in leaves. The analysis showed that genes of hydrolytic enzymes *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* and *CelB* can be integrated and expressed in the chloroplast genome with high activity; in this way, due of that a mature plant in average has ~ 470 g of biomass, is possible yield 66,676.25 units of pectinase, 21,715.46 units of manganese peroxidase, 338,081.0 units of cellulase A-B, 231,456.7 units of cellulase A, 206,669.8 units of cellulase B and 139,395.0 units of  $\beta$ -glucosidase per plant. This study support information of methods and strategies of expression of hydrolytic enzymes with potential applications in biotechnology using transplastomic plants.

*Key words: Genetic transformation, tobacco chloroplast, cellulases, pectinase, ligninase, stable expression*

## 1. INTRODUCCIÓN

Las paredes celulares son un complejo dinámico de sofisticadas estructuras implicadas en el crecimiento celular, desarrollo, morfología y confieren impermeabilidad a las células de las plantas; debido a esto, juegan un papel importante en las respuestas al estrés abiótico así como a los ataques por microorganismos (Soriano *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011). Las paredes celulares están integradas comúnmente por una pared primaria compuesta por celulosa, pectina y hemicelulosa; además, también se componen de una pared secundaria producida por el cese de crecimiento de células en expansión de células especializadas; la pared celular, está constituida por celulosa formando múltiples capas embebidas en un matriz de lignina y hemicelulosa (Cosgrove, 1993); así, las paredes se integran por residuos de celulosa, lignina, pectina y otros polímeros. De estos constituyentes los componentes lignocelulósicos son únicamente estructurales, constituyendo cerca del 40% de la biomasa con estructura de polímeros de glucosa con enlaces  $\beta$ -1-4 de 100 a 14000 residuos (Beguin y Aubert, 1994; Ragauskas *et al.*, 2006). Los constituyentes de las paredes celulares son los residuos más abundantes que produce nuestra sociedad en forma de madera, desechos municipales, agricultura, hierbas y desechos forestales. Aunque no son tóxicos, si se considera que las paredes celulares comprenden cerca

del 90% de peso seco de las plantas, la acumulación de estos productos representa un deterioro del ecosistema y una pérdida de materia prima (Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002; Sánchez, 2009; Petersen y Bock, 2011; Jung *et al.*, 2013).

Los componentes de las paredes celulares pueden utilizarse si existiera un método eficiente para su extracción (Petersen y Bock, 2011) pero su naturaleza heterogénea es obstáculo para el uso de estos componentes (Cosgrove, 2005; Bayer *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008). En este sentido, los microorganismos son una importante fuente de enzimas que pueden procesar eficientemente este tipo de materiales (Wei *et al.*, 2009).

La ingeniería genética de cloroplastos ha tenido avances importantes en la biotecnología de plantas y tiene un papel crucial en el mejoramiento genético en áreas como agricultura, medicina, alimentación, medicina y medio ambiente (Quesada-Vargas *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2010). Esta tecnología involucra la inserción de genes en el genoma del cloroplasto, lo cual presenta múltiples ventajas como nulos efectos de posición, la ausencia de efectos epigenéticos y la posibilidad de contener los transgenes (Maliga, 2004; Daniell *et al.*, 2005c). Plantas como tabaco '*Nicotiana tabacum*' (Svab *et al.*, 1990a; Verma y Daniell, 2007), papa '*Solanum tuberosum*' (Sidorov *et al.*, 1999), tomate '*Solanum lycopersicum*' (Ruf *et al.*, 2001), soya (Dufourmantel *et al.*, 2004), coliflor '*Brassica oleracea*' (Nugent *et al.*, 2006) y lechuga '*Lactuca sativa*' (Lelivelt *et al.*, 2005; Kanamoto *et al.*, 2006) han sido eficientemente transformadas para la expresión de múltiples proteínas en el genoma de los cloroplastos (Bock, 2007; Oey *et al.*, 2009a; Verma *et al.*, 2010; Maliga y Bock,

2011) con niveles de expresión de hasta 70% de proteínas totales en la hoja (Oey *et al.*, 2009a; Maliga y Bock, 2011).

En la actualidad, la transformación genética de cloroplastos se ha utilizado para la expresión de diversas proteínas de interés biotecnológico con énfasis en el impacto ambiental (Maliga y Bock, 2011).

Para la producción industrial, nuevas enzimas han sido requeridas, y los microorganismos son fuente importante de éstas (Beguin y Aubert, 1994; Wei *et al.*, 2009) como la pectin liasa (EC 4.2.2.2), enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente y con actividad endoglucanasa con múltiples subfamilias (PL1, PL2, PL3, y PL9) (Shevchik *et al.*, 1997; Cantarel *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2013) involucrada en factores de virulencia, en el ataque de patógenos e involucrada en la ruptura de sitios específicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  de ácido poligalacturónico, principal componente de la pectina de las paredes liberando 4,5- di, y trigalacturonatos insaturados de varios pectatos (Barras *et al.*, 1994; Herron *et al.*, 2000).

En el caso de la lignina, componente principal de la pared celular, algunos hongos utilizan un coctel de enzimas (lacasas 'Lac', lignin peroxidasas 'LiP' y manganeso peroxidasas 'MnP') capaces de degradar la lignina eficientemente; de estas, las MnP's muestran alta homología de sus secuencias primarias con respecto a otras ligninasas (Gold y Alic, 1993; Irie *et al.*, 2000; Davarpanah *et al.*, 2012) que actúan removiendo un electrón de una fracción de fenol de la lignina para generar un fenoxi radical y oxidarlo de  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$  mismos que se estabilizan por acción de ácidos orgánicos quelantes lo cual facilita la degradación de compuestos fenólicos en

presencia de  $H_2O_2$  (Nagai *et al.*, 2007). La lignina es la fuente más importante de polímeros aromáticos en la naturaleza y su descomposición es necesaria para el reciclado de carbón, por lo que la actividad de las MnP's es importante en la conservación del ecosistema (Sánchez, 2009; Wong, 2009).

En el caso de la celulosa, su conformación microfibrilar la hace recalcitrante a su degradación enzimática (Petersen y Bock, 2011) por lo que se requiere un consorcio de enzimas que incluyen endo- $\beta$ -glucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucan4-glucohidrolasa 'EC 3.2.1.4'), exoglucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasa 'EC 3.2.1.91'), glucanglucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucanglucohidrolasa 'EC 3.2.1.74'), y  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucosidoglucohidrolasa 'EC 3.2.1.21'); estas enzimas son naturalmente producidas por un amplio espectro de bacterias y hongos, usualmente existen como celulosomas unidas a la pared celular de bacterias y en el caso de los hongos son secretadas al ecosistema (Juturu y Wu, 2014).

En la degradación de la celulosa, las endoglucanasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces glucosídicos resultado en un decremento de la longitud de polímeros y un incremento gradual en la concentración de azúcares reductores (Wood y Bhat, 1988; Beguin y Aubert, 1994), seguido por exoglucanasas que hidrolizan las cadenas de celulosa removiendo celobiosa de los reducidos finales o no reducidos (Teeri, 1997); posteriormente,  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa para finalmente liberar D-glucosa (Rixon *et al.*, 1992; Goyal y Eveleigh, 1996). En este sentido, estas enzimas son actualmente la tercera enzima más utilizada en el área industrial a nivel mundial y su producción está enfocada para el procesamiento de algodón, el reciclado del



papel, como detergente, extracción de jugos y como parte de aditivos para alimentos de consumo animal (Beguin y Aubert, 1994; Wilson, 2009).

La capacidad de los cloroplastos para expresar múltiples genes abre la posibilidad de expresar genes de enzimas lignocelulósicas (Kleczkowski *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2011). Además, los cloroplastos cuentan con la capacidad de expresar varios genes en forma de operones; en este sentido, las enzimas celulolíticas se expresan a menudo como un dicistrón y sus secuencias pueden estar traslapadas como las celulasas tipo A y B (*CelA* y *CelB*) las cuales comparten secuencias transponiendo la región terminadoras sobre la región promotora del otro gen, posiblemente por origen parálogo (Bok *et al.*, 1998); este tipo de secuencias ofrecen la posibilidad de analizar la expresión policistrónica de enzimas remodeladoras de paredes celulares y el efecto en el metabolismo de plantas. Aunque la expresión de este tipo de enzimas, se ha estudiado en sistemas bacterianos, hay pocos estudios relacionados a la expresión en compartimentos cloroplastídicos (Miyairi *et al.*, 2004; Tonouchi *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Petersen y Bock, 2011).

En el presente reporte se utilizó la tecnología transplastómica para expresar genes de enzimas hidrolíticas de paredes celulares para estudiar su transcripción, expresión, estabilidad, plegamiento de la proteína y la actividad enzimática que presentan sus productos en los cloroplastos de plantas de tabaco, y el efecto de su expresión en el crecimiento de plantas así como la estable segregación de los transgenes.

## 1.1. HIPÓTESIS

Las enzimas son moléculas que pueden catalizar reacciones en el metabolismo celular beneficiando o afectando la integridad de la célula, por lo tanto, la sobreexpresión de enzimas involucradas en la degradación de polímeros de la pared celular en el genoma de cloroplastos, puede generar efectos secundarios en la integridad de las plantas debido a la acción de enzimas químicamente activas.

## **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de enzimas involucradas en la degradación de polímeros de la pared celular en el genoma de los cloroplastos de plantas de tabaco, así como la estabilidad, funcionalidad de dichas enzimas en los compartimientos cloroplastídicos y el efecto que pudiese presentar sobre el fenotipo de las plantas.

### **1.2.1. Objetivos Específicos**

- 1.** Diseñar y construir vectores de expresión de cloroplastos que contengan los genes que codifican para las enzimas de degradación de la pared celular: celulasas,  $\beta$ -glucosidasas, pectinasas y ligninasas.
- 2.** Transformar cloroplastos de plantas de tabaco mediante biobalística con los vectores de expresión conteniendo los genes de interés, así como evaluar molecularmente la integración eficiente de los transgenes mediante PCR, Southern blot y Northern blot.
- 3.** Evaluar la actividad enzimática mediante el uso de sustratos comerciales, además de las características morfológicas de las plantas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Ingeniería de Cloroplastos

La ingeniería genética ha generado avances importantes en la biotecnología vegetal y se espera que siga desempeñando un papel crucial en los próximos años; en este sentido, la posibilidad de expresar genes en el genoma plastídico ha creado nuevas oportunidades para la biotecnología de plantas (Bock 2007; Daniell *et al.*, 2009). Si bien la transformación genética de cloroplastos se implementó hace dos décadas (Maliga, 2004; Daniell *et al.*, 2005c) el potencial biotecnológico ha sido ampliamente demostrado, ofreciendo la ventaja de disminuir efectos epigenéticos (Daniell *et al.*, 2006; Bock, 2007).

Una de las ventajas de la transformación genética de cloroplasto es la contención de los transgenes, que aunque se ha propuesto que algunos cloroplastos son transmitidos biparentalmente (Hagemann, 2002), la recombinación no puede ser demostrada aún (Maliga, 2002; Khakhlova y Bock, 2006), por lo que se acepta que son heredados uniparentalmente con un alto porcentaje de conservación (Jansen *et al.*, 2005) aumentando considerablemente la contención de transgenes (Ruf *et al.*, 2007; Svab y Maliga, 2007). Por estas características, los cloroplastos representan una ventaja si se utilizan como herramienta biotecnológica para expresar proteínas

en plantas (Shinozaki *et al.*, 1986; Hagemann, 2004), aunado a la capacidad de insertar múltiples genes en un solo evento de transformación (De Cosa *et al.*, 2001; Daniell y Dhingra, 2002; Lossl *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003; Quesada-Vargas *et al.*, 2005), así como la posibilidad de eliminar los genes marcadores de selección después de la transformación (Lutz y Maliga, 2007; Tungsuchat-Huang *et al.*, 2010).

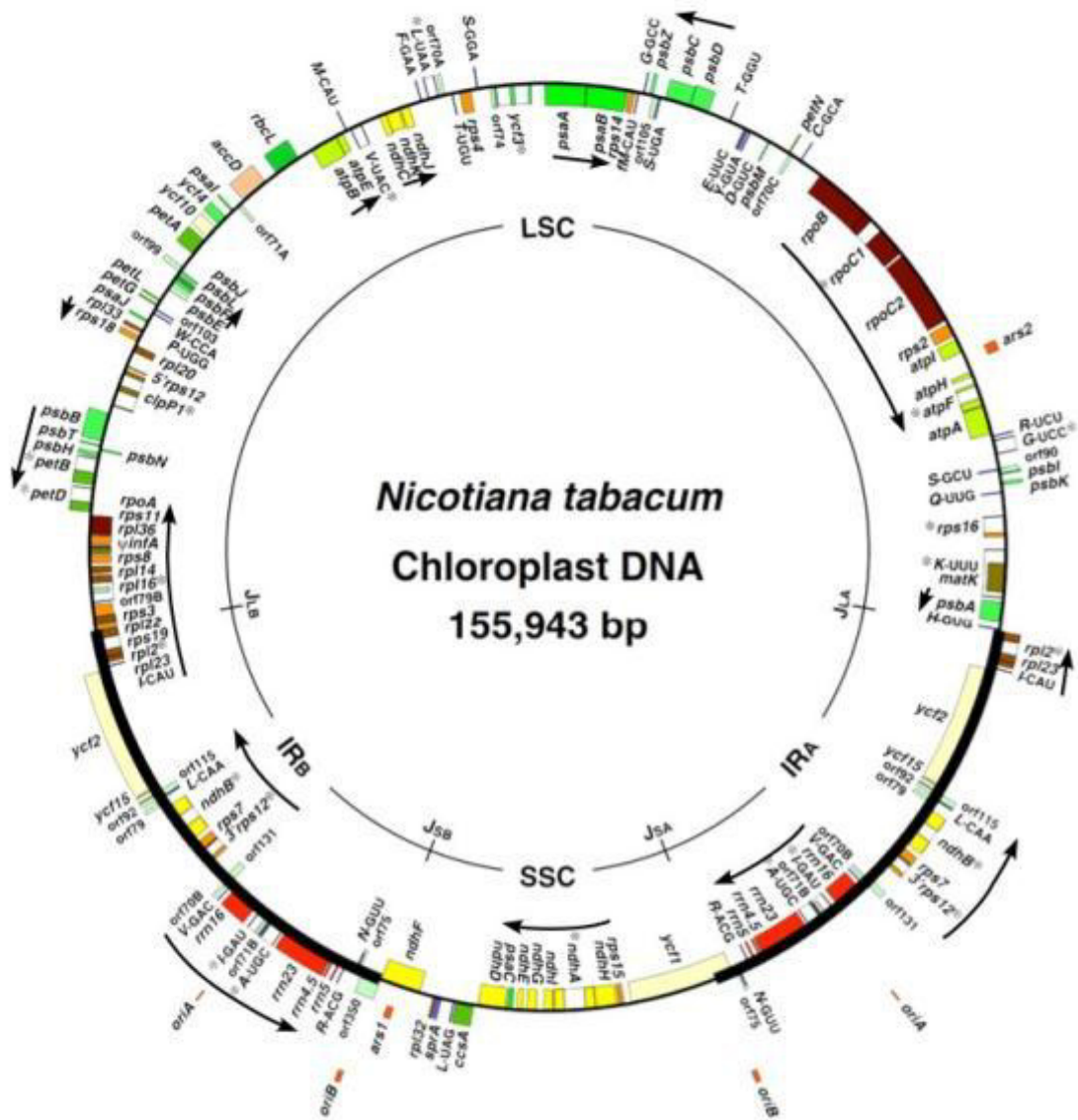
### **2.1.1. Cloroplastos**

La evolución de la fotosíntesis oxigénica cambió al mundo, esto fue posible debido a la capacidad de las cianobacterias de obtener electrones del agua (Holland, 2006; Farquhar *et al.*, 2011); estas cianobacterias muestran gran homología con el genoma del cloroplasto (Martin *et al.*, 2002); muchos descubrimientos científicos soportan la idea de que los genomas de mitocondrias y cloroplastos son remanentes de los genomas de los procariotas endosimbiontes (Margulis, 1970; Verma y Daniell, 2007; Keeling, 2010).

El cloroplasto contiene la maquinaria enzimática completa en el estroma y se transportan electrones dentro de las membranas del tilacoide para la fotosíntesis; otros múltiples procesos bioquímicos que se llevan a cabo dentro del cloroplasto incluyen biosíntesis de ácidos grasos, aminoácidos, pigmentos y vitaminas (Palmer, 1991; Jansen *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2014). De los tres compartimentos de las células de plantas superiores, el cloroplasto contiene un material genético complejo (plastoma) semiautónomo bicatenario, con forma circular de la cual pueden haber

conformaciones alternativas de forma lineal y concanteméricas *in vivo* altamente poliploide (Palmer, 1985; Wakasugi *et al.*, 2001; Oldenburg y Bendich, 2004).

El genoma del cloroplasto varía de 35 a 217 kb pero entre los organismos fotosintéticos superiores se ubican entre 115 y 165 kb (Jansen *et al.*, 2005); en este genoma se albergan alrededor de 120 genes codificados en ambas cadenas. Los genes están involucrados en procesos fotosintéticos y procesos de replicación, transcripción y traducción del mismo genoma, los genes se encuentran organizados en operones con expresiones policistrónicas. El genoma, estructuralmente está configurado cuadripartitamente incluyendo dos copias de 'repetidos invertidos' (IR) con genes duplicados (IRA/IRB) separadas por una región larga y una corta de una sola copia (LSC y SSC; la Figura 1 muestra el genoma del cloroplasto de tabaco '*Nicotiana tabacum*') (Daniell, 2006b). Los cloroplastos, presentan una alta cantidad de copias de su genoma (~100) que aunada a la alta población cloroplastídica (hasta 100 cloroplastos por célula) es posible tener 10,000 genomas de cloroplasto por célula (Palmer, 1985; Sugiura, 1992; Wakasugi *et al.*, 2001; Ahlert *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Mapa circular del genoma del cloroplasto de tabaco, constituido por dos regiones de repetidos invertidos (IRA e IRA), separado por la región pequeña (SSC) y grande (LSC) de copia única. Los genes internos son transcritos en dirección a las agujas del reloj, mientras que los exteriores son transcritos en contra de este. Los IR se muestran con líneas más grandes del círculo. Los genes con intrones son marcados con asterisco (\*). Las flechas entre los nombres de los genes representan los operones que se sabe que existen en el genoma del tabaco. Los genes que codifican para productos que intervienen en la síntesis de proteína son marcadas en rojo y café; los genes que codifican para productos que intervienen la fotosíntesis están indicados en verde, y los genes que codifican a productos que realizan varias funciones están marcados en amarillo (Daniell, 2006b).

### 2.1.2. Genes Plastídicos

La secuenciación del genoma del cloroplasto ha mostrado que el número de genes varía de 63 a 252 dependiendo de la fitoespecie y el tipo de célula (Yukawa *et al.*, 2006); pueden encontrarse de 1000 a 10 000 copias de ptDNA contenidas en 10 a 100 plástidos según Shaver *et al.* (2006) y Zoschke *et al.* (2007). Las células de hoja de *Arabidopsis* contienen aproximadamente 120 cloroplastos y un total de 1,000 a 1,700 copias de ptDNA, mientras que *Nicotiana tabacum* presenta aproximadamente 100 cloroplastos y 10,000 copias de ptDNA (Figura 1). Durante la evolución, cerca de 3000 genes involucrados en la fotosíntesis de endosimbiontes se perdieron del plástido (Rujan y Martin, 2001; Leister, 2003), encontrándose actualmente en el genoma nuclear (Martin *et al.*, 2002; Kuroda y Maliga, 2003); los genes retenidos por el plástido, fueron organizados principalmente como operones, de los cuales más de 60 han sido descritos en el plastoma de tabaco (Sugita y Sugiura, 1996).

### 2.1.3. Código Genético en Cloroplastos

Los cloroplastos han retenido el código genético universal constituido en 64 codones incluyendo los tres codones de paro (Figura 2) (Sasaki *et al.*, 2003; Sugiura, 2008). Utilizan 31 anticodones en la traducción del código; un número menor que los que se utilizan en bacterias debido a que los cloroplastos han eliminado 10 anticodones CNN (N=cualquier nucleótido) que se encuentran en bacterias; los cloroplastos han mostrado capacidad de almacenar gran información genómica en



un espacio pequeño, se ha propuesto que los cambios evolutivos en el código universal deben haber tenido lugar después de que un codón desapareció de las secuencias de codificación, ya que un cambio brusco en la asignación de un codón sería perjudicial y, por tanto, letal. La desaparición de un codón debió acompañarse de un cambio o pérdida del anticodón correspondiente, tales cambios en el anticodón a veces pueden resultar de la presión de mutación direccional hacia cualquiera relación ya sea AT o GC (Jukes y Osawa, 1990; Ohama *et al.*, 2008; Koonin y Novozhilov, 2009).

UUU [E] Glu	UCU [S] Ser	UAU [Y] Tyr	UGU [F] Phe
UUC [E] Glu	UCC [S] Ser	UAC [Y] Tyr	UGC [F] Phe
UUA [D] Asp	UCA [H] His	<b>UAA [ ] Ter</b>	<b>UGA [ ] Ter</b>
CUU [D] Asp	UCG [H] His	<b>UAG [ ] Ter</b>	UGG [F] Phe
CUU [N] Asn	CCU [G] Gly	CAU [V] Val	CGU [C] Cys
CUC [N] Asn	CCC [G] Gly	CAC [V] Val	CGC [C] Cys
CUA [K] Lys	CCA [G] Gly	CAA [V] Val	CGA [L] Leu
CUG [K] Lys	CCG [G] Gly	CAG [V] Val	CGG [L] Leu
AUU [Q] Gln	ACU [A] Ala	AAU [T] Thr	AGU [L] Leu
AUC [Q] Gln	ACC [A] Ala	AAC [T] Thr	AGC [L] Leu
AUA [R] Arg	ACA [A] Ala	AAA [T] Thr	AGA [L] Leu
AUG [R] Arg	ACG [A] Ala	AAG [T] Thr	AGG [L] Leu
AUU [R] Arg	GCU [S] Ser	GAU [P] Pro	GGU [I] Ile
AUC [R] Arg	GCC [S] Ser	GAC [P] Pro	GGC [I] Ile
AUA [R] Arg	GCA [S] Ser	GAA [P] Pro	GGA [I] Ile
AUG [R] Arg	GCG [S] Ser	GAG [P] Pro	<b>GGG [M] Met</b>

**Figura 2.** Código genético universal, optimizado en cloroplastos: 64 codones (tres codones de paro) de acuerdo a Koonin y Novozhilov (2009).

#### 2.1.4. Integración de Transgenes en Plástido

Debido a que los cloroplastos poseen su propio genoma, es posible transferir genes dentro de ellos a través de ingeniería genética, la cual ha generado avances importantes en biotecnología vegetal en las áreas de agricultura, alimentos, medicina, medio ambiente, entre otros (Maliga y Bock, 2011).

La transformación genética de cloroplasto se implementó inicialmente en una alga unicelular (*Chlamydomonas reinhardtii*) por el equipo de Boynton *et al.* (1988); posteriormente, en 1990, se logró la transformación genética de cloroplastos de plantas de tabaco (Svab *et al.*, 1990a). Desde entonces, se han integrado eficazmente más de 100 transgenes directamente en el plastoma de varias especies incluyendo genes que codifican para enzimas con valor industrial, biomateriales, biofarmacéutica, proteínas, anticuerpos, antibióticos, vacunas, antígenos y genes de importancia agronómica (Bock, 2007; Verma *et al.*, 2010). Además, se han podido detectar altos niveles de expresión de proteínas recombinantes (70% de proteína total soluble) lo que reafirma el potencial de esta tecnología (Oey *et al.*, 2009b; Ruhlman *et al.*, 2010). Actualmente, la tecnología transplastómica se ha extendido a especies de plantas de importancia económica (Lutz *et al.*, 2004; Verma y Daniell, 2007) como papas '*Solanum tuberosum*' (Sidorov *et al.*, 1999), jitomate '*Solanum lycopersicum*' (Ruf *et al.*, 2001), lechuga '*Lactuca sativa*' (Lelivelt *et al.*, 2005; Kanamoto *et al.*, 2006), coliflor '*Brassica oleracea*' (Nugent *et al.*, 2006), álamo '*Populus alba*' (Okumura *et al.*, 2006); asimismo, se han reportado transformaciones en zanahoria '*Daucus carota*', algodón '*Gossypium hirsutum*', soya '*Glycine max*' y

arroz '*Oriza sativa*' (Dufourmantel *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004b; Daniell *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006b). La incorporación de ADN foráneo está enfocada a la recombinación homóloga entre la región blanco del vector y el genoma plastídico (ptDNA) principalmente por tratamiento de polietilenglicol (Golds *et al.*, 1993) y biobalística al ser el cloroplasto protegido por una doble membrana lo cual dificulta la integración de ADN por otros métodos (Boynton *et al.*, 1988); sin embargo, con el bombardeo de micropartículas, las células exhiben daño físico irreversible cuando se utilizan partículas de oro de 0.6  $\mu\text{m}$  (Lee *et al.*, 2006b), no obstante se ha reportado el uso de micropartículas de 0.4  $\mu\text{m}$  en tabaco aumentando de tres a cuatro veces la eficiencia (Langbecker *et al.*, 2004); aunado a esto, el éxito de la transformación de plástidos depende de la amplificación de las copias del genoma transformado por selección de espectinomicina, estreptomycin (Svab *et al.*, 1990b; Svab y Maliga, 1993).

Lutz *et al.* (2004) reportaron una alternativa independiente de la maquinaria de recombinación homóloga en plástidos basado en la integrasa *phiC31* de *Streptomyces* catalizando la recombinación entre los sitios *attP* y *attB* (Thorpe y Smith, 1998; Thorpe *et al.*, 2000).

### **2.1.5. Regulación de la Expresión Genética**

Aunque los plástidos tienen un genoma relativamente pequeño con ~100 genes que codifican para proteínas, la regulación de la expresión de genes de cloroplasto es demasiado compleja. La expresión de genes está regulada transcripcional, traduccional y post transcripcionalmente. La maquinaria de transcripción de los

plástidos comprende tres ARN polimerasas (Hedtke *et al.*, 2002; Liere y Börner, 2007), algo opuesto a un solo ARN polimerasa que transcribe el genoma entero de *Escherichia coli*; los transcritos primarios se someten a una serie de complejas modificaciones para su maduración incluyendo recortes terminales, cortes intercistronicos de precursores policistronicos, splicing de intrones y edición de ARN (Hayes *et al.*, 1996; Bock, 2000; Barnes *et al.*, 2005; Barkan, 2011).

La traducción de plástidos ocurre en un ribosoma 70S tipo bacterial que contiene componentes plástido-especificos (Tiller *et al.*, 2012) y se cree que estos ribosomas son reclutados por factores de traducción mARN-especificos (Barneche *et al.*, 2006; Boulouis *et al.*, 2011; Prikryl *et al.*, 2011). El complejo interviene en la regulación de la transcripción, traducción y post traducción determinando los niveles de acumulación de las proteínas codificadas por los plástidos. La expresión de los genes plastídicos relacionados a procesos fotosintéticos en particular son altamente regulados para generar cambios dramáticos en su expresión en respuesta al desarrollo y a los estímulos del ambiente, principalmente a la luz (Klein y Mullet, 1990; Staub y Maliga, 1993). Algunos estudios han mostrado que la regulación de la expresión genética en el cloroplasto depende en mayor medida de la estabilidad del ARN más que la regulación de la transcripción (Deng y Grussem, 1987); sin embargo, empleando transformaciones estables en el genoma del cloroplasto, se han demostrado que dos niveles regulatorios son particularmente importantes y que a menudo limitan la acumulación de proteínas en los cloroplastos: la traducción (Staub y Maliga, 1994; Eibl *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001) y la estabilidad de la proteína (Birch - Machin *et al.*, 2004; Apel *et al.*, 2010; Elghabi *et al.*, 2011a); no obstante,

especies diferentes pueden experimentar diversos mecanismos de procesamiento para el mismo grupo de genes, así, *Arabidopsis* (Meierhoff *et al.*, 2003), tabaco (Monde *et al.*, 2000), y espinaca (Westhoff y Herrmann, 1988) muestran mecanismo distinto al maíz para la traducción de *petD*, el cual depende principalmente del establecimiento de genes di y tricistrónicos (Quesada-Vargas *et al.*, 2005).

Aunque la expresión de genes en el cloroplasto se ha investigado ampliamente, la expresión en otros compartimientos plástidicos (cromoplastos, amiloplastos) aún no ha sido bien estudiada. Se ha reportado que en frutos de tomate (cromoplastos) (Kahlau y Bock, 2008) y de papa (amiloplastos) (Valkov *et al.*, 2009) la regulación de la gran mayoría de genes cloroplastídicos ocurre negativamente; dicha regulación parece ocurrir a nivel transcripcional y traduccional. En este sentido, recientemente se ha encontrado que al menos dos genes no sufren regulación negativa, ya que se expresan normalmente en ausencia de luz: el gen *accD* involucrado en el metabolismo de lípidos y que codifica una subunidad de la acetil *CoA* carboxilasa y el gen *clpP* que codifica un componente de la maquinaria proteolítica (la subunidad catalítica del complejo de proteasa *Clp*), lo cual tiene sentido debido a que la provisión de lípidos y la degradación de proteínas (incluyendo el apagado de proteínas codificadas en núcleo homologas en cloroplasto) representan funciones esenciales en plástidos no verdes (Kahlau y Bock, 2008; Valkov *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012a).

Debido a que la región promotora determina los niveles de transcripción y la región 3'UTR regula la traducción por medio de la estabilidad que le confiere al mRNA, entender los procesos de regulación de la expresión en cloroplasto

representa información importante debido a que maximizaría la expresión de genes foráneos en tejidos no foliares tales como frutas y tubérculos, así como también facilitaría el desarrollo de nuevos protocolos de transformación de plástidos de todas las especies que actualmente están basadas en transformaciones foliares, esto incluye todos los cereales, los cuales comprenden los alimentos más importantes del mundo y para los cuales aún no se han reportado métodos exitosos de transformación genética en los compartimientos del cloroplastos (Maliga, 2004; Bock, 2007).

## **2.2. Transformación Genética de Cloroplastos**

### **2.2.1. Vectores de Transformación**

Los vectores de transformación son plásmidos derivados de *E. coli* los cuales llevan una secuencia de ADN de 1-2 kb para la integración directa de sitios específicos del genoma plastídico por recombinación homóloga (Lutz *et al.*, 2004). Daniell *et al.* (1998) sugirieron un 'vector universal' (pSBL-CTV2) que contenía los genes *trnA* y *trnI* de la región IR del plastoma de tabaco como sitio de recombinación, basado en el hecho de que esta región intergénica presenta una alta conservación en los genomas de los cloroplastos. Esto ha sido comprobado eficientemente en transformación de papa y tomate presentando mayor eficiencia en tabaco (Sidorov *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2001). Estudios recientes mostraron que aún especies de una misma familia presentan pocas regiones intergénicas similares (Solanácea: cuatro regiones intergénicas idénticas) (Daniell *et al.*, 2006); sin embargo, las diferencias entre cloroplastos no pueden deberse a mutaciones actuales, pues el ritmo de

sustitución de nucleótidos del genoma del cloroplasto es muy lento (Yukawa *et al.*, 2006). En busca de mejores vectores, múltiples laboratorios han insertado transgenes en regiones como *tscA*, *psbA/5S/23S*, *trnV/rps12/7*, *rbcL/accD* (McBride *et al.*, 1995; Daniell *et al.*, 1998; lamtham y Day, 2000; Mayfield *et al.*, 2003; Campos-Quevedo *et al.*, 2013), así como en la expresión de operones en las regiones *trnI/trnA* en la región IR del ptDNA, buscando estrategias en las cuales los operones sean transcritos de los promotores río arriba y de este modo el operón sea eficientemente procesado. (Vera y Sugiura, 1995; Suzuki *et al.*, 2003).

El primer vector utilizado en inserciones en la región intergénica *trnI-trnA* de la región de repetidos invertidos, fue el pSBL-CTV2 que está bajo el control del promotor del gen *rrn* y el terminador del gen *psbA* desarrollado por los laboratorios Daniell (Daniell *et al.*, 1998) el cual ha sido utilizado para expresar múltiples proteínas (Daniell *et al.*, 2005b). Por otro lado, se ha determinado que el genoma del tabaco contiene 30 diferentes tRNA (Sugiura *et al.*, 1989), siete de los cuales se encuentran en la región de repetidos invertidos (IR), indicando que estos genes son duplicados y los otros 23 genes son de copia simple, sugiriendo que la constitución de cada tRNA en cloroplasto de tabaco no son distintos unos de otros (Nakamura y Sugiura, 2009). Actualmente han diseñado una gran variedad de vectores cloroplastídicos, los cuales presentan casetes con diferentes elementos regulatorios que permiten la expresión de proteínas en cloroplastos y están disponibles para obtener una amplia gama de niveles de expresión que puede ser desde 0.1% hasta el 70% de proteínas recombinantes (Oey *et al.*, 2009a; Maliga y Bock, 2011). También, los promotores utilizados juegan un papel importante en los niveles de

expresión y fenotipos de las plantas, se han reportado vectores que expresan el gen *bar* el cual es visualmente detectable (*bar<sup>au</sup>*) en las plantas transplastómicas porque su expresión está bajo un doble promotor del gen *clpP* y las hojas de las plantas que expresan este gen presentan un fenotipo amarillo debido a la competencia que se presenta entre mRNA del gen *bar<sup>au</sup>* con mRNA del gen *clpP* (Kuroda y Maliga, 2002; Tungsuchat-Huang *et al.*, 2010).

### 2.2.2. Secuencias de Recombinación Homóloga

La recombinación homóloga es un proceso fundamental conservado en todas las especies y es esencial en el mantenimiento de la estabilidad genómica, facilita la diversidad genética y está involucrado en la reparación del ADN, replicación, mantenimiento así como su segregación (Dauvillee *et al.*, 2004; Lieberman-Lazarovich y Levy, 2011; Barascu *et al.*, 2013). La recombinación en el genoma del cloroplasto está bien documentada, pero los mecanismos moleculares por el cual ocurre no están bien definidos aunque desde que Cerutti *et al.* (1995) propusieron la existencia de un sistema *recA* que mediaba la recombinación en *E. coli* se ha propuesto que esta tiene alta homología con su contraparte eubacteriana. El papel principal de la recombinación es reparar ADN debido a fotooxidación y otros estreses ambientales; sin embargo, el mecanismo de recombinación está limitado por la disponibilidad de las enzimas. Aprovechando la capacidad de recombinación que le confiere la maquinaria cloroplastídica, la tecnología transgénica utilizada en los plástidos se basa en el principio de recombinación homóloga para el reemplazamiento de secuencias de genoma silvestre tanto para el estudio de genes



como para la inserción de nuevos genes de interés (Staub y Maliga, 1992); este tipo de transformación genética, requiere el uso de vectores de transformación previamente diseñados y que normalmente derivados de pUC119 que se replica en *E. coli* pero no en el plástido (Zoubenko *et al.*, 1994).

### 2.2.3. Promotores

Para obtener altos niveles de expresión proteínica en el plástido, primeramente se deben incrementar los niveles de mRNA estable y eficientar el proceso de transcripción, lo cual se consigue con un promotor de alta eficiencia (Maliga, 2002).

Para que se realice la expresión proteínica, los plastomas de algas y plantas superiores cuentan con una RNA polimerasa tipo cianobacteria comúnmente abreviada 'PEP' (Plastid-encoded RNA polymerase), constituido por núcleos enzimáticos codificados por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2* (Lysenko y Kuznetsov, 2005). El PEP reconoce promotores de tipo  $\sigma^{70}$ , cuenta con regiones conservadas -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) y es el responsable de iniciar la transcripción 5 a 7 nucleótidos río abajo del elemento -10 del promotor (Igloi y Kössel, 1992; Gruissem y Tonkyn, 1993; Link, 1996); asimismo, el PEP está asociado a ocho proteínas auxiliares que regulan la transcripción, tal como la quinasa de transcripción plastídica (PTK) reguladora a través de un factor de fosforilación.

Las maquinarias enzimáticas eubacterianas han adquirido una segunda RNA polimerasa tipo fago (NEP, nuclear-encoded plastid RNA polymerase) probablemente creada por duplicación de la maquinaria transcripcional de mitocondria por mostrar homología en su secuencia; sin embargo, un gen nuclear codifica el núcleo catalítico de NEP (Allison *et al.*, 1996) el cual reconoce tres distintos promotores: NEP tipo I con reconocimiento de la región ~15 nucleótidos río arriba (-14 a +1) del sitio de inicio (+1), un subtipo promotor NEP Ib con un motif conservado a 18-20 nucleótidos río arriba del motivo YTRa designado como 'box II' o 'caja GAA' (Xie y Allison, 2002; Liere y Börner, 2011) y los promotores NEP tipo II que reconocen regiones río abajo del codón de inicio (-5 a +25) (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Muchos genes y operones fotosintéticos tienen promotores tipo PEP, los genes no fotosintéticos son transcritos tanto por PEP como por NEP, mientras que solo unos pocos genes son transcritos exclusivamente por promotores tipo NEP (Hajdukiewicz *et al.*, 1997).

Los promotores reconocidos por PEP/NEP varían en cuanto a intensidad según los niveles de expresión que presentan y cuya eficiencia puede estar relacionada con las secuencias río arriba del codón de inicio (Xie y Allison, 2002). Recientemente se ha demostrado bajo expresiones de *gfp* que el promotor *rrn* es 90 veces más potente que el promotor de *psbA* o de *trc* indicando también que la transcripción es más eficiente en el *Prrn* (Newell *et al.*, 2003); asimismo, se han reportado otros promotores como *PclpP-53* con alta eficacia relacionados directamente con NEP no dependientes de los núcleos enzimáticos de PEP (Sriraman *et al.*, 1998); muchos estudios se basan en el análisis de la capacidad del promotor del operón RNA (*Prrn*) el cual puede fusionarse con secuencias de control para eficientar la traducción de

proteínas recombinantes (Liere y Maliga, 2004). En este sentido, los niveles de expresión de una proteína varían de acuerdo al tipo de promotor utilizado y estos promotores no son exclusivos para un determinado gen; es decir, tanto los genes nativos como los sintéticos pueden suplementarse con diferentes promotores para maximizar su expresión (Madoka *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Secuencias no Traducidas (5'/3' UTR)**

La expresión de transgenes incorporados en el genoma del plástido, requiere secuencias que puedan reconocerse por la maquinaria de transcripción y traducción del mismo plástido; sin embargo, los roles y mecanismos de los elementos reguladores y las secuencias flanqueadoras aún no están bien definidos (Ruhlman *et al.*, 2010).

La expresión de proteínas en plástidos depende de la estabilización del mRNA; asimismo, la eficiencia en la traducción y acumulación de proteínas expresadas por transgenes quiméricos son determinados por las regiones 5'/3'UTR y la interacción de mRNA-rRNA (Baneyx, 1999; Yang *et al.*, 2013). Se ha identificado que con la pérdida de los elementos reguladores 5'/3'UTR se presenta una rápida degradación o poca acumulación de los transcritos (Quesada-Vargas *et al.*, 2005). El inicio de la activación traduccional aún no es conocido, pero se cree que la proteína ribosomal S1 media el mecanismo de afinidad del 5'UTR (Alexander *et al.*, 1998).

Los elementos 5'y 3' UTR son reconocidos por proteínas que también ayudan a proteger el mRNA de las exonucleasas 5'3' y posiblemente endonucleasas

procesivas 5'3' (Hicks *et al.*, 2002); las células eucariotas utilizan este mecanismo en el citoplasma para remover mRNA defectuosos que podrían generar proteínas truncadas, lo que demuestra también como las regiones no traducidas influyen en la estabilidad y degradación de los mRNA de cloroplasto (Drapier *et al.*, 2002; Bollenbach *et al.*, 2004).

La región 5'UTR es una región rica en A+T y contiene elementos *cis* que determinan la estabilidad del mRNA por interacción con la subunidad  $\alpha$  del RNA polimerasa (Hirose *et al.*, 1998; Kramzar *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las mutaciones en las regiones 5'UTR disminuyen drásticamente la expresión de proteínas (Kuroda y Maliga, 2001). Por otra parte, la región 3'UTR es una región estabilizadora del mRNA pudiendo ser similares o diferentes a las secuencias Shine-Dalgarno; sin embargo, las regiones río abajo del ATG son altamente dependientes de mRNA individuales; de este modo, estas secuencias son críticas para el inicio de la traducción. Las regiones 3'UTR de mRNA plastídicos son secuencias invertidas repetidas que pueden plegarse en una estructura de tallo y asa similares a las estructuras involucradas en la terminación de la transcripción en procariontes (Rott *et al.*, 1996). Se ha sugerido que la región 3'UTR es de menor importancia para la estabilidad del mRNA (Barnes *et al.*, 2005); sin embargo, los niveles de mRNA son mayoritariamente determinado por la región 3'UTR que por la región 5'UTR (Zicker *et al.*, 2007). Recientemente se ha reportado el gen *clpP* como fuente con potencial para la obtención de secuencias reguladoras debido a los resultados mostrados en papa (Valkov *et al.*, 2011).

### 2.2.5. Secuencias Shine-Dalgarno

La expresión de genes plásticos está controlada mayoritariamente en los niveles post transcripcionales, especialmente en el nivel de traducción (Eberhard *et al.*, 2002; Schmitz-Linneweber y Small, 2008); esta regulación ocurre en respuesta a factores bióticos y abióticos, y requiere coordinación con la expresión del genoma nuclear (Marin-Navarro *et al.*, 2007).

Los mRNA procarióticos generalmente cuentan con regiones 5' no traducidas (5'UTR) y secuencias Shine-Dalgarno (SD) que sirven como sitio de unión a ribosoma (Hirose y Sugiura, 2004). La regulación traduccional se ejerce por regiones no traducidas río arriba del codón de inicio que en ocasiones son específicas para cada mRNA (Kim y Mayfield, 2002; Marin-Navarro *et al.*, 2007). La localización de la secuencia SD río arriba del codón de inicio es de 4-9 nucleótidos de forma óptima (Baneyx, 1999); sin embargo, no todas las secuencias 5'UTR contienen la secuencia SD a esa distancia (Ruf y Kössel, 1988); en esos casos, proteínas específicas se unen a la región 5'UTR y redirigen la subunidad 30S hacia el codón de inicio o bien hacia el siguiente AUG río abajo (Stern *et al.*, 1997; Hirose y Sugiura, 2004)

Los plásticos y *E. coli* tienen idénticas secuencias anti-SD en el final 3' del 16S rRNA (5'-TGGATCA**CCTCC**TT-3': secuencia motif anti-SD en negrita), debido a esto, las secuencias SD 'GGAGG' de plásticos pueden ser reconocidas en *E. coli* y viceversa (Drechsel y Bock, 2011); se ha demostrado que secuencias SD bacterianas pueden usarse para maximizar la expresión de genes en plásticos (Ye *et*

*al.*, 2001); no obstante, aún no se conoce como las secuencias SD son reconocidas y como su utilización determina la eficiencia traduccional (Drechsel y Bock, 2011); en este sentido, los cistrones pueden procesarse eficientemente en los dos sistemas, pero la eficiencia de traducción es mayor en plástidos, quizá, debido a la presencia de proteínas ribosomales plastídicas 'PSRPs' que aún no están claramente definidas pero que explicarían por qué esas proteínas fueron adquiridas en la evolución (Drechsel y Bock, 2011).

Es posible utilizar múltiples secuencias SD río arriba del codón de inicio para maximizar la traducción; sin embargo, secuencias SD adyacentes muy juntas no pueden ser reconocidas por múltiples ribosomas al mismo tiempo (Borisova *et al.*, 1979). El acomodo de cuatro secuencias SD con suficiente espaciamiento (39-nt) para la unión de subunidades ribosomales 30S puede aumentar la expresión hasta 71 veces debido a que se atraen más ribosomas; no obstante, si existe un codón de inicio, un codón de paro o un mini ORF entre dos SD la traducción es deficiente (Drechsel y Bock, 2011). No está bien definida la correlación entre el 5'UTR, número de SD y el número de codones de inicio en la estabilidad del mRNA pero genes con expresión policistrónica pueden contener secuencias canónicas SD río arriba de cada cistrón indicando que la iniciación de la traducción interna puede ocurrir (Meng *et al.*, 1988). En algunos casos los policistrones no tienen cortes intercistrónicos y son eficientemente traducidos; no se ha establecido como las secuencias SD del mRNA río abajo son reconocidas, pero se especula que proteínas reguladoras de traducción están involucradas en el proceso (Drechsel y Bock, 2011).

### 2.3. Métodos de Transformación

La transformación de plástidos ha sido ampliamente utilizada tanto en investigación básica y como para aplicaciones biotecnológicas. Esta tecnología requiere la transferencia de genes en el genoma del cloroplasto; actualmente, las estrategias más comunes para la inserción de transgenes en el cloroplasto con alta eficiencia son biobalística y polietilenglicol (PEG); la biobalística se ha probado con partículas de oro y tungsteno (Daniell, 1993). La biobalística no tiene restricciones en cuanto a la especie celular o el tamaño del ADN foráneo, secuencia o conformación (Altpeter *et al.*, 2005). Reportes recientes sugieren que utilizar partículas de 0.4  $\mu\text{m}$  aumentan cuatro veces la eficiencia que utilizando partículas de 0.6  $\mu\text{m}$ , además de exhibir menor daño celular (Langbecker *et al.*, 2004); asimismo, se ha demostrado que las partículas cargadas pueden provocar eventos de transformación en genomas aislados como plástidos y núcleo al mismo tiempo (Elghabi *et al.*, 2011b); en este sentido, recientemente se ha comprobado que puede utilizarse eficientemente en tejidos animales (Xia *et al.*, 2011). Por otro lado, el método por PEG es un método eficiente que disminuye los costos de transformación, elimina la dependencia de los disparos de partículas (Golds *et al.*, 1993) y disminuye el riesgo de muerte celular por explosión y dependiendo de la especie, puede ser más eficiente que el bombardeo de partículas (O'Neill *et al.*, 1993); no obstante, ambos métodos son eficaces, y su utilización depende del cultivo.

### 2.3.1. Marcadores de Selección

Los experimentos diseñados para establecer una transformación estable de cloroplastos, requiere de genes marcadores de selección que puedan expresarse por el genoma del cloroplasto (Cseplö *et al.*, 1988); actualmente existen varios genes marcadores utilizados en el desarrollo de transgénicos, cada uno ajustable a las necesidades del sistema de transformación. La primer resistencia reportada fue la utilización de un gen de rRNA 16S mutante que confería resistencia a espectinomicina (Svab *et al.*, 1990a); sin embargo, la integración estable de un gen se reportó por Goldschmidt-Clermont (1991) con la integración y expresión del gen *aadA* en *Chlamydomonas*, que codifica para la enzima *aminoglucósido 3''-adenililtransferasa* que detoxifica la espectinomicina y estreptomycinina por adenilación (Verma y Daniell, 2007) obteniendo en tabaco resistencias 100 veces superiores a los mostrados por la mutante rRNA 16S (Svab y Maliga, 1993).

El gen *neo* se mencionó como alternativa de selección confiriendo resistencia a kanamicina (Carrer *et al.*, 1993); sin embargo, Huang *et al.* (2002) menciona la misma resistencia con el gen *aphA6* con mayor eficiencia de transformación; una estrategia de selección fue utilizar un 'double barrel' en transformación de algodón (Kumar *et al.*, 2004b) con los genes *aphA6* y *nptII*, el primero regulado por el promotor 16S rRNA capaz de expresarse sin luz y el segundo regulado por el promotor *psbA* para expresarse en luz, así facilitaba la detoxificación de kanamicina durante el día y la noche aportando resultados ocho veces superiores al uso del gen *aphA6* solo (Verma y Daniell, 2007).



Considerando que el 20% de las tierras irrigadas del mundo están afectadas por salinidad (Zhu, 2001) y que algunas plantas pueden resistirla debido al gen *badh* (betaine aldehyde dehydrogenase) (Rathinasabapathi *et al.*, 1997; Nuccio *et al.*, 1998) que confiere resistencia a sequía y salinidad, el proceso involucra la conversión del compuesto tóxico betaína-aldehído al componente útil gly-betaina por el gen *badh* obteniendo resultados en tabaco 25 veces más eficiente que la espectinomicina, igualmente, se ha reportado su integración estable en zanahoria por Kumar y Daniell (2004), esta herramienta se muestra como alternativa de selección contra las desventajas de los genes de resistencia a antibióticos (Daniell *et al.*, 2001b). Por otro lado, el gen bacteriano *bar* que confiere resistencia a fosfotricina por expresar el gen fosfotricina acetil transferasa (PAT) se ha analizado para su uso como marcador de selección; no obstante, este gen solo confiere resistencia cuando se introduce por selección del gen *aadA*; sin embargo, este gen no es utilizado como selector directo de líneas transplastómicas aun cuando expresan niveles altos de proteína total soluble (7%) (Lutz *et al.*, 2001; Verma y Daniell, 2007). Asimismo, se ha utilizado el gen *codA* (Serino y Maliga, 1997) como marcador negativo que cataliza la desaminación de citosina a uracilo, el 5-fluorocitocina es tóxico para la célula que expresa citosina-desaminasa porque esta enzima convierte 5-fluorocitocina en 5-fluorouracil que es letal para la célula. Esto puede analizarse al exponerse plántulas a medio 5-fluorocitocina con la eliminación del gen *codA* con P1-Cre-lox (Corneille *et al.*, 2001).

En años recientes Li *et al.* (2010) mostraron que el gen *cat* puede utilizarse como alternativa de selección al proveer resistencia al cloranfenicol; aunque muestra poca

eficiencia comparado con los actuales marcadores basados en la incorporación de gen *aadA* (Svab y Maliga, 1993); sin embargo, ofrece la ventaja de no producir mutantes resistentes espontaneas; asimismo, se han reportado cuatro mutaciones puntuales en el 23S rRNA de *Nicotiana plumbaginifolia* que le confieren resistencia a lincomicina pudiendo utilizarse como gen marcador de selección (Cseplö *et al.*, 1988).

Los marcadores de selección se eligen de acuerdo a aspectos como autonomía celular y portabilidad, algunos marcadores son dominantes como el gen *aadA* y otros son recesivos como las mutaciones puntuales en los genes del RNA ribosómico (*rrnS* y *rrnL*). Los marcadores dominantes son de particular importancia en transformaciones de plastomas poliploides porque incrementan la frecuencia de transformación; debido a que tienen un efecto desde las primeras etapas de selección a pesar de estar integrados en pocos plastomas, los marcadores recesivos tienen menor eficiencia en la transformación y solo son eficientes si en la segregación aleatoria, el plástido cuenta con suficientes copias de plastoma transformado (Kindle *et al.*, 1991; Newman *et al.*, 1991; Carrer y Maliga, 1995). Por otro lado, los genes marcadores y los genes de interés pueden ser incorporados al genoma bajo un solo promotor pues los RNAs policistrónicos son eficientemente traducidos en plástidos (Staub y Maliga, 1995); asimismo, es posible generar una fusión traduccional entre un gen de resistencia y un gen reportero como proteína verde fluorescente (GFP) para evitar el enmascaramiento fenotípico de las células transformadas (Khan y Maliga, 1999) eficientando el proceso de selección del tejido transformado.

## **2.3.2. Selección y regeneración**

### **2.3.2.1. Estado heteroplásmico y estado homoplásmico**

El ADN introducido en el cloroplasto de un sistema heterólogo puede integrarse por medio de recombinación homóloga (Boynton *et al.*, 1988) dentro de uno o más moléculas de ADN cloroplastídico. La integración de ADN reemplaza por recombinación homóloga, segmentos de ADN del genoma original. Los genes o fragmentos de ADN que no muestran homología en las moléculas de ADN del huésped pueden insertarse dentro del genoma del huésped como parte de una secuencia construida con vectores que contienen regiones adicionales con homología del huésped (Erickson, 1996; Daniell, 2006a). Las células transformadas inicialmente son consideradas heteroplásmicas porque en la población de ADN cloroplastídico no todas son homogéneas (Daniell, 1993).

Durante el crecimiento vegetativo, tal como ocurre en la formación de una colonia de células sobre un medio sólido, las células hijas pueden recibir una mezcla de ADN de ambos tipos de genoma cloroplastídico (Maliga, 2001). La segregación rápida de los genomas cloroplastídicos durante el crecimiento de las plantas ha sido ampliamente documentada (Birky *et al.*, 1983). Los factores que median tal segregación pueden incluir la organización de ADN de cloroplastos en los nucleóides, los cuales son adheridos a los cloroplastos y pueden segregarse como una unidad; también, la recombinación o la conversión de genes dentro y entre los nucleóides, así como la replicación relajada permite que ambas moléculas de ADN,

madre e hija, puedan utilizarse como templado durante la replicación de ptDNA; eventualmente, las células hijas contendrán solo un tipo de moléculas de ptDNA: el genoma original de la célula huésped, o con introducción del ptDNA recombinante, cuando todas las células llegan a tener solo un tipo de genoma se les considera homoplásmicas (Erickson, 1996). Si todas las células son viables, las colonias transformantes pueden contener células homoplásmicas y células heteroplásmicas (Maliga, 2003). Trasferir una colonia de células dentro de un medio líquido y subsecuentemente realizar rondas de selección, usualmente resulta en estados homoplásmicos (McCabe *et al.*, 2008; Maliga, 2012). La heteroplásmia es usualmente una condición inestable, aunque condiciones estables se han reportado cuando la presión selectiva requiere la presencia de los dos genomas en el cloroplasto (Goldschmidt-Clermont, 1991; Yu y Spreitzer, 1992; Liu *et al.*, 1993).

Las líneas de células transformantes de interés para el estudio, deben a menudo ser homoplásmicos y estables. La homoplásmia puede verificarse por análisis moleculares comparado con células no transformadas (Erickson, 1996), tal verificación es importante cuando las líneas transformantes muestran bajos niveles de actividad comparado con plantas de tipo silvestre; estados heteroplásmicos podrían producir bajos niveles de actividad de los transgenes debido a que no todos los genomas están transformados (Tungsuchat-Huang *et al.*, 2010). El uso de análisis por PCR han permitido amplificar las regiones de ADN presentes en la célula con extremadamente bajos niveles en una mezcla heterogénea de ptADNs (Daniell *et al.*, 2005a; Daniell, 2007; Liu *et al.*, 2007).

## 2.4. Aplicaciones Actuales de la Biotecnología Plastídica

### 2.4.1. Aplicaciones Básicas

Actividades que ocurren en los cloroplastos son a menudo el secuestro de carbón, producción de almidón, evolución oxigénica, síntesis de aminoácidos, ácido graso y pigmentos y la puerta del metabolismo de azufre y nitrógeno (Sugiura, 1992; Ruf *et al.*, 2001; Verma y Daniell, 2007; Wang *et al.*, 2009; Wani *et al.*, 2010).

La ingeniería genética ha tenido su desarrollo como ciencia básica para estudiar la funcionalidad de los genes plastídicos así como mecanismos regulatorios de transcripción, traducción y edición del ptDNA y para estudios de fotosíntesis y evolución (Daniell, 1993; Burrows *et al.*, 1998; Daniell, 1999; Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000; Maliga, 2002); en este sentido, la transformación plastídica juega un rol importante en el entendimiento de los procesos de edición de RNA (Bock, 2001). En plástidos de plantas superiores, mucha información que involucra factores proteínicos ha sido descubierta de forma indirecta; la existencia de especies específicas, la especificidad del organelo y los factores sitio específicos han sido inferidos de experimentos; por ejemplo, la evidencia de un transfactor de edición sitio específico se obtuvo cuando una secuencia del *psbE* se incorporó en plástidos de tabaco donde esta no fue editada previamente (Bock y Koop, 1997); sin embargo, se propuso que cada especie tiene la capacidad para editar sitios (Wang *et al.*, 2009). Dada la importancia del estudio de factores inherentes a la edición de ARN y ADN, nuevos estudios serán enfocados en el entendimiento del rol de las proteínas en plástidos debido a que la edición de las secuencias podría ser un mecanismo

regulatorio en la producción de múltiples proteínas del mismo gen (Hoch *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2009). La ingeniería genética de cloroplastos podría ayudar al entendimiento de cómo ocurrieron los procesos evolutivos que se llevaron a cabo en la maquinaria celular; asimismo, podría ayudar a entender como mecanismos implicados en fotosíntesis están íntimamente ligados a la transcripción de ADN y a su traducción hasta proteínas posiblemente mediadas por proteínas asociadas a nucleótidos, el entendimiento de los procesos que ocurren a nivel transcripcional podrían proporcionar información sobre los procesos que ocurren en otros genomas o porque los procesos de metilación para el silenciamiento de genes no ocurre en el cloroplasto aun cuando las expresiones proteínicas son muy altas.

#### **2.4.2. Investigaciones Aplicadas**

La transformación genética de cloroplasto se ha enfocado en la obtención de organismos con capacidad de generar proteínas de interés; actualmente se han reportado más de 100 transgenes integrados establemente en el plastoma (Verma y Daniell, 2007) incluyendo genes que codifican para enzimas con valor industrial, biomateriales, biofarmacéuticos, anticuerpos, antibióticos, vacunas, antígenos y genes de importancia agronómica (Bock, 2007; Verma *et al.*, 2010; Del *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2013) con niveles de expresión de hasta 70% de proteínas solubles en la hoja (Oey *et al.*, 2009a; Maliga y Bock, 2011).

#### 2.4.2.1. Acumulación de proteínas recombinantes

Los cloroplastos presentan una habilidad para eficientar la transcripción y traducción de los operones (De Cosa *et al.*, 2001; Lossl *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003) así como conferir una sobre expresión de proteínas (Dhingra *et al.*, 2004); asimismo, son capaces de acumular proteínas foráneas que son tóxicas en el citoplasma, como la subunidad  $\beta$  de la toxina del Cólera (Daniell *et al.*, 2001a), trealosa (Lee *et al.*, 2006b) así como xilanasa sin efectos secundarios debido a la compartimentalización de los productos de los transgenes (Bogorad, 2000; Maliga, 2004); sin embargo, la síntesis de otras proteínas no se detectan aun cuando puedan acumularse los productos de sus transcripciones, sugiriendo que el sistema de traducción de los cloroplastos es distinto a los de las bacterias y citoplasmas eucarióticos (Drechsel y Bock, 2011). Los niveles de expresión proteínica de los transgenes plastídicos dependen de la abundancia de mRNA determinada por la potencia del promotor y de la cantidad de tRNA, mientras que la estabilidad del mRNA depende de la estructura secundaria de tallo-asa en la región 5'-3'UTR y su interacción con proteínas asociadas al ARN (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). Un análisis reciente sobre transcripción y traducción de genes plastídicos durante la maduración en frutos de tomate, ha mostrado que muchos genes plastídicos son drásticamente regulados durante este periodo (Kahlau y Bock, 2008); la alta regulación impide que aun con la utilización de promotores eficientes como 16S rRNA (que abarca tanto a PEP como a NEP) no mejoran los niveles de transcripción (Lee *et al.*, 2006a).

Estudios recientes indican que la sobreexpresión proteínica puede interactuar con metabolitos del cloroplasto; por ejemplo, los altos niveles de expresión de las enzimas celulíticas causa múltiples fenotipos mutantes de las plantas transplastómicas, debido a que secuestran intermediarios que intervienen en el metabolismo de carbohidratos en el cloroplasto (Petersen y Bock, 2011), lo que explica porque la baja expresión enzimática provee pocos fenotipos aberrantes (Tregoning *et al.*, 2003; Glenz *et al.*, 2006). Petersen y Bock (2011) postularon que podría disminuirse este efecto al integrar los transgenes en regiones con señales de expresión poco activas. De igual forma el uso de elemento reguladores de genes heterólogos reduce sustancialmente la expresión de los transgenes debido a la inestabilidad de la transcripción, diferencias de afinidad de proteínas asociadas a ARN y una reducción de la traducción (Ruhlman *et al.*, 2010), el efecto de estos elementos reguladores podrían analizarse bajo la degradación *in vivo* de RNA, la desventaja es que los intermediarios no se acumulan en altos niveles como para ser detectados (Zicker *et al.*, 2007).

#### **2.4.2.2. Biofarmacéutica**

El uso de plantas para producir componentes químicos con interés nutricional y farmacéutico ha aumentado al grado de ser catalogadas como un sistema promisorio para la producción de proteínas terapéuticas, tanto humanas como de animales y su producción va aumentando considerablemente (Chen *et al.*, 2005; Becerra-Moreno *et al.*, 2012). Desde sus inicios con la expresión de la hormona de crecimiento (clonada posteriormente en cloroplastos de tabaco) la biofarmacéutica ha desarrollado



múltiples tratamientos proteínicos que en el 2007 la posicionaron con el 10% del mercado (Barta *et al.*, 1986; Staub *et al.*, 2000; Lowe y Jones, 2007). Con énfasis en los problemas que atacan a la población en años recientes, se han sobreexpresado proteínas *hpv-1* (cáncer cervical) con 24% de proteína total soluble (PTS) (Fernandez-San Millan *et al.*, 2008); la albúmina del suero humano con expresión del 11.1% sin degradación proteolítica fue un avance sobresaliente debido a los bajos costos de producción y a la susceptibilidad que presenta a la proteólisis (Fernández-San Millán *et al.*, 2003); en este sentido, se han llevado a cabo investigaciones con VIH (proteína *p24*) y la creación de vacunas idiotípicas para ciertos linfomas (McCormick *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Por otra parte, en 2004 se produjo la primer vacuna epítope en cloroplastos al sobreexpresar el péptido '2L21' que confiere protección a perros contra el parvovirus con 31.1% de la proteína total soluble (PTS) (Molina *et al.*, 2004), igualmente se ha demostrado que la aplicación de vacunas en base de plantas pueden suministrarse con resultados equiparables al tratamiento normal como se constató con la expresión del fragmento C de la toxina tetánica; asimismo, las plantas puede formar proteínas que se utilizan en el tratamiento de enfermedades alérgicas y autoinmunes (Ma y Jevnikar, 2008).

Los plástidos tienen capacidad para generar modificaciones postraduccionales de proteínas foráneas aunque el proceso es poco conocido (Glenz *et al.*, 2006); sin embargo, a la fecha se han expresado 23 antígenos contra 16 diferentes organismos (bacterias, virus y protozoarios) con altas tasas de inmunización (pe. *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium* spp.) (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2009); en este sentido, las proteínas expresadas en cloroplasto pueden ser

estables durante largos periodos de tiempo, como se demostró con epítopes de *Staphylococcus aureus* (Dreesen *et al.*, 2010). Plantas como tabaco, algas, tomate, papa, zanahoria, berenjena entre otras, se han utilizado como biorreactores, aunque algunos autores aun mencionan al maíz como un biorreactor promisorio (Sidorov *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2001; Dufourmantel *et al.*, 2004; Ramessar *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Becerra-Moreno *et al.*, 2012). La funcionalidad de las proteínas terapéuticas generadas a partir de ingeniería de cloroplasto ha sido demostrada en múltiples ensayos, por lo que se prevé que las terapias basadas en proteínas recombinantes se posicionen como el principal recurso contra diferentes enfermedades debido a la especificidad de las moléculas así como su sensibilidad, bajo costo y eficiencia de producción; por lo tanto, nuevas investigaciones sobre proteínas de expresión cloroplastídica tendrán un repunte en años venideros (Daniell, 2006b; Mayfield *et al.*, 2007).

#### **2.4.2.3. Ingeniería metabólica**

La ingeniería metabólica para maximizar la producción de un metabolito con uso industrial o farmacéutico es un objetivo importante en la ingeniería de cloroplasto, en el cual, se requiere una expresión concertada de múltiples genes (Kumar *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013) y diseño de elementos intercistronicos que permitan la expresión policistronica (Zhou *et al.*, 2007); sin embargo, presenta complicaciones como la presencia de isozimas en una ruta metabólica lo cual hace imperativo el conocimiento preciso de la ruta en si (Shumskaya *et al.*, 2012). No obstante, la ingeniería de cloroplasto se ha utilizado eficientemente en la expresión de genes

para omega-3 (Nguyen *et al.*, 2013), desaturasas de omega-6 (Sato *et al.*, 1997), tocoferoles y tocotrianoles (Lu *et al.*, 2013), flavodoxinas (Zurbriggen *et al.*, 2008), así como para maximizar la producción de biomasa y su hidrólisis (Fouad y Altpeter, 2009; Verma *et al.*, 2013). Por otro lado, la ingeniería metabólica también se ha utilizado con fines energéticos para maximizar sustratos para biocombustibles donde se han logrado plantas con inusuales perfiles de ácidos grasos, incremento en aceites así como producción de alcoholes (Radakovits *et al.*, 2010; Rogalski y Carrer, 2011), aunque también se ha hecho enfoque en rutas de isoprenoides (Kumar *et al.*, 2012) y terpenos (Wu *et al.*, 2012); en este sentido, se ha logrado eficientar la ruta de carotenoides por medio de la inserción de genes para licopeno- $\beta$ -ciclase y fitoeno sintasa en tomate (Fraser *et al.*, 2007; Apel y Bock, 2009), zanahoria (Jayaraj *et al.*, 2008), tabaco (Hasunuma *et al.*, 2008) y *Chlamydomonas* (Leon *et al.*, 2007); y es prudente considerar que en un futuro se potencialice la producción de vitaminas en plantas (Fitzpatrick *et al.*, 2012; Pourcel *et al.*, 2013).

#### **2.4.2.4. Aplicaciones agronómicas**

Las plantas transplastómicas se han ido incrementando debido a la posibilidad de generar una sobreexpresión de proteínas foráneas con nulos efectos epigenéticos y la posibilidad de contener los transgenes evitando contaminaciones (Ruhlman *et al.*, 2010).

El mejoramiento de cultivos vía cloroplasto, manifiestan alta expresión de los transgenes dependiente de la especie (tomate, 50%, col 3.2-5.2%), de la región

intergénica utilizada y de las regiones estructurales tales como promotores, 5' y 3'UTR, entre otros (Kang *et al.*, 2003; Viitanen *et al.*, 2004) pero independientemente del transgen insertado (Oey *et al.*, 2009b). El mejoramiento agrícola se ha abierto a la integración de transgenes al permitir sobreexpresar rutas biosintéticas de interés económico como la hidrólisis de biomasa (Petersen y Bock, 2011) mediada por la expresión del gen  $\beta$ -mannanasa de *Trichoderma reesei* en tabaco (Agrawal *et al.*, 2011) o la inducción de carotenoides mediada por licopeno a provitamina A reportado en tomates (Apel y Bock, 2009); sin embargo, el mejoramiento en la agricultura ocurre no solo para maximizar un factor vitamínico, sino también por la necesidad de protección de cultivos, lo que ha ayudado a la integración de genes de proteínas insecto-letales como *Bt* 'cry2Aa2' que confiere resistencia a las plantas contra plagas y la sobreexpresión de esta proteína, se muestra letal para insectos Bt-resistentes; asombrosamente la sobreexpresión del operón de la misma proteína puede formar insecticidas en cristales (Kota *et al.*, 1999; De Cosa *et al.*, 2001; Chakrabarti *et al.*, 2006), en adición, la transplastómia puede conferir protección contra bacterias y hongos al expresar péptidos antimicrobianos (DeGray *et al.*, 2001). Sin embargo, los enemigos naturales de un cultivo no únicamente son organismos vivos, sino que también el ambiente juega un papel preponderante en el desarrollo o muerte de las plantas, por lo que se han ideado mecanismos para asegurar resistencias a ambientes extremos como la expresión del gen de Betaína aldehído deshidrogenasa (Kumar *et al.*, 2004) para conferir resistencia a salinidad o bien para maximizar la descontaminación de metales pesados del ambiente como el mercurio por las plantas a través de una mayor absorción por las raíces, la translocación de brotes y la volatilización (Hussein *et al.*, 2007; Ruiz y Daniell, 2009).

El futuro del mejoramiento genético transplastómico aún tiene algunos obstáculos pues estudios recientes indican que la sobreexpresión de proteínas puede interactuar con los intermediarios de las rutas metabólicas causando fenotipos mutantes (Petersen y Bock, 2011), esto aunado a que la embriogénesis somática ha tenido éxito en dicotiledóneas logrando un estado homoplásmico, lograr este estado en monocotiledóneas ha sido bastante difícil; este es uno de los mayores obstáculos del avance de la ingeniería de plástidos en cultivos de interés agronómico (Clarke y Daniell, 2011); si bien no se ha logrado aún identificar un método por el cual se integren transgenes a todas las especies de plantas, el uso de cultivos de interés agronómico se ha mostrado prometedor para interactuar con el aspecto biofarmacéutico (Daniell *et al.*, 2009), abordando un nuevo enfoque en biotecnología de cultivos agrícolas.

#### **2.4.2.5. Enzimas hidrolíticas de paredes celulares**

Las paredes celulares de plantas son una estructura compleja, dinámica y sofisticada con roles centrales en el crecimiento, desarrollo y la forma de las plantas. Debido a esto, las paredes juegan un rol importante en la respuesta al estrés del ecosistema y contra el ataque de microorganismos (Soriano *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011); la pared celular esta comúnmente integrada por una pared primaria compuesta por celulosa, pectina, hemicelulosa y una pared secundaria producida por cesación de células en expansión provenientes de células especializadas; está constituida por celulosa formando múltiples hojas embebidas en una matriz de lignina y hemicelulosa (Cosgrove, 1993). De los

constituyentes de la pared celular, la celulosa es únicamente estructural; este polímero es el mayor carbohidrato sintetizado por las plantas constituyendo cerca del 40% de peso de la biomasa con estructuras unidas de polímeros lineares de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,4 de 100 a 14000 residuos (Beguin y Aubert, 1994; Ragauskas *et al.*, 2006). Actualmente, la celulosa es usada en la industria del papel, fibras textiles hechas de algodón, aislantes, material de construcción, en el procesamiento de alimentos o como aditivos en crecimiento de hongos; sin embargo, los residuos de celulosa son encontrados en desechos de actividades humanas, que aunque no son peligrosos, la acumulación de esos productos constituyen un deterioro del ecosistema (Hoondal *et al.*, 2002; Petersen y Bock, 2011; Jung *et al.*, 2013); por otro lado, la lignina (resultado del acoplamiento oxidativo de 4-hidroxifenilpropanoides) es el componente de la pared celular vegetal más abundante de la biosfera y de los residuos más voluminosos que produce nuestra sociedad que aunque no es tóxico, la naturaleza heterogénea y recalcitrante de los residuos celulósicos presenta un gran obstáculo para los procesos de conversión convencionales (debido al entremezclado de lignina con residuos hemicelulósicos formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa, impidiendo que enzimas actúen en la hidrólisis de los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa) (Jung *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Espinoza-Sánchez *et al.*, 2015); sin embargo, el diseño de nuevas estrategias de procesamiento estimulado por la disminución de las reservas de petróleo, podrían convertir la biomasa celulósica en biocombustibles, además de procesar materia prima para la industria del papel (Cosgrove, 2005; Bayer *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008).

Debido a que la pared celular comprende más del 90% del peso seco de las plantas superiores, se hace preponderante encontrar un método eficiente que permita obtener los residuos de la celulosa (Petersen y Bock, 2011); por este motivo, nuevas investigaciones se enfocan en la manipulación de los niveles de expresión de las enzimas involucradas en la degradación de paredes celulares ya sea por la expresión de genes homólogos o heterólogos en antisentido o bien por la supresión de los genes involucrados en la síntesis de los componentes (Dwivedi *et al.*, 1994; Chen y Dixon, 2007; Li *et al.*, 2008). En este sentido, los microorganismos son eficientes en el proceso de conversión por lo que se convierten en una fuente importante de enzimas que pueden utilizarse por la ingeniería genética (Wei *et al.*, 2009); por tal motivo, la expresión de este tipo de enzimas se ha reportado para sistemas bacterianos (por la simplicidad, bajos costos y cortos tiempos de estos sistemas de expresión) (Maliga y Bock, 2011); si bien existen reportes previos utilizando tecnología transplastómica para expresión de enzimas hidrolíticas como GH10 (Xyl10B),  $\beta$ -glucosidasa, exoglucanasa, endoglucanasas y xyloglucanasa (11-15% PTS) y enzimáticamente activas sin efectos colaterales (Verma *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Petersen y Bock, 2011), si existen reportes de efectos negativos al sobreexpresar endoglucanasas (40% PTS) (Petersen y Bock, 2011). Debido a las limitadas investigaciones enfocadas en la producción y sobreexpresión de enzimas hidrolíticas en los compartimientos cloroplastídicos, así como en la evaluación de su actividad enzimática, hacen preponderante incursionar en esta vertiente (Tungsuchat-Huang *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Petersen y Bock, 2011).

Para la producción industrial, se han requerido nuevas fuentes de enzimas y los microorganismos han sido utilizados tanto como fuente y como bioreactores (Beguin y Aubert, 1994; Wei *et al.*, 2009); sin embargo, la producción de enzimas no es eficiente y se requieren nuevas técnicas (Cosgrove, 2005; Bayer *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008); por tal motivo, considerando que las plantas transplastómicas han sido eficientemente probadas en la expresión de múltiples proteínas (Bock, 2007; Verma *et al.*, 2010) y que muestran sobreexpresiones de hasta el 70% de PTS (Oey *et al.*, 2009a; Maliga y Bock, 2011), hacen de esta una tecnología promisoría para la obtención de altos niveles de enzimas de interés con impacto ambiental (Maliga, 2004; Daniell *et al.*, 2005c; Chen y Dixon, 2007; Maliga y Bock, 2011).

#### **2.4.2.6. Métodos de acción de enzimas hidrolíticas: pectin liasas, manganeso peroxidases y celulasas**

Para la degradación de polímeros de paredes celulares, se requieren cocteles de enzimas capaces de degradar eficientemente estos polímeros, las cuales se encuentran comúnmente en bacterias y hongos. De los constituyentes estructurales, la degradación de pectina se realiza por la pectin liasa (EC 4.2.2.2), endoglucanasa  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente con múltiples subfamilias (PL1, PL2, PL3 y PL9) (Shevchik *et al.*, 1997; Cantarel *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2013), está involucrada en factores de virulencia de patógenos de plantas y en la ruptura de uniones específicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  de ácido poligalacturónico, principal componente de la pectina de las paredes celulares, liberando 4,5-insaturados di y trigalacturonatos de varios pectatos (Barras *et al.*, 1994; Herron *et al.*, 2000). En el caso de la lignina, componente principal de la pared



celular, algunos hongos utilizan un coctel de enzimas (lacasas 'Lac', lignin peroxidasas 'LiP' y manganeso peroxidasas 'MnP') capaz de degradar la lignina eficientemente; de estas, las MnP's muestran alta homología de sus secuencias primarias con respecto a otras ligninasas (Gold y Alic, 1993; Irie *et al.*, 2000; Davarpanah *et al.*, 2012) removiendo un electrón de una fracción de fenol de la lignina para generar un fenoxi radical y oxidarlo de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  estabilizándose por ácidos orgánicos quelantes lo cual facilita la degradación de compuestos fenólicos en presencia de  $H_2O_2$  (Nagai *et al.*, 2007). La lignina es la fuente más importante de polímeros aromáticos en la naturaleza y su descomposición es necesaria para el reciclado de carbón; además, la actividad de MnP's es importante en la conservación del ecosistema (Sánchez, 2009; Wong, 2009).

En el caso de la celulosa, la degradación requiere un consorcio de enzimas que incluyen endo- $\beta$ -glucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucohidrolasa 'EC 3.2.1.4'), exoglucanasas (1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasa 'EC 3.2.1.91'), glucanglucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucanglucohidrolasa 'EC 3.2.1.74'), y  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucosidoglucohidrolasa 'EC 3.2.1.21'), esas enzimas son naturalmente producidas por un amplio espectro de bacterias y hongos. Esas enzimas usualmente existen como celulosomas unidas a la pared celular de bacterias pero secretadas al ecosistema por los hongos (Juturu y Wu, 2014). En la degradación de la celulosa, las endoglucanasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces glucosídicos resultado en una decremento de la longitud de polímeros y un incremento gradual en la concentración de azúcares reducidos (Wood y Bhat, 1988; Beguin y Aubert, 1994), seguido por exoglucanasas que hidrolizan las cadenas de celulosa removiendo celobiosa de los

finales reducidos o no reducidos (Teeri, 1997); posteriormente,  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa para finalmente liberar D-glucosa (Rixon *et al.*, 1992; Goyal y Eveleigh, 1996). En este sentido, estas enzimas son actualmente la tercera enzima industrial a nivel mundial y su producción está enfocada para el procesamiento de algodón, el reciclado del papel, como detergente, extracción de jugos y como aditivos a alimentos de consumo animal (Beguin y Aubert, 1994; Wilson, 2009).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Material Vegetal**

Se utilizaron plantas estériles de tabaco (*Nicotina tabacum* var. Petite havana) como bioreactores. Las semillas de tabaco se sembraron en Peat moss<sup>®</sup>, y se hicieron crecer en invernadero para caracterizar el fenotipo silvestre y se mantuvieron hasta maduración. Las semillas obtenidas fueron germinadas bajo condiciones estériles en medio RM desinfectadas bajo las siguientes condiciones: tres lavados con agua destilada por 1 min en agitación constante, un lavado con etanol al 70% durante 30 s, un lavado con etanol al 100% durante 10 s, tres lavados con agua destilada estéril, un lavado con sulfato de cobre 1%.

##### **3.1.2. Cepas de *Escherichia coli***

Para el mantenimiento y propagación de plásmidos se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad CA, EUA).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Cepas de *E. coli*

Las células se prepararon inoculando 5 ml de medio de cultivo LB con cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y crecidas 15 h a 37°C. Posteriormente, se utilizó 1 ml del cultivo inicial para inocular 100 ml de medio LB y se colocaron a 37°C en agitación constante hasta obtener una densidad óptica de 0.35-0.4 (OD<sub>600</sub>). El medio se colocó en tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 ml previamente fríos (4°C) y centrifugados a 4000 rpm por 14 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 100 mM frío, posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM; la suspensión se colocó en hielo por 20 min. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 85 mM, 15% glicerol, y se centrifugó nuevamente a 2100 rpm por 15 min a 4°C, posteriormente el sobrenadante retiró y la pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 85 mM, 15% glicerol (OD de células ~200-250), 50  $\mu$ l de células competentes se colocaron en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 ml y congeladas a -80°C.

### 3.2.2. Aislamiento de ADN Plasmídico (Miniprep)

Los ADNs plasmídicos se extrajeron de *E. coli* por el método de lisis alcalina. Cultivos bacterianos de la cepa DH5 $\alpha$  se hicieron crecer en placas LB suplementadas con antibióticos para la selección de clonas transformantes e incubadas a 37°C por 16 h. Las células se colectaron y resuspendieron en 70  $\mu$ l de

agua destilada estéril, posteriormente se adicionaron 350  $\mu\text{l}$  de TENS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaOH, 0.5% SDS); la solución se mezcló por inversión de tubo y se reposaron 3 min, después de los cuales se le adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 y mezclados suavemente por inversión; los tubos 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 tubo Eppendorf® de 1.5 ml y se le adicionaron 700  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto centrifugándolo posteriormente a 13 200 rpm durante 10 min. Las pastillas obtenidas se lavaron con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las pastillas se resuspendieron con 20  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y cuantificados (~7 000 ng).

### **3.2.3. Transformación de *E. coli***

La transformación de células de *E. coli* se realizó por choque térmico, 100 ng de ADN plasmídico se colocaron en 50  $\mu\text{l}$  de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , mezcladas y colocadas en hielo por 15 min. Posteriormente el tubo se sometió a choque térmico a 42°C por 60 s y posteriormente se colocó en hielo por 5 min; 500  $\mu\text{l}$  de medio LB se adicionaron a la transformación y se colocaron en agitación por una hora. Transcurrido este periodo, las células se sometieron a centrifugación a 13 200 rpm durante 11 s y se descartaron 150  $\mu\text{l}$  de medio, los 150  $\mu\text{l}$  restantes se colocaron en caja Petri con medio LB suplementado con ampicilina 100 mg L ml<sup>-1</sup> e incubadas a 37°C por 16 h.

### 3.2.4. Vectores de Transformación de Cloroplastos

Los genes se insertaron en los sitios *EcoRI/HindIII* del sitio múltiple de clonación del vector pPRV111A (Zoubenko *et al.*, 1994) que contiene los genes *rrn16S/3'rps12* como sitios de recombinación homóloga en la zona de repetidos invertidos (IRA/IRB); asimismo, el vector cuenta con el gen *aadA* (*aminoglucósido 3''-adenililtransferasa*) como gen marcador de selección que confiere resistencia a espectinomicina/estreptomicina y un sitio múltiple de clonación (MCS). Se utilizó el vector pUC57 que contiene el gen *AmpR* (resistencia a ampicilina) como gen marcador de selección como vector de replicación en *E. coli*.

### 3.2.5. Clonación de los Genes de Interés en los Vectores de Expresión para Cloroplastos

Se utilizaron cinco genes para las construcciones de los vectores de expresión: el gen que codifica para pectin liasa (*PeIA*) de *Streptomyces thermocarboxydus* (GenBank: AB513441) (Tonouchi *et al.*, 2010), el gen que codifica para manganeso peroxidasa isozima H3 (*MnP-2*) de *Phanerochaete chrysosporium* (GenBank: U10306) (Orth *et al.*, 1994),  $\beta$ -glucosidasa (*Bgl 1*) de *Aspergillus niger* (GenBank: AJ132386) (Dan *et al.*, 2000), celulasas tipo A (*CelA*) y celulasa tipo B (*CelB*) de *Thermotoga neapolitana* (GenBank: U93354) (Bok *et al.*, 1998).

El gen *PeIA* (804 pb) se diseñó y sintetizó flanqueado por el promotor *rrn16S* (P) y terminador *rbcL* (T); incluyendo a la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y la secuencia líder del gen *rbcL* (LS) en el extremo 5' de la región codificante del gen (*Prrn16S*,

SD, LS *rbcl*, *PelA*, *TrbcL*). El casete completo se sintetizó flaqueado por los sitios *EcoRI/HindIII* para ser escindido del vector pUC57 y clonado dentro de los mismos sitios en el vector pPRV111A; adicionalmente, la región codificante del gen *PelA* se flanqueó con secuencias de reconocimiento de enzimas 5'*NheI*/3'*XbaI* para poderlo reemplazar dentro del vector por los genes *MnP-2*, *Bgl1* y el dicistrón *CelA/CelB*; en este último, adicionales a los sitios *NheI/XbaI* incorporados al gen *CelA-CelB*, se incorporaron sitios *Scal/Clal* al inicio/final del gen *CelA* y *SmaI/HpaI* al inicio/final del gen *CelB* para poder recuperar cada gen (*CelA* y *CelB*) por separado para evaluar el mensajero de forma monocistrónica; los CD's completos se diseñaron de acuerdo al codón de uso del genoma del cloroplasto (Sinagawa-Garcia *et al.*, 2009).

Las secuencias de cada uno de los genes se diseñaron *in silico* utilizando el programa Serial Cloner 2.6.1 y sometidas a eliminación de sitios de restricción no deseados mediante mutaciones puntuales silenciosas (gen *PelA*: sitio *XbaI* 1216 pb/3'*UTR*; gen *Bgl 1*: sitio *NheI* 1611 pb, 2166 pb; y gen *CelA-CelB*: sitio *HindIII*, 381 pb, *EcoRI*, 1284 pb). Las secuencias se enviaron a la compañía GeneScript (*New Jersey, USA*) para su síntesis y clonación dentro del vector pUC57.

### **3.2.6. Transformación Genética de Cloroplasto**

#### **3.2.6.1. Preparación de partículas de oro**

Para la transformación genética de cloroplastos de tabaco se utilizó el método de transformación por biobalística, 30 mg de micropartículas de oro de 0.6  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, München, Alemania) se colocaron en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de

etanol al 70% a 4°C y se mezcló en vórtex vigorosamente por 5 min. Las partículas se dejaron reposar por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min, se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de agua estéril a 4°C y se mezcló en vórtex por 1 min. Se incubaron las partículas a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugaron las partículas a 3000 rpm durante 1 min y descartó el sobrenadante (estos lavados se repitieron dos veces). Se adicionó 1 ml de etanol absoluto y se mezcló en vórtex por 1 min. Se precipitaron las partículas a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min y descartó el sobrenadante para finalmente resuspender las partículas en 500  $\mu$ l de glicerol al 50%. La concentración final de las partículas fue de 60 mg ml<sup>-1</sup> y se almacenaron a temperatura ambiente.

### **3.2.6.2. Preparación de material utilizado para bombardeo**

La pistola y el material utilizado en el bombardeo de hojas de tabaco, se esterilizaron con etanol absoluto y secando en campana de flujo laminar a temperatura ambiente.

### **3.2.7. Metodología para el Bombardeo de Hojas de Tabaco**

#### **3.2.7.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN plasmídico**

Para el bombardeo de hojas de tabaco, ADN plasmídico se obtuvieron utilizando columnas QIAGEN Plasmid Maxi Kit (*QIAGEN Inc., Valencia, CA*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante e incorporado a partículas de oro de 0.6  $\mu$ m.



Se utilizaron 500  $\mu\text{l}$  de partículas de oro preparadas previamente en glicerol al 50%, se mezclaron vigorosamente en vórtex por 5 min hasta que se resuspendieron completamente. Se alicuotaron 5 tubos con 100  $\mu\text{l}$  de las partículas y en cada tubo se agregaron en orden los siguientes componentes agitando 5 s entre cada componente: 5  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2.5M), 20  $\mu\text{l}$  de espermidina (0.1M). Se mezclaron en vórtex durante 3 min y se centrifugaron a 5000 rpm por 20 s, se adicionaron 140  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se resuspendieron las partículas por golpeteo con el dedo. Se centrifugó a 5000 rpm por 20 s. Posteriormente se les agregó 140  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se centrifugaron a 5000 rpm por 20s. Posteriormente, las partículas se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se colocaron en vórtex con agitación vigorosa hasta su uso (este material se usó para cinco bombardeos).

### **3.2.8. Bombardeo de Hojas de Tabaco**

Se utilizaron hojas jóvenes de tabaco de seis semanas crecidas en condiciones estériles, las hojas fueron colocadas en cajas Petri con medio RM con la cara abaxial hacia arriba cubriendo el 80% de la caja Petri 24 h antes del bombardeo. El bombardeo de hojas de tabaco se realizó de acuerdo a Svab y Maliga (1993), Bock (2001) y Lutz *et al.* (2006) en campana de flujo laminar previamente esterilizada con etanol absoluto; una pistola de alta presión Bio-Rad S1000He adicionada con un hepta adaptador (Bio-Rad, München, Alemania) se utilizó y esterilizó con etanol absoluto.

Siete discos de ruptura (microcarriers Bio-Rad, München, Alemania) de 1100 psi se utilizaron para el bombardeo; asimismo, siete macrocarriers (Bio-Rad, München, Alemania) y 49  $\mu\text{l}$  de partículas recubiertas con ADN plasmídico se utilizaron por disparo (7  $\mu\text{l}$  por macrocarrier). La caja Petri con hojas se colocó en la cámara de disparo a 11 cm de distancia del revólver, se generó vacío hasta que el indicador marcó 25 mm de Hg. Una vez realizado el disparo se retiró la caja Petri bombardeada cubriéndola inmediatamente.

### **3.2.9. Selección y Regeneración de los Explantes Transformados**

Las hojas bombardeadas se incubaron por 24 h a 27°C en oscuridad para permitir la regeneración del tejido, posteriormente las hojas bombardeadas se cortaron en piezas de 3 x 3 mm y colocaron en medio RMOP (Macronutrientes 10X 100 ml L<sup>-1</sup>, micronutrientes 100X 10 ml L<sup>-1</sup>, FeEDTA 5 ml L<sup>-1</sup>, Tiamina 1 ml L<sup>-1</sup> [1mg/ml], NAA 0.1 ml L<sup>-1</sup> [1mg/ml], BAP 1 ml L<sup>-1</sup> [1mg/ml], Myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, agar 8 g L<sup>-1</sup>, pH 5.8) suplementado con 500 mg L<sup>-1</sup> de espectinomicina (*Sigma-Aldrich*, Japón) e incubadas a 27°C bajo condiciones de luz hasta obtener brotes. De los brotes obtenidos, sus hojas se cortaron en dos secciones, una sección se colocó en medio RMOP suplementado con 500 mg L<sup>-1</sup> de espectinomicina (*Sigma-Aldrich*, Japón) y otra sección se colocó en medio RMOP 500 mg L<sup>-1</sup> de espectinomicina/estreptomina (*Sigma-Aldrich*, Japón) para distinguir las clonas mutantes de las transformantes. De las clonas resistentes a estreptomina, la contraparte espectinomicina-resistente se sometió a una tercera ronda de selección en medio suplementado con 500 mg L<sup>-1</sup> de espectinomicina. Los explantes

desarrollados de tercera selección se colocaron en cajas Magenta<sup>®</sup> con medio RM no suplementado. Explantes totalmente desarrollados de caja Magenta<sup>®</sup> se colocaron en bolsas de polietileno para ser colocadas en invernadero tras previa etapa de aclimatación en cámara bioclimática a 27°C durante 15 días.

### **3.2.10. Análisis de la Integración del ADN en las Plantas Transplastómicas por Southern blot**

#### **3.2.10.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las hojas de tabaco se realizó con el protocolo de Doyle (1991) a partir de 1 g de tejido fresco. Las muestras se colocaron en tubos *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1.5 ml previamente fríos y se les adicionaron 800  $\mu$ L de solución CTAB (5M NaCl, 0.5M EDTA, 1M Tris-HCl pH 7.5, 1% de CTAB, y 1%  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubadas a 60 °C por 15 min en baño maría. Los tubos se retiraron del baño maría y se dejaron enfriar por 5 min. Se agregaron 800  $\mu$ L de cloroformo-octanol (24:1) y se mezclaron suavemente; se agitaron en vórtex hasta estar bien mezclados y se centrifugaron 10 min a 13200 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1.5 ml y se añadieron 600  $\mu$ L de etanol-acetato; posteriormente se colocaron en refrigeración por 30 min después del cual se centrifugaron a 13200 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó por inversión y se agregaron 500  $\mu$ L etanol al 70% para lavar las pastillas; se centrifugaron 13200 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante dejando secar la pastilla para

resuspenderla en 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. La cuantificación se realizó por Nanodrop<sup>®</sup>, las muestras fueron colocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.2.11. Detección de la Integración de los Transgenes en el Genoma de los Cloroplastos Mediante PCR

Las amplificaciones de PCR se realizó mediante primers específicos para cada gen: gen *PeiA* Fw-5'ATGACATCCGCGACACGA3' Rv-5'TGATGTCGGACGAGCTGTACT3', gen *Mnp-2* Fw-5'ATGGCCTTTGCATCCTCA3' Rv-5'TTATGCAGGGCCGTTGAAC3', gen *Bgl1* Fw-5'TTCACTTTGATCGAGGCGGT-3' Rv-5 TGAACAGTAGGCAGAGACGC3', gen *CelA* Fw-5'ACCGGGAACGGCAGATTT3' Rv-5'CATCCTTTCACCTCCATATCG3', gen *CelB* Fw-5'TGAGGTTGGTCGTCTCTTTTC3' Fw-5'TGGTATTTGGATCACCGAAC3'; para amplificar el gen marcador de selección (*aadA*) se utilizó: Fw-5'AATGATGTCGTCTGCACAA3' bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguido por 25 ciclos de amplificación (45 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 s a  $60^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ) y un ciclo final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min.

#### 3.2.11.1. Marcaje de sondas para Southern blot con digoxigenina

La incorporación de digoxigenina a las sondas de 16S rRNA se realizó por amplificación por PCR, 56  $\mu\text{L}$  de agua se colocaron en un tubo de reacción de PCR al que se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de solución buffer para *Taq*, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 0.8  $\mu\text{L}$  de digoxigenina 11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemania), 4.8  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa, 6  $\mu\text{L}$  de primer Fw-5'TGAGAATGGATAAGAGGCTC3', 6  $\mu\text{L}$  de

primer Rv-5'TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG3' y 4  $\mu\text{L}$  de ADN (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) para un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de reacción; las reacciones se realizaron por duplicado, una reacción con digoxigenina 11-dUTP, y otra sin digoxigenina 11-dUTP bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94°C, seguido por 25 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 45 s a 60°C, 1 min a 72°C) y un ciclo final a 72°C por 5 min.

Diez  $\mu\text{L}$  de la reacción de amplificaciones se cargaron en geles de agarosa al 0.8% y corridas a 70V durante 40 min para evaluar la integración de digoxigenina 11-dUTP. Los geles se analizaron en fotodocumentador BioDoc-It™ Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido); la integración de digoxigenina 11-dUTP se corroboró por amplificaciones de diferente peso molecular comparadas con las sondas no marcadas (Biochemicals, 2000). Las sondas se colocaron a -20°C hasta su uso.

### **3.2.11.2. Digestión de ADN de las plantas y su separación en geles de agarosa**

Para evaluar la homoplasmicidad se utilizó una sonda del 16s RNA ribosomal (*rRNA16S*) marcada con digoxigenina. ADN total se extrajo de plantas de tabaco por medio del protocolo de Doyle (1991), 4  $\mu\text{g}$  de ADN de plantas de tercera selección no transformadas (UT) y las de plantas transformadas se sometieron a digestión por *BamHI* durante 4 h y cargadas en un gel agarosa al 1% a 65 V por 4 h; los geles de agarosa se visualizaron en un fotodocumentador BioDoc-It™ Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente los geles de agarosa se colocaron en HCL

120 mM por 30 min en agitación suave, después del cual se desnaturalizaron por 30 min en 0.4 N de NaOH, 0.6 M NaCl. Se neutralizaron en 0.5 M de Tris pH 7.5, 1.5 M de NaCl (cada tratamiento con un volumen de tres veces el volumen del gel).

### **3.2.11.3. Transferencia de ADN a las membranas de nylon**

En un recipiente Pyrex<sup>®</sup> se colocó una base con papel 3MM del doble de la dimensión del gel de agarosa y Buffer de transferencia (25 mM de NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5) se adicionó hasta que estuvo en contacto con el papel 3MM; sobre el papel 3MM se colocó el gel en posición invertida y sobre él se colocó una membrana de nylon para transferencia (Blotting nylon type B positive, *Fluka*<sup>®</sup> Chemie GmbH, *Steinheim*, Alemania) previamente cortada de las mismas dimensiones del gel; sobre éste, tres secciones de papel 3MM de las mismas dimensiones se colocaron para permitir la absorción (en cada sección se evitó que quedaran burbujas), en la parte superior se colocaron 15 cm de Sanitas<sup>®</sup> para absorber el Buffer de transferencia y se le adicionaron 300 g de peso para ejercer presión sobre el gel. La construcción se dejó reposar durante 18 h y posteriormente las secciones se retiraron en el mismo orden en que fueron colocadas; una vez que la matriz se removió, inmediatamente se colocó en solución salina de citratos 2X (SSC) manteniéndola en agitación por 15 min. Las membranas de nylon se dejaron secar por 5 min (sin permitir que se seque totalmente), posteriormente las membranas fueron expuestas a luz UV utilizando un expositor Crosslinker (CL1000 Ultraviolet crosslinker) utilizando el programa preestablecido (Power>Preset>Energy: 120 000  $\mu$ Joule/cm<sup>2</sup> por 12 s). La membrana se colocó a 4°C hasta su uso.

#### **3.2.11.4. Prehibridación e hibridación**

Las membranas de nylon se retiraron de refrigeración y se colocaron en tubos de hibridación con la cara que dio al gel hacia adentro; se le adicionaron 20 ml de solución de hibridación (50% de formamida desionizada, 5X de SSC, 0.1% de N-Lauril-Sarcosina, 0.02% de SDS, 2% de reactivo bloqueador “caseína”) y se colocaron en horno de hibridación en agitación constante por 4 h a 50°C.

Diez  $\mu\text{L}$  de la sonda marcada con digoxigenina 11-dUTP se colocaron en tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 ml; se les adicionó 1 ml de agua destilada estéril; la sonda se colocó en baño maría a 95°C por 15 min y colocada en hielo por 5 min. Trascorrido este tiempo, la sonda se adicionó a la solución de hibridación y se incubó a 65°C por 12 h en horno de hibridación en agitación constante (las soluciones de hibridación pueden ser recuperadas y almacenadas para usarse nuevamente).

#### **3.2.11.5. Lavado de membranas**

Las membranas de nylon se recuperaron y colocaron en charolas Pyrex<sup>®</sup> para su lavado. Las membranas se lavaron dos veces por 5 min con 1X de SSC, 0.1% de SDS a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces por 15 min en 0.2X de SSC, 0.1 SDS a 65°C. Las membranas se colocaron en Buffer 1 (10 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) y se lavaron por 5 min; posteriormente, las membranas se colocaron en Buffer 2 (100 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 M NaCl, 5% reactivo bloqueador ‘caseína’) e incubadas por 30 min.

En 50 ml de Buffer 2 se colocaron 3.3  $\mu$ l de anti-digoxigenina (1:15000) (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments 'Roche, Mannheim, Alemania'); las membranas se sumergieron y se incubaron por 30 min, después del cual fueron lavadas tres veces durante 10 min en Buffer 2 y tres veces durante 10 min en Buffer 1. Finalmente las membranas fueron lavadas en Buffer 3 (100 mM tris-HCl, pH 9.5, 100 M NaCl) durante 5 min.

Las membranas se colocaron sobre nylon y sobre ella se vertieron 500  $\mu$ l de solución CSPD (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II solution, Roche, Mannheim, Alemania), se cubrió la membrana con una capa de plástico y se retiró el exceso de CSPD hasta eliminar la totalidad de las burbujas. Posteriormente, las membranas se colocaron en carpetas de exposición exponiéndose por el frente y el envés con películas de revelado Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim, Alemania) en cuarto oscuro a temperatura ambiente por 12 h. El revelado se llevó a cabo colocando las películas en solución de revelado (Kodak<sup>®</sup>) por 30 s, posteriormente se sumergieron en solución fijadora (Kodak<sup>®</sup>) por 5 min y enjuagadas en agua destilada estéril por 3 min. Las películas se secaron al aire a temperatura ambiente.



### **3.2.12. Análisis de Acumulación de mRNA en Plantas Transplastómicas por Northern blot**

#### **3.2.12.1. Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó por medio del método de LiCl (Stiekema *et al.*, 1988), 250 mg de tejido verde fresco se maceraron hasta obtener una pasta homogénea; se le agregaron 0.5 ml de buffer de extracción (0.2 M de acetato de sodio pH 5.2, SDS 1%, 0.01 M de EDTA pH 8.0) y 0.5 ml de fenol saturado. Una vez que la mezcla se descongeló se agregaron 0.5 ml más de buffer de extracción y se colectó en tubo Eppendorf® de 2 ml. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex por 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y posteriormente se agregaron 0.5 ml de fenol-cloroformo (50/50 v/v), se agitaron en un vórtex por 1 min y se centrifugaron a 13200 rpm durante 5 min a 4°C; el sobrenadante se recuperó y se adicionó 1/3 del volumen total de 10 M de LiCl. La solución se mezcló y se dejó reposar toda la noche a 4°C para precipitar el ARN. Posteriormente el ARN se recuperó por centrifugación a 13200 rpm por 10 min a 4°C; el ARN precipitado se lavó con 500 µl de LiCl 2.5 M y se centrifugó por 10 min a 4°C a 13200 rpm. Finalmente, el ARN se lavó con etanol al 70% y disolvió en agua destilada estéril. Las muestras se colocaron a -80°C para evitar su degradación.

### 3.2.12.2. Marcaje de las sondas con digoxigenina-11-dUTP para Northern blot

Para el análisis de procesamiento de mRNA se prepararon diferentes sondas con primers específicos para amplificar las regiones codificantes de cada gen: gen *PeIA* Fw-5'ATGACATCCGCGACACGA3' Rv-5'TGATGTCCGACGAGCTGTACT3', gen *MnP-2* Fw-5'ATGGCCTTTGCATCCTCA3' Rv-5'TTATGCAGGGCCGTTGAAC3', gen *Bgl1* Fw-5'TTCACTTTGATCGAGGCGGT-3' Rv-5 TGAACAGTAGGCAGAGACGC3', gen *CelA* Fw-5'ACCGGGAACGGCAGATTT3' Rv-5'CATCCTTTCACCTCCATATCG3', gen *CelB* Fw-5'TGAGGTTGGTCGTCTCTTTTC3' Fw-5'TGGTATTTGGATCACCGAAC3'. 56  $\mu\text{L}$  de agua se colocaron en un tubo de reacción de PCR al que se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de solución buffer para *Taq*, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 0.8  $\mu\text{L}$  de digoxigenina 11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemania), 4.8  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa, 6  $\mu\text{L}$  de cada primer por reacción y 4  $\mu\text{L}$  de ARN (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) para un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de reacción; las reacciones se hicieron por duplicado, una reacción con digoxigenina 11-dUTP, y otra sin digoxigenina 11-dUTP bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94°C, seguido por 25 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 45 s a 60°C, 1 min a 72°C) y un ciclo final a 72°C por 5 min.

Para verificar la incorporación de digoxigenina a las sondas, 10  $\mu\text{L}$  de la reacción de amplificaciones se cargaron en geles de agarosa al 0.8% y corridas a 70V durante 40 min. Los geles se analizaron en el fotodocumentador BioDoc-It™ Imaging System (*UVP, Cambridge, Reino Unido*); la integración de digoxigenina 11-dUTP se corroboró por amplificaciones de diferente peso molecular comparadas con las

sondas no marcadas (Biochemicals, 2000). Las sondas se colocaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2.12.3. Separación de ARN en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes**

Para la separación de ARN en gel en condiciones desnaturalizantes se preparó un gel de agarosa al 0.8% con 8 ml de MOPS 10X (10X MOPS: 20.93 g MOPS, 2.05 g acetato de sodio, 10 ml EDTA '0.5 M', pH 7.2) y 57.6 ml de DEPC-ddH<sub>2</sub>O, equilibrado con 15.8 ml de formaldehído (80 ml volumen final).

Diez  $\mu\text{g}$  de RNA con 25  $\mu\text{l}$  de buffer de carga de ARN 5X (750  $\mu\text{l}$  de formamida, 150  $\mu\text{l}$  10X MOPS, 240  $\mu\text{l}$  formaldehído, 130  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 200  $\mu\text{l}$  glicerol 50%, 30  $\mu\text{l}$  bromuro de etídio 7.7 mg/ml) se calentaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 min antes de ser cargados en el gel; posteriormente, el gel fue corrido a 65V durante 60 min.

### **3.2.12.4. Transferencia de ARN a membranas de nylon**

Los geles de agarosa para ARN no se sometieron a tratamientos adicionales como se realizó en Southern blot; la construcción del blot se realizó de forma idéntica al Southern blot; sin embargo, una vez transcurridas las 16 h de transferencia, las membranas de nylon fueron expuestas al aire por 5 min evitando que se secan y se expusieron a luz UV utilizando un expositor Crosslinker (CL1000 Ultraviolet crosslinker) utilizando el programa preestablecido (Power>Preset>Energy: 120 000  $\mu\text{Joule}/\text{cm}^2$  por 12 s) colocando la membrana a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2.12.5. Prehibridación e hibridación**

Las membranas de nylon se colocaron en tubos de hibridación (la cara que dio al gel hacia adentro); se le adicionaron 20 ml de solución de hibridación (50% de formamida desionizada, 5X de SSC, 0.1% de N-Lauril-Sarcosina, 0.02% de SDS, 2% de bloqueador "caseína") y se colocaron en horno de hibridación en agitación constante por 4 h a 50°C, 10  $\mu$ L de la sonda marcada con digoxigenina 11-dUTP se colocaron en tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 ml y se le adicionó 1 ml de agua destilada estéril; la sonda se colocó en baño maría a 95°C por 15 min para desnaturalizarla después del cual se colocan en hielo por 5 min. Trascurrido este tiempo, la sonda se adicionó a la solución de hibridación e hibridadas a 50-55°C por 12 h (las soluciones de hibridación con la sonda se recuperaron y almacenaron para usarse nuevamente).

### **3.2.12.6. Lavados de membranas**

Las membranas de nylon se recuperaron y colocaron en charolas Pyrex<sup>®</sup> para su lavado. Las membranas se lavaron dos veces por 5 min con 1X de SSC, 0.1% de SDS a temperatura ambiente; posteriormente, se lavaron tres veces por 15 min en 0.2X de SSC, 0.1 SDS a 55°C. Posteriormente las membranas se colocaron en Buffer 1 (10 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) y se lavaron por 5 min; finalmente, se colocaron en Buffer 2 (100 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 M NaCl, 5% reactivo bloqueador 'caseína') y se incubaron por 30 min.

En 50 ml de Buffer 2 se colocaron 3  $\mu$ l de anti-digoxigenina (1:15000) (Anti-Digoxiginin-AP Fab Fragments 'Roche, Mannheim, Alemania') y se sumergieron las membranas incubándose por 30 min (la solución Buffer 2 + anti-digoxigenina fue recuperada y almacenada a 4°C para su uso posterior), después del cual se lavaron tres veces durante 10 min en Buffer 2 y tres veces durante 10 min en Buffer 1. Finalmente las membranas se lavaron en Buffer 3 (100 mM tris-HCl, pH 9.5, 100 M NaCl) por 5 min.

Las membranas se colocaron sobre plástico y sobre ellas se vertieron 500  $\mu$ l de solución CSPD (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II solution, Roche, Mannheim, Alemania); posteriormente, se cubrieron con una capa de plástico y se retiró el exceso de CSPD hasta eliminar la totalidad de las burbujas. Posteriormente, las membranas se colocaron en carpetas de exposición exponiéndose por el frente y el envés con películas de revelado Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim, Alemania) en cuarto oscuro a temperatura ambiente por 12 h. El revelado se llevó a cabo colocando las películas en solución de revelado (Kodak®) por 30 s, posteriormente se sumergieron en solución fijadora (Kodak®) por 5 min y enjuagadas en agua destilada estéril por 3 min. Las películas se secaron al aire a temperatura ambiente.

### **3.2.12.7. Buffer de hibridación High SDS y lavado de membranas reutilizadas**

Para las sondas que mostraron inespecificidad se utilizó una solución de prehibridación con 7% de SDS, 50% de formamida, 5X de SSC, 50 mM de fosfato de

sodio pH 7, 0.1% de sarcosina, 2% reactivo bloqueador. El lavado de las membranas se realizó con SDS 0.1% a 95°C durante 30 min.

### **3.2.13. Extracción de Proteínas**

La proteína total soluble se extrajo de homogenizados de hoja. Se utilizaron 100 mg de hoja de tabaco congelada en nitrógeno líquido en un mortero, añadiéndole 500  $\mu$ l de Buffer A (50 mM N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanesulfónico (HEPES) KOH (pH7.5), 10 mM KAc, 5 mM MgAc, 1 mM ácido etilenediaminatetraacetato (EDTA) pH 8, 10 mM ditioneitol (DTT) y 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (disuelto en etanol absoluto) preparando el DTT y el PMSF justo antes de su uso). Se agitaron en un vórtex por 20 s y posteriormente se colocaron en hielo por 10 min, después del cual se centrifugaron dos veces por 5 min a 4 °C; el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

### **3.2.14. Detección de Actividad Hidrolítica en Solución Empleando Sustratos**

#### **Comerciales**

#### **3.2.14.1. Actividad enzimática de pectin liasa**

La actividad de pectin liasa se midió por el método del ácido 5-dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959), cuantificando el incremento de grupos reducidos, expresados como unidades de ácido galacturónico que se liberó después de la incubación con 0.1 ml of 1% pectina (*Sigma-Aldrich*, Japón) in 100 mM de buffer citratos (pH 5) con 0.1 ml de extracto de proteína durante 1 h. Los ensayos fueron corridos a pH 5, 7

(buffer citrato:fosfatos) y pH 10 (buffer citrato:fosfato ajustado con NaOH) a 27, 45 y 60°C (Dosanjh y Hoondal, 1996; Wang *et al.*, 2014). Adicionalmente los ensayos fueron realizados comparativamente entre plantas jóvenes y maduras. La concentración de azúcares reducidos fue comparada con una curva de concentración por medición de absorbancia a 540 nm. Se utilizó pectinasa de *Aspergillus niger* como control positivo de (*Sigma-Aldrich*, Japón) bajo las mismas condiciones del ensayo. Una unidad internacional (UI) de actividad de pectina liasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mol de azúcar reductor (ácido galacturónico) por minuto bajo condiciones de ensayo estándar. La actividad enzimática se expresó como unidades por ml (U/ml) (Beg *et al.*, 2000).

#### **3.2.14.2. Actividad enzimática de $\beta$ -glucosidasa**

La actividad de  $\beta$ -Glucosidasa se estimó por la liberación de *p*-nitrofenol liberado del sustrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) (Jin *et al.*, 2011). Una mezcla de ensayo de 100  $\mu$ g de proteína total soluble extraída de una muestra de hoja con 4 mM pNPG (*Sigma-Aldrich*, Japón) en 0,5 ml de 100 mM de buffer de citrato (pH 5), se incubó a 50°C durante 10 min. El ensayo se corrió a pH 3.5, 5 y 7 a 40, 50 y 65°C por 10 min (Berghem y Pettersson, 1973); la reacción se detuvo por la adición de 1 mL de 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; el control contenía todos los reactivos excepto la enzima. Adicionalmente, el ensayo se realizó comparativamente entre plantas jóvenes y maduras. Además, se utilizó un control positivo de celulasa obtenido de *Aspergillus niger* (*Sigma-Aldrich*, Japón). La liberación enzimática de nitrofenol se determinó espectrofotométricamente inmediatamente a 405 nm. La curva estándar de *p*-

nitrofenol se preparó usando 1 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La actividad enzimática se expresó en unidades por mg de PTS (U/mg), donde una unidad (U) de pNPG fue definida como 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol liberado por minuto bajo las condiciones del ensayo.

#### **3.2.14.3. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa**

La actividad de MnP se monitoreó con rojo fenol como sustrato (Glenn y Gold, 1983; Rajan *et al.*, 2010). Un volumen final de 1 ml de mezcla de reacción contenía 20 mM de acetato de sodio-buffer ácido acético pH 4.5, 6 y 8 ajustado con NaOH, lactato 25 mM, 0.1 mM  $\text{MnSO}_4$ , 0.5 mg de BSA, 0.5 mg de rojo de fenol, 0.1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 0.1 ml de solución de enzima, la reacción se incubó a 30, 50 y 65°C. Los ensayos fueron realizados en extractos de plantas jóvenes y maduras. La reacción se detuvo después de 10 min de incubación con 100  $\mu\text{L}$  de NaOH al 10. La absorbancia se midió a 610 nm y la actividad se expresó como U/mg con un coeficiente de extinción molar del fenol rojo oxidado de  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Rajan *et al.*, 2010). Una UI es la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{M}$  de rojo fenol oxidado  $\text{ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$  bajo las condiciones de ensayo.

#### **3.2.14.4. Actividad enzimática de celulasas**

La actividad de celulasa total se estimó mediante el método de DNS descrito por Miller (1959) para la cuantificación de azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC), expresados como unidades de glucosa. La mezcla de reacción se preparó con 100  $\mu\text{l}$  de carboximetilcelulosa (*Sigma-Aldrich*,



Japón) al 1% en buffer de citratos 100 mM y 100  $\mu\text{l}$  de extracto crudo de proteína. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h; posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de reactivo DNS y se colocó por 5 min a 90°C, seguido de 5 min en hielo. Finalmente se adicionaron 900  $\mu\text{l}$  de agua y se leyó a 540 nm con un espectrofotómetro (Bio-Rad, Múnich, Alemania), utilizando como blanco la mezcla de reacción sin la enzima. El ensayo se realizó a diferentes temperaturas (40, 65 y 100 °C) y distintos valores de pH (pH 4, 5 y 7) con el objetivo de analizar la estabilidad de la celulasa frente a estos factores. Adicionalmente, el ensayo se corrió comparativamente entre plantas jóvenes y maduras.

La concentración de azúcares reducidos presentes en la reacción se comparó con una curva de concentración de BSA y se midió a 540 nm. Se utilizó un control positivo de celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Japón) bajo las mismas condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresó como unidades por mg de PTS (U/mg), donde una unidad (U) de celulasa se definió como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática se obtuvo con la siguiente relación:

$$U/ml = \frac{Conc * FD}{t}$$

Donde *Conc* corresponde a la concentración de glucosa producida (expresada en  $\mu\text{mol/ml}$ ), *FD* al factor de dilución y *t* al tiempo de incubación en min.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Diseño de las Secuencias de los Genes *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl-1*, *CeIA-B*

Las secuencias de los genes *PeIA* (GenBank: AB513441), *MnP-2* (GenBank: U10306), *Bgl-1* (GenBank: AJ132386) y *CeIA-CeIB* (GenBank: U93354) fueron diseñadas *in silico* utilizando el programa Serial Cloner 2.6.1.soft para el análisis de las secuencias. Las secuencias obtenidas fueron las regiones codificantes para cada gen (gen *PeIA*: 804 pb, el gen *MnP-2*: 1115 pb, gen *Bgl-1*: 2595 pb, gen *CeIA*: de 800 pb y gen *CeIB*: 823 pb). Se realizaron mutaciones puntuales silenciosas para eliminar sitios de restricción no deseados en las secuencias; en el gen *PeIA* se eliminó el sitio *XbaI* en el 1216 pb perteneciente a la región 3'UTR, en el gen *Bgl 1* se eliminó el sitio *NheI* en el 1611 pb y en el 2166 pb de la región intergénica del gen de interés; asimismo, en el gen *CeIA* se eliminó el sitio *HindIII* en el 381 pb y en el 1284 pb del gen *CeIB*. El gen *PeIA* de 804 pb se diseñó flanqueado por una secuencia 5'UTR de 220 pb en la que se incluyeron la región promotora del gen *rrn16S* (P), la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y la secuencia líder del gen *rbcL* (LS); asimismo, se incluyó una región 3'UTR de 223 pb con la región terminadora del gen *rbcL* (T). La secuencia codificante del gen *PeIA* se flanqueó por secuencias de reconocimiento para enzimas *NheI/XbaI* y el casete completo fue flanqueado por secuencias de reconocimiento

para enzimas *5'EcoRI* y *3'HindIII* (*EcoRI-Prrn16S*, SD, LS *rbcL-PelA-TrbcL-HindIII*); este casete sirvió como templatado para la construcción de los vectores de expresión usados en la transformación de plantas de tabaco (Figura 3). Los genes *PelA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA* y *CelB* se diseñaron para evaluar la expresión monocistrónica (Figura 3, 4, 5, 7, 8); no obstante, para analizar la expresión policistrónica de este tipo de genes se diseñó una secuencia dicistrónica con los genes *CelA-CelB*; en la secuencia, el gen *CelB* se diseñó con un codón de inicio (ATG) al principio de la secuencia (1 pb); además, 57 pb río arriba se le adicionó una secuencia Shine-Dalgarno (correspondiente a la región codificante del gen *CelA*) para eficientar su procesamiento (Drechsel y Bock, 2011). La secuencia codificante se flanqueó por los sitios *NheI/XbaI* para integrarse en las construcciones previamente diseñadas (Figura 6).

---

↓EcoRI ↓SacI **secuencia promotora** →  
 gaattcGagctcgctccccgcgctcgttcaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgtgagggggc  
 ↓**Secuencia líder** →  
 agggatggctatatttctgggagtcgagtagacaccttggtggttgtaaattottaattcatgagttgtagggag  
 ↓**Secuencia Shine-Dalgarno** → ↓NheI↓Gen pectin liasa *PeIA* →  
 ggatttatgtcaCcacaaacagagactaaagcaagtgttgattc**AAAgctagcatgacatccgcgacacgaccgcacccc**  
 acggcgcgactgacgggcacgctgccaccctcggcctcctcgttggcatgatcctgacgaccgcggcaccgtccgcgaggccaccctggccgaccccc  
 acggcagtcagggcgtctctccacatctccgtgtcggcaccaaggactacggcatgaagcctctacggcaccggcgacctgggctccggcagccaggac  
 gaggaccagggcccgatcctgaagctgtccgacggcgggtcctgaagaactgatcatcggcggccggccgacggcatcactgagggctcctgca  
 cctgcagaactgtggtgggaggacgtcggcgggacgcccactcaagggcaagtctcggggcggtgtacaccgtcagcggcggcggaagga  
 ggccagtacaaggtctccagttcaacggcggggcacgctgaactgtccaactcgcggtccagaactcggcaccttctccgctcctcggcaactgctcc  
 tcgagtaacgggacgatcaactcaactcctcagaggtgacctggaagggcggcgtatcggcggcatcaaccaactcggcgaccaggcgacctgc  
 gcaacatcacgatcgtcggcgacagcaagaagatcgtcggcgaagtacatcggcaacaacaccggc  
 ↓XbaI ↓ **Región 3'UTR** →  
 aaggagcccggcAgcaacggctccggccccgacggcacgtactgcaagtacagctcgtccgacatcacctaccgtagtctagaagacattagcagataaa  
 ttgacaggaataaagaaggataaggagaaagaactcaagtaattatccttctcttaattgaattgcaattaaactcggcccaatctttacta  
**Mutación puntual 'Uracilo'→'Guanina'** ↓  
 aaaggattgagccgaatacaacaagattctattgcataatatttgactaagtatatacttacctagatatacaagatttgaaatacaaaatGtag  
 ↓HindIII  
 aagctt

---

**Figura 3.** Secuencia del vector pES4. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete se construyó colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb (*Prrn16S*, SD, LS *rbcL-Pel A-TrbcL*).





---

↓ ↓ ↓  
**EcoRI SacI** secuencia promotora →  
 gaattcGagctcgcgtccccgcgctcgttcaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgtgagggggc  
 ↓ **Secuencia líder** →  
 agggatggctatatatttctgggagtcgagtagaccttgttgttggaaattcttaattcatgagttgttagggag  
 ↓ **Secuencia Shine-Dalgarno** → ↓ **NheI** ↓ **Scal** ↓ **Gen CelA** →  
 ggatttatgtcaCcacaaacagagactaaagcaagtgttggattcAAAgctagcagtagctATGgttgaactgaccg  
 ↓ **Mutación**  
 caccgggaacggcagattttctgctggaatgacatgcccgtttcGatggagctgaatctgtggaacgtagaaaag  
 ↓ **Mutación**  
 atacacgggaacgggtggtgatgagattcgacgggtgaaagactcaccttcaacgggtgatggtgaGgatctttctgc  
 cagagagccagaaaggtacatccttggctatcctgagttttactacggatacaaaccctgggaaagacatgcagc  
 agaggggacaaagttacctctggtagtgtcttctgtggagtccttcacggctogaactttccttctgaaat  
 ↓ **Mutación** ↓ **Mutación**  
 agaccacatgcccctctcttccgctgaactttg**cGatgg**aaacctggctcacaagagaaaaataaccagggtcgaGgc  
 ttccatcgggagatgtggagatcatggtgtggttctatattcaacgaactcacaccgggtggaaagaaagtggggaga  
 gtacaccgtttcgttcgaacttaacgggagaacacaaacgtggaatctgggaactctggcacgccgaatggaactg  
 ggattatcttgccttccggctgaagaatcctgtgagaaaggggaggggtgagattcaacgtgaaggattttctcga  
 tgttgcaggagagtatctttcaaggtccacacggtgtgaaagattttgatgatctgtatctcaccgctctgggagat  
 cggaacccgaatttggagccctgaaacaaagagtgcccgttttggatggacggttcaataactt  
 ↓ **Clal** ↓ **SD** ↓ **STOP** ↓ ↓ **SmaI** ↓ **gen CelB**  
 ttcaatcgatatggaggtgaaaGGATGACCCGGGATGAggttggctcgtctcttttcttcttctgtggtttctgcctt  
 tcttttctcggcagaagtcgttctcacagacattggtgcaacagacattacgttcaaaggctttccggtgaccat  
 ggaactcaacttctggaacgtcaaactctacgaaggagaaacgtggctcaagtctgatggtgaaaaggt  
 ↓ **Mutación**  
 ccagttctacgCGAatatctacaacatcgttcttcaaaaccggacagctgggttcacggctatccagagata  
 ↓ **Mutación** ↓  
 tactacggctacaagccgtgggcggcacacacagcggaaacagagattcttccgggtgaaggtgaaa**Aatctt**cct  
 gacttttacgtaacccttgattattcaatctggtacgagaacgaccttccgatcaaccttgcaatggaaacgtgg  
 atcacaagaaagccagatcagacatctgtttcctctggagacgtcgagatcatggtctggttctacaac  
 ↓ **Mutación**  
 aacatcctgatgccagggtgggcagaaggtggatgaaCtcacaacaacgatcgagataaacggctctcctgtggaa  
 acaaaatgggacgtttactttgcgccctggggctgggattatctgccttcaggctcacaactcccatgaaagat  
 ggcaggggtgaagttcaacgtgaaggactttgtggaaaaagcagcgggaagttatcaaaaaacactcaacaaggggtg  
 gaaaacttcgatgagatgtacttctgcgtctgggagataggaacagagttcgggtgatccaaataacca  
 ↓ **XbaI** ↓ **Región 3'UTR** →  
 Ccgcggcaaaatttggatggaccttcaaggatttctctgttgaattggagaataa**atctagaagacattagcagataaat**  
 tagcagggaaataaagaaggataaggagaaagaactcaagtaattatccttcttaattgcaattaaactcggccaatctttacta  
 ↓ **Mutación puntual 'Uracilo → Guanina'**  
 aaaggattgagccgaatacaacaagattctattgcataatttgactaagtatatacttacctagatatacaagattgaaatacaaaatGtaga  
 ↓ **HindIII**  
 agctt

---

**Figura 6.** Secuencia del vector pHM4. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete se construyó colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb (*Prrn16S*, *SD*, *LS rbcL-CelA-CelB-TrbcL*).

---

↓ ↓ ↓  
**EcoRI SacI** **secuencia promotora** →  
 gaattcGagctcgcgtccccgcgcgtcgttcaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgtgagggggc  
 ↓ **Secuencia líder** →  
 agggatggctatatttctgggagtcgagtagaccttgttgttgtgaaattottaattcatgagttgtagggag  
 ↓ **Secuencia Shine-Dalgarno** → ↓ **NheI** ↓ **Scal** ↓ **Gen CelA** →  
 ggatttatgtcaCcacaaacagagactaaagcaagtgttgattcAAAgctagcagtagctATGgttgaactgaccg  
 ↓ **Mutación**  
 caccgggaacggcagattttcgctggaatgacatgcccgtttcGatggagctgaatctgtggaacgtagaaag  
  
 ↓ **Mutación**  
 atacacgggaacgggtggtgatgagattcgcgggtgaaagactcaccttcaacgggtgatggtgaGgatctttctgc  
 cagagagccagaaaggtacatccttggctatcctgagttttactacggatacaaacctgggaaagacatgcagc  
 agaggggacaaagttacctctggtagtgtcttctgtggagtccctcacggctgaactttccttcgaaat  
 ↓ **Mutación** ↓ **Mutación**  
 agaccacatgcctctcttccgctgaactttgGatggaaacctgggtcacaagagaaaaataaccagggtcgaGgc  
 ttccatcggagatgtggagatcatgggtgtggttctatttcaacgaactcacaccgggtggaaagaaagtgggaga  
 gtacaccgtttctgctcgaacttaacgggagaacacaaacgtggaatctgggaactctggcacgccgaatggaactg  
 ggattatcttgccttccggctgaagaatcctgtgagaaaggggaggggtgagattcaacgtgaaggattttctcga  
 tgttcaggagagtagtatcttcaaggtccacacgtgtgaaggattttgatgatctgtatttcaccgtctgggagat  
 cggaaaccgaatttgggaagccctgaaacaaagagtgcccggttttggatggacgttcaataactt  
 ↓ **ClaI** ↓ **SD** ↓ **STOP** ↓ ↓ **XbaI** ↓ **Región 3'UTR** →  
 ttcaatcgatatggaggtgaaaGGATGAatctagaagacattagcagataaattagcaggaataaagaaggataaggagaaga  
 actcaagtaattatcctcgttcttaattgaattgcaattaaactcggccaatctttactaaaggattgagccgaatacaacaagattctattg  
 ↓ **Mutación puntual 'Uracilo → Guanina'**  
 ↓ ↓ **HindIII**  
 catatatttgactaagtatatacttacctagatatacaagattgaaatacaaaatGtagaagctt

---

**Figura 7.** Secuencia del vector pHM5. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete se construyó colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb (*Prrn16S*, SD, LS *rbcL-CelA-TrbcL*).



---

↓ ↓ ↓  
**EcoRI SacI** **secuencia promotora** →  
 gaattcGagctcgcgtccccgcgcgttcgaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgtgagggggc  
 ↓ **Secuencia líder** →  
 agggatggctatatttctgggagtcgagtagaccttggtgtgtgaaattottaattcatgagttgtagggag  
 ↓ **Secuencia Shine-Dalgarno** → ↓ **NheI** ↓ **Scal** ↓ **Gen CelB** →  
 ggatttatgtcaCcacaaacagagactaaagcaagtgttgattcAAAgctagcagtagctATGACCCGGGATGAggt  
 tggctcgtctcttttctcttctgtggtttctgcctttcttttctcggcagaagtcggttctcacagacattggtgcaa  
 cagacattacggttcaaaggctttccggtgacctggaactcaacttctggaacgtcaaactctacgaaggagaaa  
 ↓ **Mutación**  
 cgtggctcaagttcogattggtgaaaagggtccagttctacgcgAatatctacaacatcgttcttcaaaaccggaca  
 gCtgggttcacggctatccagagatatactacggctacaagccgtgggcggcgcacaacagcggaaacagagattc  
 ↓ **Mutación**  
 ttcgggtgaaggtgaaaAatcttctgacttttacgtaacccttgattattcaatctggtagcagaacgcacctc  
 cgatcaaccttgcaatggaaacgtggatcacaagaaagccagatcagacatctgtttcctctggagacgtcgaga  
 ↓ **Mutación**  
 tcatggtctggttctacaacaacatcctgatgccaggtgggcagaaagggtggatgaaCtcacaacaacgatcgaga  
 taaacggctctcctgtggaaacaaaatgggacgtttactttgcgccctggggctgggattatctcgccttcaggc  
 tcacaactcccatgaaagatggcaggggtgaagttcaacgtgaaggactttgtggaaaaagcagcggaaagtatca  
 aaaaactcaacaaggggtgaaaacttccgatgagatgtacttctgcgtctgggagataggaacagagttcgggtg  
 atccaaataccaCgcggcaaaatttggatggaccttcaaggatttctctgttgaaattggagaataa**atctagaaga**  
 ↓ **XbaI** ↓ **Región 3'UTR** →  
 cattagcagataaattagcaggaaataaagaaggataaggagaaagaactcaagtaattatcctcgttcttaattgaattgcaattaaactcg  
  
 gcccaatctttactaaaaggattgagccgaatacaacaagattctattgcatatatttgactaagtatatacttacctagatatacaagattgaa  
 ↓ **Mutación puntual 'Uracilo → Guanina'**  
 ↓ ↓ **HindIII**  
 atacaaaatGtagaagctt

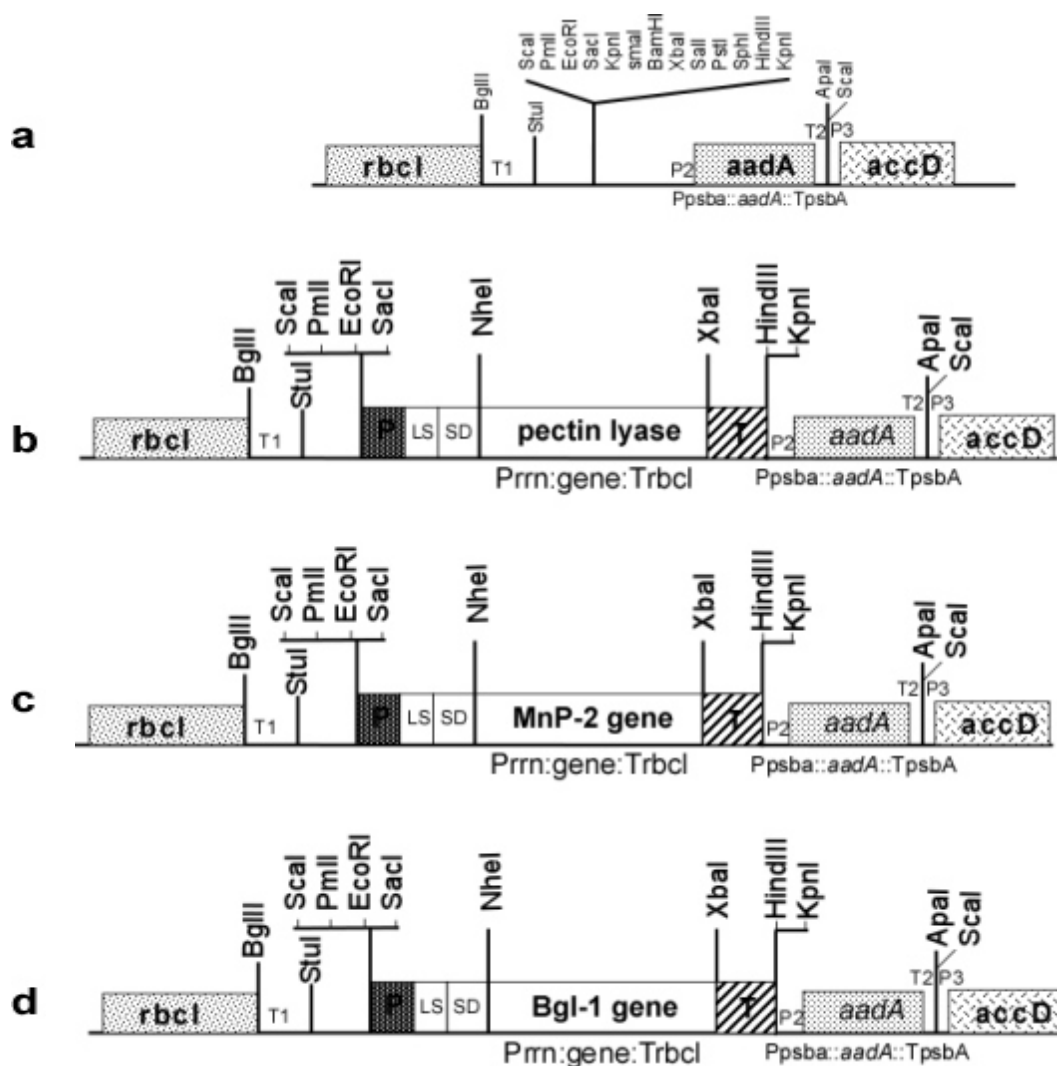
---

**Figura 8.** Secuencia del vector pHM6. Se muestran las regiones 5'3'UTR así como las secuencia líder y Shine-Dalgarno. El casete se construyó colocando el gen flanqueado por las regiones promotoras de 200pb y terminadoras de 223pb (*Prn16S*, SD, LS *rbcL-CelB-TrbcL*).

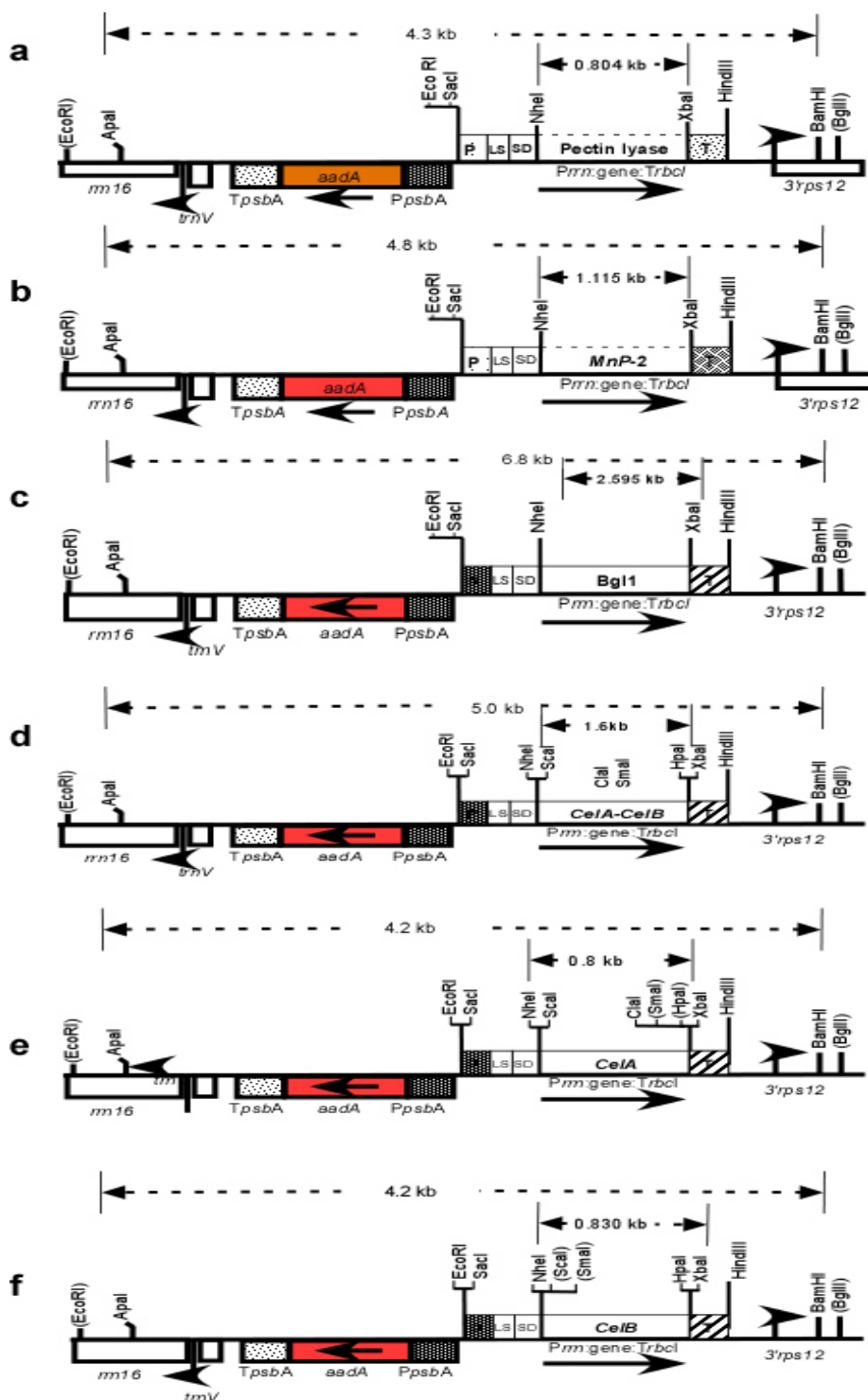
#### 4.2. Clonación de los Genes de Interés: Construcción de Vectores de Expresión Cloroplastídicos

Células calcio competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  se transformaron por choque térmico con los vectores pUC57 que contenían los genes de interés (*PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-B*) obteniéndose colonias transformantes a las 15 h. Las colonias obtenidas se caracterizaron para escindir las secuencias de los genes de interés. Las restricciones con *NheI/XbaI* para los genes *PeIA*, *MnP-2* y *Bgl1* mostraron fragmentos de 804 pb, 1115 pb y 2595 pb, respectivamente; lo mismo para los genes *CelA* y *CelB* (783 pb y 830 pb) caracterizados con *Scal/SmaI* y *SmaI/HpaI* respectivamente.

La secuencia sintética del gen *PeIA* sintetizada por GeneScript conteniendo las regiones Promotoras, Secuencia líder, Shine-Dalgarno y Región Terminadora se escindió del vector pUC57 y clonado en el vector pSS24 (Sinagawa-Garcia *et al.*, 2009) en el sitio múltiple de clonación para originar el vector pES1, posteriormente la secuencia codificante del gen *PeIA* se reemplazó por los genes *MnP-2* y *Bgl1* para originar los vectores pES2 y pES3, respectivamente (Figura 9). Los casetes completos (genes de interés y secuencias concomitantes) se recuperaron de los vectores pES1, pES2 y pES3 por restricción con enzimas *EcoRI/HindIII* y transferidos al vector pPRV111A en los mismos sitios del sitio múltiple de clonación de forma independiente para originar los vectores cloroplastídicos pES4 (*PeIA*), pES5 (*MnP-2*) y pES6 (*Bgl1*) (Figura 10).



**Figura 9.** Mapa de restricción de vectores de transformación de plástidos en el vector pSS24. a) vector pSS24 mostrando el sitio múltiple de clonación, y regiones *rbcL/accD* como sitio de recombinación homóloga. b) vector pES1 conteniendo el gen *PelA*, c) vector pES2 con el gen *MnP-2*, d) vector pES3 conteniendo el gen *Bgl1*; estos vectores cuentan con el gen *aadA* como gen marcador de selección. Los genes están bajo el promotor *rrn16S* y una secuencia terminadora del gen *rbcL*.



**Figura 10.** Mapa de restricción de vectores de transformación de plástidos. a) vector pES4 conteniendo el gen *PelA*, b) vector pES5 con el gen *MnP-2*, c) vector pES6 conteniendo el gen *Bgl1*, d) vector pHM4 conteniendo el dicistrón *CeIA-CeIB*, e) vector pHM5 conteniendo el gen *CeIA*, f) vector pHM6 conteniendo el gen *CeIB* para clonación en los sitios de recombinación homóloga *rrn16* y *3' rps12* en el genoma de cloroplasto; estos vectores cuentan con el gen *aadA* como gen marcador de selección. Los genes están bajo el promotor *rrn16S* y una secuencia terminadora del gen *rbcl*.

La construcción pES4 se utilizó como templete para nuevas construcciones; la secuencia codificante del gen *PeIA* se eliminó y reemplazó por la secuencia completa del dicistrón de celulasas (*CelA-CelB*) en los sitios *Nhe/XbaI* para obtener la construcción pHM4; a partir de esta construcción, la región codificante del gen *CelB* se eliminó de la secuencia de pHM4 por restricción con enzimas *SmaI/HpaI* y vuelto a religar para obtener la construcción pHM5 con el gen *CelA* de forma independiente (monocistrón) eliminándose los sitios *SmaI* y *HpaI* intergénicos por la religación del vector; igualmente, a partir del vector pHM4 el gen *CelA* se eliminó de la secuencia dicistrónica por restricción con enzimas *Clal/Scal* para obtener la construcción pHM6 que contiene el gen *CelB* como monocistrón donde los sitios *SmaI* y *Scal* se eliminaron (Figura 10 d, e, f). Los vectores pES4, pES5, pEs6, pHM4, pHM5 y pHM6 cuentan con secuencias de los genes *rrn16S/3'rps12* para la integración por recombinación homóloga en los sitios Repetidos Invertidos (IRA/IRB) del genoma de cloroplasto de tabaco. El gen *aadA* (*aminoglucósido 3'-adenililtransferasa*) se incluyó como gen marcador de selección. Los genes fueron clonados río abajo del gen *aadA* y flanqueado por las regiones 5'UTR del gen *rrn16S* (P) y 3'UTR del gen *rbcL* (T) para la estabilización del mRNA y maximizar la traducción de los genes de interés (Watson *et al.*, 2004). Ambos, promotor y terminador fueron sintéticos obtenidos de Kuroda y Maliga (2001). Asimismo, se incluyó una secuencia Shine-Dalgarno (SD) y una secuencia líder del gen *rbcL* (LS) en el extremo 5'UTR de la región codificante del gen mostrando un casete: *Prrn16S*, SD, LS *rbcL*, gen de interés, *TrbcL* (Figura 10).

### 4.3. Transformación de Cloroplastos

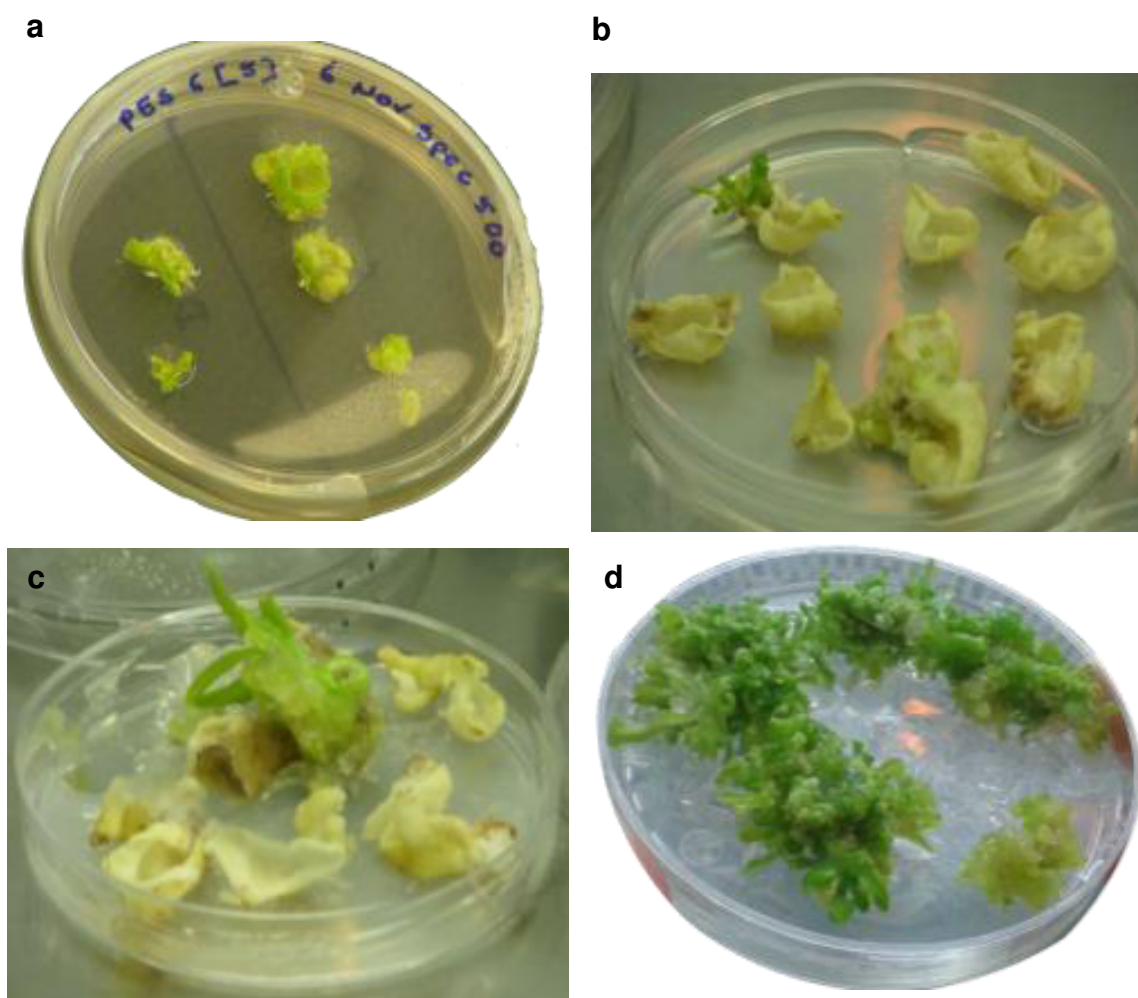
#### 4.3.1. Pureza de ADN Plasmídico

Se obtuvo ADN plasmídico de los vectores con una concentración  $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### 4.3.2. Bombardeo y Regeneración de Tejido Transformado

Las hojas bombardeadas no mostraron necrosis por daño mecánico, los explantes colocados en la primera ronda de selección se alargaron a la segunda semana y se mostraron cloróticos a partir de la tercera semana de selección; los explantes regenerados aparecieron a partir de la quinta semana en el medio suplementado con espectinomicina registrándose una eficiencia de transformación de 3.14% para los vectores pES4-pES5 y 2.85% para los vectores pES6, pHM4, pHM5 y pHM6 (Figura 11). Posteriormente, para eliminar las clonas mutantes de las transformantes se realizó una segunda ronda de selección obteniéndose una respuesta de los explantes a la segunda semana con tejido totalmente verde en la placa que contenía espectinomicina/estreptomicina, y desarrollo de plántulas en las cajas que únicamente contenían espectinomicina. Se obtuvieron cuatro plántulas regenerantes de 200 explantes bombardeados con el vector pES4 conteniendo el gen *PeIA* las cuales se registraron como NtpES4A, NtpES4B, NtpES4C, NtpES4D. Siete plántulas regenerantes de 150 explantes bombardeados se obtuvieron del bombardeo con el vector pES5 conteniendo el gen *MnP-2* las cuales se registraron como NtpES5A, NtpES5B, NtpES5C, NtpES5D, NtpES5E, NtpES5F, NtpES5G. A partir de 200 explantes bombardeados con el vector pES6 conteniendo el gen *Bgl1* se

obtuvieron cinco plántulas registradas como NtpES6A, NtpES6B, NtpES6C, pES6D y NtpES6E. Siete plántulas regenerantes de 180 explantes bombardeados se obtuvieron con el vector pHM4 conteniendo el dicistrón *Ce/A-Ce/B* registradas como NtpHM4A, NtpHM4B, NtpHM4C, NtpHM4D, NtpHM4E, NtpHM4F, NtpHM4G; asimismo, cuatro plántulas regenerantes de 200 explantes bombardeados se obtuvieron con el vector pHM5 y cinco plántulas regenerantes de 156 explantes bombardeados con el vector pHM6 las cuales se registraron como NtpHM5A, NtpHM5B, NtpHM5C, NtpHM5D y NtpHM5A, NtpHM5B, NtpHM5C y NtpHM6A, NtpHM6B, NtpHM6C, NtpHM6D, NtpHM6E, respectivamente.



**Figura 11.** Regeneración de plántulas de tabaco. *a)* explantes en expansión de primera selección de dos semanas de edad empezando el proceso de selección, *b,c)* explante regenerado de primera selección a las tres semanas mostrando resistencia a espectinomicina  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . *d)* explantes regenerados de segunda selección en medio RMOP suplementado con  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de espectinomicina.



Para lograr un estado homoplásmico de plantas transformantes, las hojas obtenidas de plantas de segunda selección se colocaron en nuevo medio selectivo RMOP suplementado con espectinomicina apareciendo tejido regenerado a partir de la segunda semana y un desarrollo completo de plántulas a partir de la quinta semana (Figura 11). Plántulas de tercera selección se colocaron en medio RM para su desarrollo normal abatiéndose un crecimiento de 8 cm en un periodo de cuatro semanas. Posteriormente las plantas con raíz abundante se colocaron en sustrato y colocadas a invernadero para su crecimiento y floración (Figura 12-14)



**Figura 12.** Producción de semillas de plantas transplastómicas de tabaco en invernadero. *a)* planta transplastómicas de siete semanas de edad en floración, *b)* flor, *c)* vainas con semillas de tabaco, *d)* planta de tipo silvestre en floración. Las plantas de todas las líneas transformadas no mostraron retrasos en el periodo de floración y/o producción de semillas; los fenotipos de las flores fueron normales.

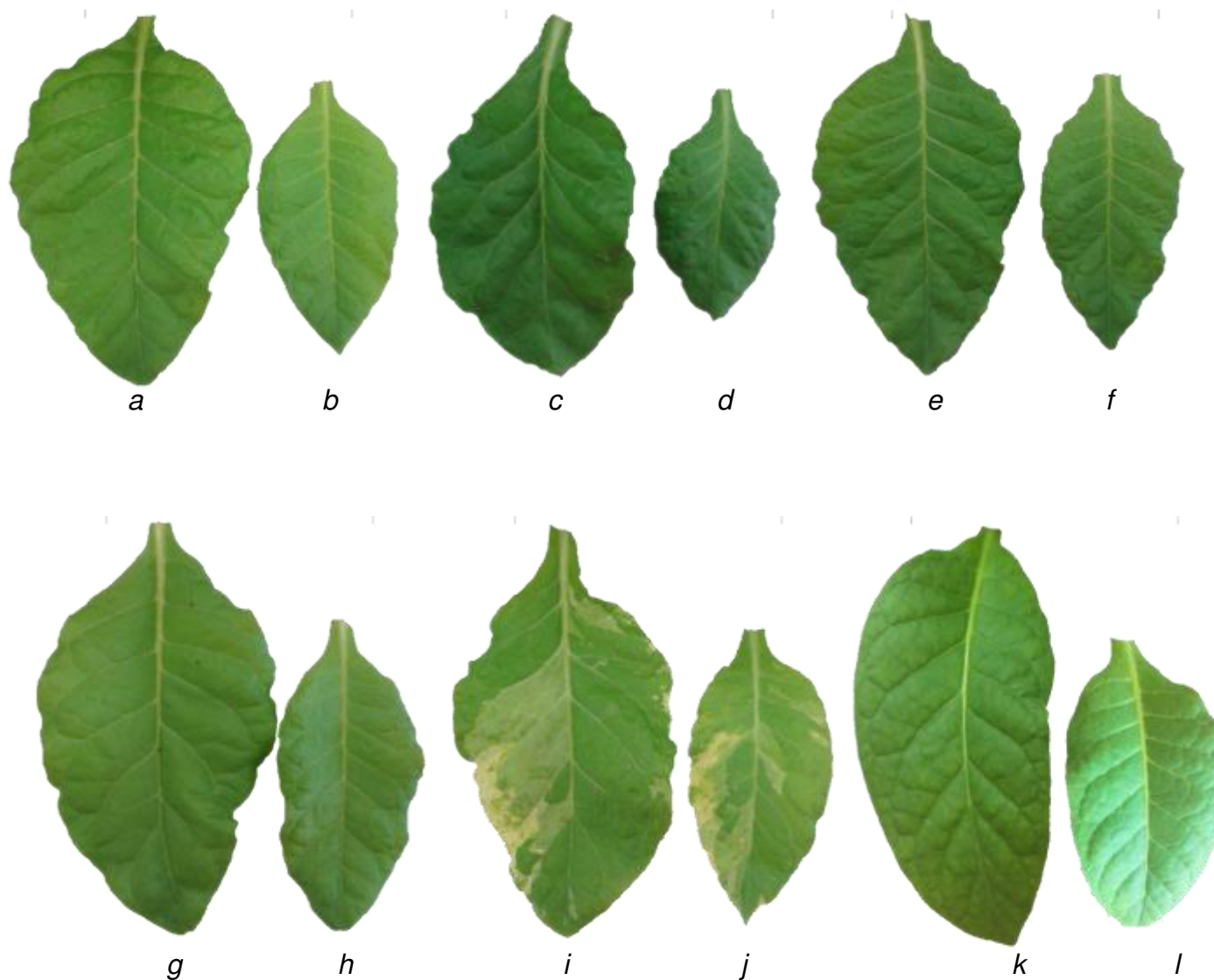
#### 4.4. Fenotipos de Plántulas de Tabaco Transformadas por Biobalística

##### 4.4.1. Condiciones *in vitro*

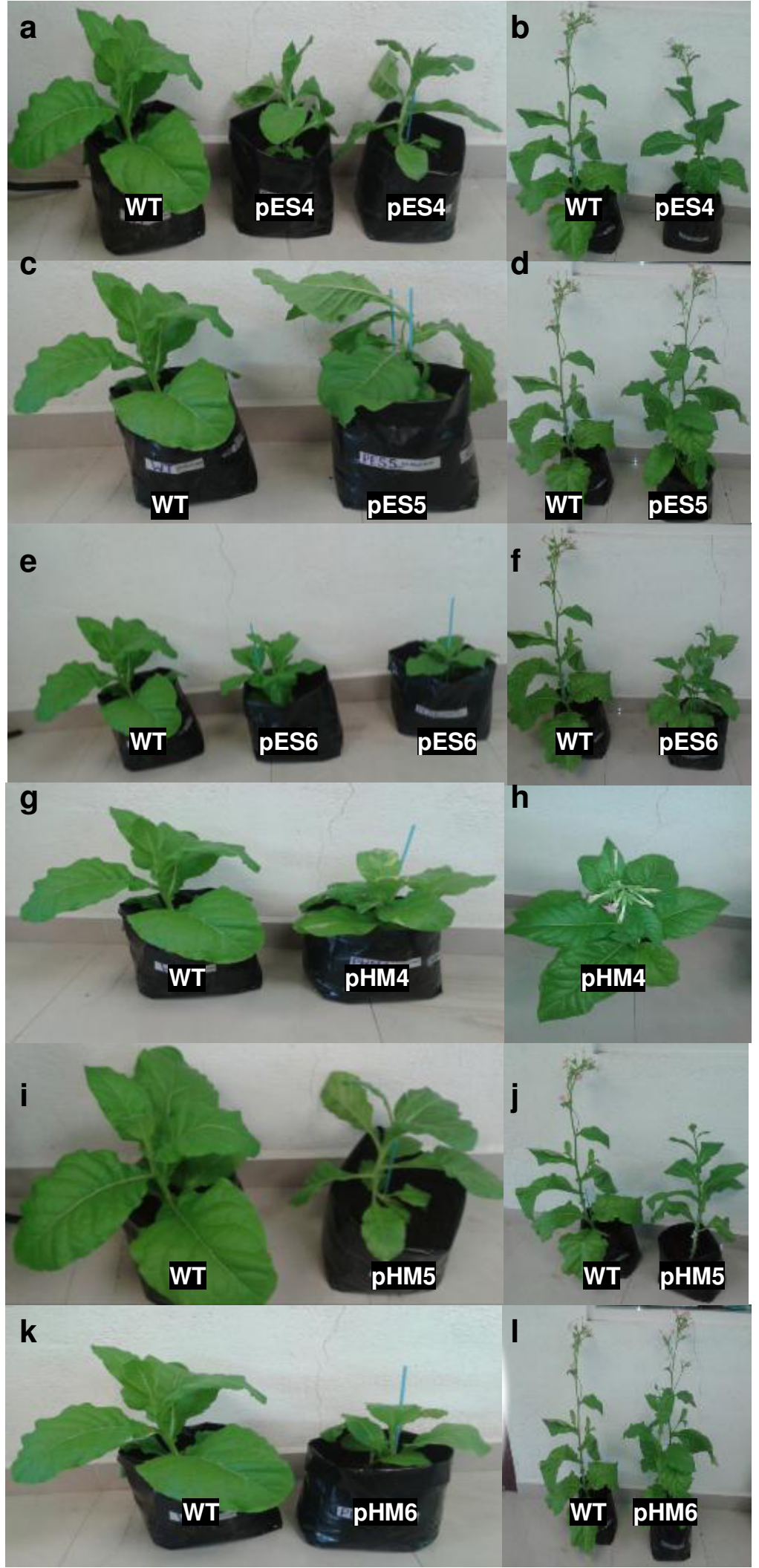
Las plantas en condiciones *in vitro* mostraron diferentes patrones de crecimiento, las plantas a las cuales se les insertó el gen *PeIA* mostraron un desarrollo más lento comparado con las plantas de tipo silvestre (WT) pero sin cambios morfológicos evidentes; por otro lado, las plantas a las cuales se les integró el gen de la manganeso peroxidasa (*MnP-2*) mostraron mayor crecimiento con internodos más largos pero con tallos delgados; asimismo, el contenido de biomasa fue menor comparado con las plantas no transformadas. Las plantas bombardeadas con el gen de  $\beta$ -glucosidasa mostraron mayor crecimiento, desarrollo y contenido de biomasa comparado con el de las plantas de tipo silvestre; plantas a las que se les integraron los genes *CeIA* y *CeIB* no mostraron cambios evidentes y su desarrollo fue equiparable con las plantas testigo; sin embargo, la integración del dicistrón (*CeIA-CeIB*) en los cloroplastos de las plantas de tabaco mostró fenotipos aberrantes con fenotipo variegado, las hojas mostraron manchas cloróticas en etapas tempranas de desarrollo que no desaparecieron en edad adulta cubriendo ~10% del total de la hoja; no obstante, esta línea no mostró alteraciones en el crecimiento y desarrollo (Figura 13,14 G,H).

#### 4.4.2. Fenotipos de Plantas Maduras en Invernadero

Las plantas desarrolladas en invernadero, al igual que en condiciones *in vitro* mostraron crecimientos diferentes; las plantas a las que se les integró el gen *PeIA* mostraron menor crecimiento a las plantas de tipo silvestre, con un retraso de siete días en el inicio de la floración; sin embargo, los fenotipos de las hojas y las flores fueron similares a las producidas por plantas de tipo silvestre; por otro lado, las plantas a las cuales se les integró el gen de la manganeso peroxidasa (*MnP-2*) mostraron internodos más largos y con tallos delgados; asimismo, el contenido de biomasa fue menor comparado con las plantas de tipo silvestre y sin problemas en la aparición del tiempo de la floración. Las plantas bombardeadas con el gen de  $\beta$ -glucosidasa mostraron mayor crecimiento en condiciones *in vitro*; sin embargo, bajo condiciones de invernadero tanto el desarrollo como el contenido de biomasa fue equiparable con plantas de tipo silvestre (Cuadro 1, 2) con flores normales; plantas a las que se les integraron los genes *CeIA* y *CeIB* mostraron fenotipos normales comparados con plantas de tipo silvestre tal como se mostró bajo condiciones *in vitro*; por otro lado, la integración del dicistrón (*CeIA-CeIB*) siguió mostrando fenotipos con variegación más abundantes aunque sin problemas en la producción de flores (Figura 12, 13, 14G,H).



**Figura 13.** Hojas de plantas de tabaco aclimatadas en invernadero de tres semanas de edad (joven) y dos meses de edad (madura). *a,b*) hojas de plantas wild type, *a*), madura *b*) joven; *c,d*) hojas de plantas de línea *NtpES4/Pe1A*, *c*) madura *d*) joven; *e,f*) hojas de plantas de línea *NtpES5/MnP-2*, *e*) madura *f*) joven; *g,h*) hojas de plantas de línea *NtpES5/Bgl1*, *g*) madura *h*) joven; *i,j*) hojas de plantas de línea *NtpHM4/Ce1A-Ce1B*, *i*) madura *j*) joven; *k,l*) hojas de plantas de línea *NtpHM5/Ce1A*, *k*) madura *l*) joven. Los fenotipos fueron normales en cinco líneas de plantas transplásticas (*NtpES4*, *NtpES5*, *NtpES6*, *NtpHM5* y *NtpHM6*); sin embargo, en la línea *NtpHM4* las hojas mostraron fenotipo variegado en ~30% de las hojas en etapa juvenil y 10% de la hoja en etapa adulta.



**Figura 14.** Plantas de tabaco aclimatadas en invernadero. *a,b)* plantas de la línea NtpES4, *c,d)* NtpES5, *e,f)* NtpES6, *g,h)* NtpHM4, *i,j)* NtpHM5, *k,l)* NtpHM6. *a,c,e,g,i,k)* plantas jóvenes de tres semanas de edad, *b,d,f,h,j,l)* plantas maduras de siete semanas de edad en floración, WT: planta no transformada.

#### **4.5. Producción de Semillas de Plantas Transplastómicas**

Se obtuvieron semillas de todas las líneas transformadas las cuales no mostraron problemas de germinación en Peat moss<sup>®</sup> ni bajo condiciones *in vitro* en medio RM (germinación a lo siete días similar a semillas de tipo silvestre); además las semillas mostraron un fenotipo normal comparado con las semillas de plantas no transformadas evidenciando que la expresión de los genes no altero rutas de producción de embriones; asimismo, las semillas mostraron resistencia a espectinomicina. Plántulas de todas las líneas transformadas mostraron fragmentos de similar tamaño a los genes de interés, mostrando segregación de genes; esto indica que la resistencia a espectinomicina puede ser una señal factible de la determinación de transformantes.

#### **4.6. Análisis Molecular de Plantas Transplastómicas**

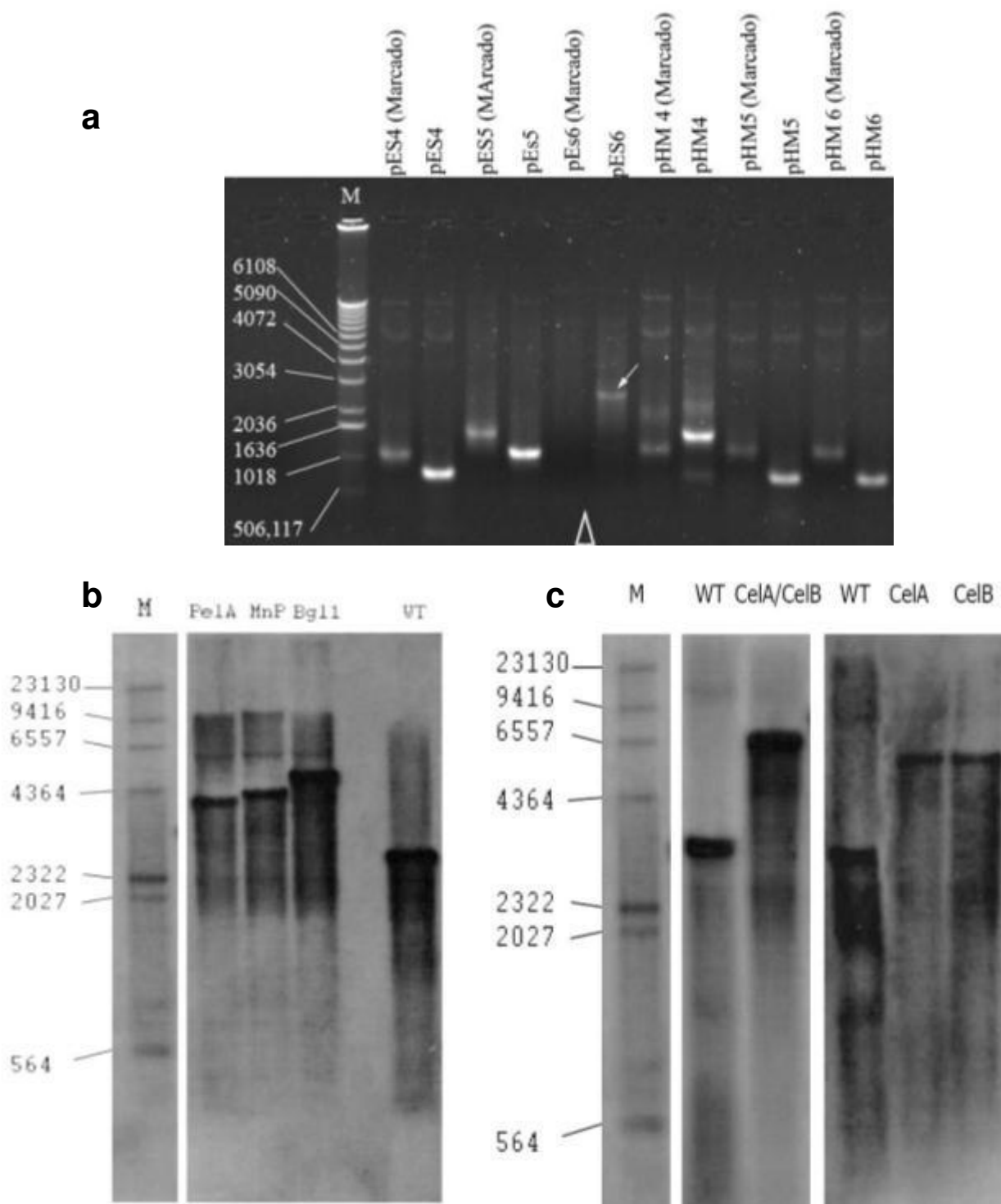
##### **4.6.1. Análisis de Integración de ADN en las Plantas Transplastómicas: PCR y Southern-blot**

De tejido foliar de plantas de tercera selección se realizó un análisis de PCR a partir de ADN total de la planta utilizando primers específicos para cada gen de interés; el análisis mostró amplificación de fragmentos acorde al tamaño de los genes de interés: gen *PeIA*: 804 pb, gen *Mnp-2*: 1115 pb, gen *Bgl1*: 2595 pb, gen *CelA*: de 786 pb, gen *CelB*: 837 pb, *CelA-CelB*: 1617 pb confirmando la integración de los genes en las plantas (Figura 15 a). Para evaluar la integración en las regiones de repetidos invertidos y evaluar la homoplasmicidad de las plantas se realizó un

análisis de Southern-blot. Los resultados mostraron una integración eficiente dentro de las regiones de repetidos invertidos al hibridar con la región *rnr16S* del genoma de cloroplasto. Las plantas no transformadas mostraron un fragmento de 3.0 kilobases (kb), mientras que los genes de interés mostraron fragmentos diferentes: pES4 (*PeIA*) 4.3 kb, pES5 (*Mnp-2*) 4.8 kb, pES6 (*Bgl-1*) 6.18 kb, pHM4 (*CeIA-CeIB*) 5.0 kb, pHM5 (*CeIA*) 4.2 kb y pHM6 *CeIB*) 4.2 kb acordes a los fragmentos esperados. La sonda en las líneas transformadas hibridaron con un fragmento único de peso esperado, la ausencia de bandas de 3.0 kb en las líneas transformadas confirma que todos los cloroplastos de las plantas se encuentran transformados eficientemente y que las rondas de selección para generar homoplasmicidad fueron exitosas (Figura 15 b, c).

#### **4.6.2. Análisis de la Expresión de ARN Mensajeros por Northern blot**

ARN total de plantas transformadas y de tipo silvestre de etapa adulta de invernadero fue obtenido para realizar análisis de expresión de ARN mensajero. Se utilizaron sondas específicas para cada una de las líneas transformadas para amplificar los ARN mensajeros de los genes de interés. El análisis de Northern-blot mostró fragmentos hibridados del tamaño esperado: para el gen *PeIA* se observó una banda de 804 nt correspondiente al mensajero esperado; asimismo, para el gen *MnP-2*: 1115 nt, del gen *Bgl-1*: 2595 nt, gen *CeIA*: 786 nt y gen *CeIB*: 823 nt. La hibridación con las sondas con esos fragmentos proporciona información viable de que los genes son expresados en forma monocistronica de forma eficiente, y que los ARN mensajeros son estables en ambiente cloroplastídico (Figura 16).

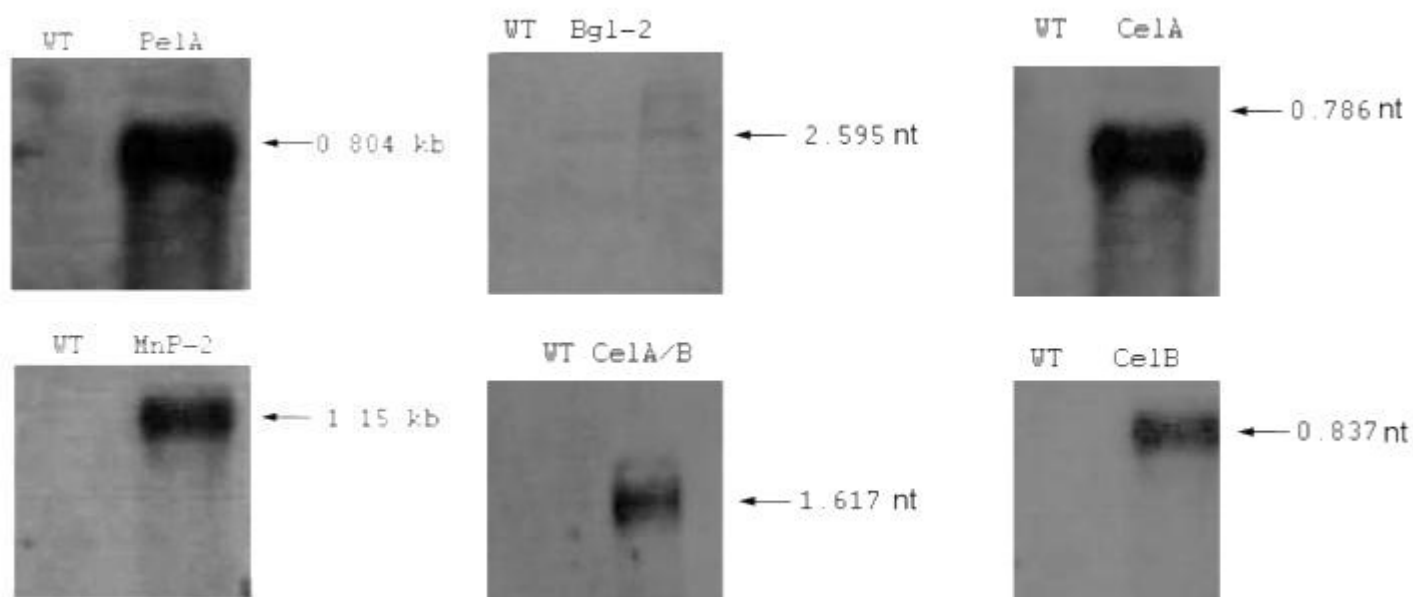


**Figura 15.** Análisis moleculares de plantas transplastómicas. *a*) análisis de PCR de seis líneas transplastómicas (NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5, NtpHM6) marcadas con digoxigenina, la integración de dig-11-dUTP se observa por diferencia de peso molecular. Las flechas indican los fragmentos obtenidos. *b*, *c*) análisis de Southern blot de las líneas NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5 y NtpHM6 (*PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA*, *CelB* respectivamente) mostrando la integración en la región *rr16/3'rps12* de la región IR del genoma del cloroplasto.



#### 4.6.3. Análisis de la Expresión de ARN Mensajero de pHM4 (*CelA-CelB*) por Northern blot

Los genes de celulasas *CelA* y *CelB* se expresaron en una sola secuencia en el vector pHM4 para evaluar su expresión dicistrónica. Para poder viabilizar la expresión de este operón, los genes se construyeron con una secuencia Shine-Dalgarno y un codón ATG al inicio de cada gen. El análisis de Northern-blot mostró un solo fragmento de 1617 nt confirmando que los genes se expresaron como un solo ARNm.

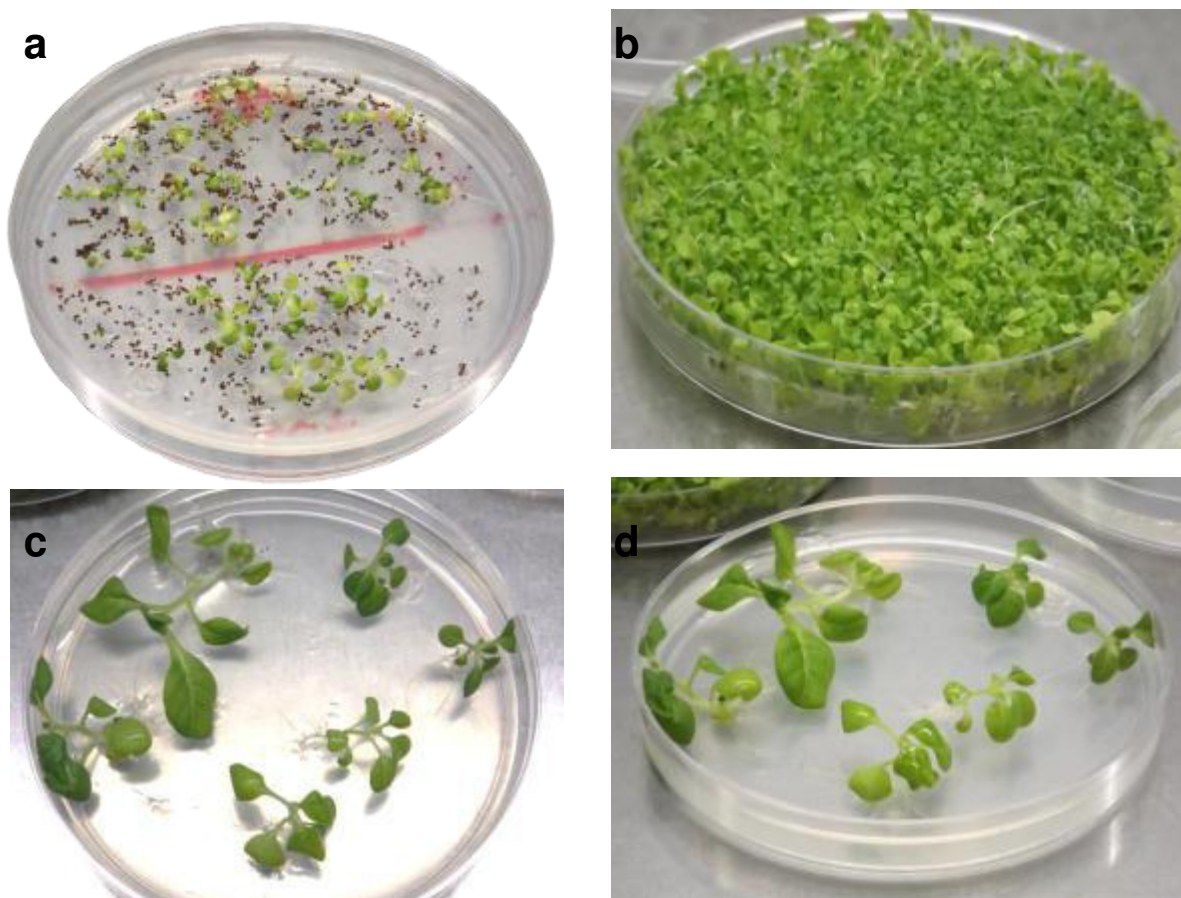


**Figura 16.** Análisis Northern blot de las seis líneas transplastómicas (NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM4, NtpHM5, NtpHM6) modificadas con los genes *PelA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA*, *CelB*. Se muestran los transcritos primarios generados por los genes de interés. Imágenes obtenidas por marcación con digoxigenina (dig-11-dUTP).

#### 4.6.4. Segregación de Genes de Interés

Las semillas obtenidas de plantas transplastómicas, confirmadas por análisis moleculares (PCR, Southern-blot y Northern-blot) se hicieron germinar en medio RMOP suplementado con espectinomicina mostrando resistencia al antibiótico (Figura 17); asimismo, las plantas germinadas se sometieron a análisis de integración por PCR, mostrando bandas con patrones de bandeo perteneciente a los genes de interés confirmando la segregación de los genes tanto por pruebas de resistencia a antibióticos como por amplificación de las secuencias de los genes de interés; además, proporcionaron de la integración estable de los transgenes.

Los fenotipos de plántulas de las líneas NtpES4, NtpES5, NtpES6, NtpHM5, NtpHM6 obtenidas de semillas fueron similares a plantas de tipo silvestre tal como la línea F<sub>1</sub>. Plántulas de la línea NtpHM4 mostraron un fenotipo normal, con restitución de la coloración de las hojas, contrario a lo mostrado por las líneas F<sub>1</sub> con fenotipo variegado.



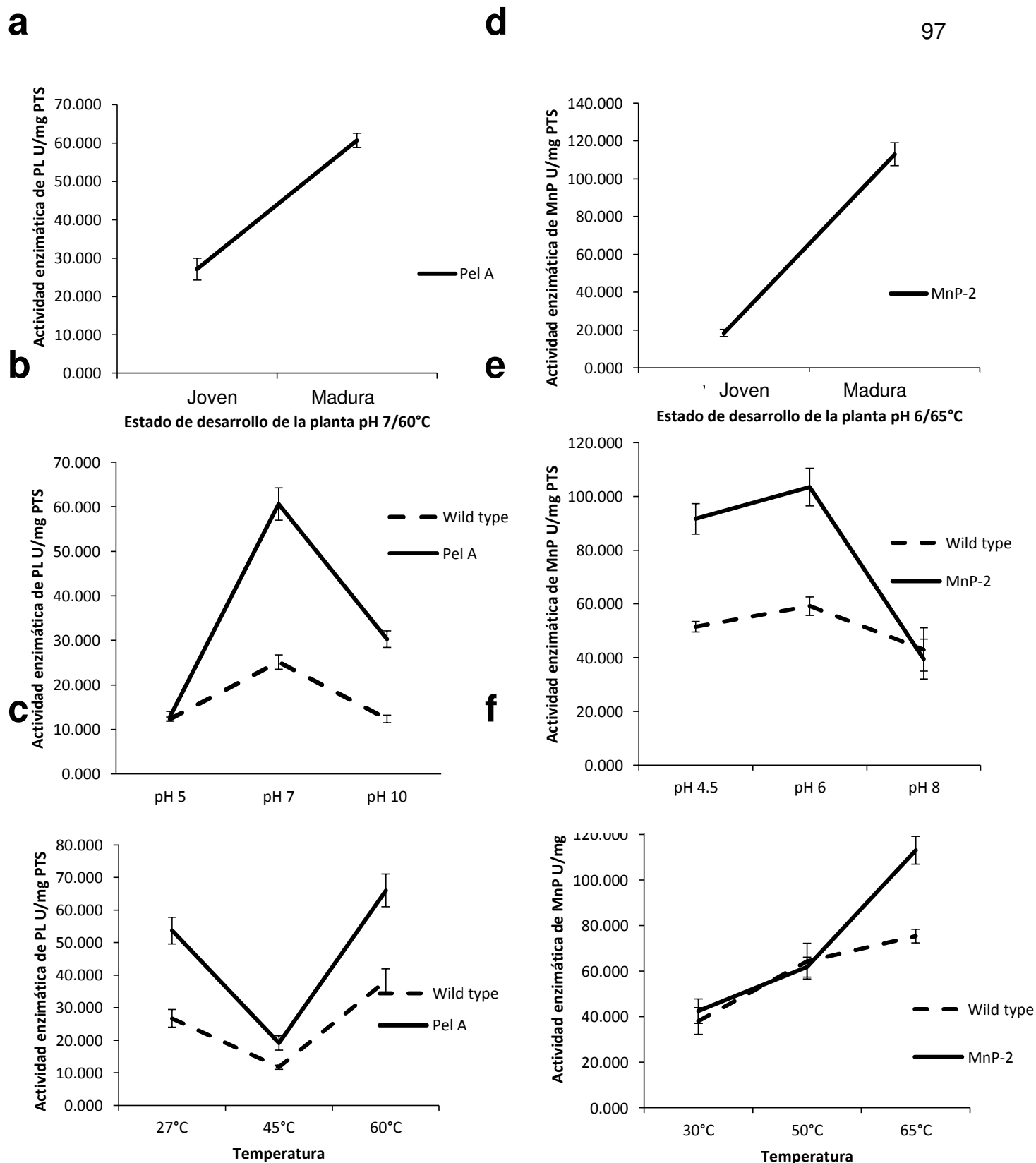
**Figura 17.** Obtención de plántulas de tabaco a partir de semillas de plantas transplastómicas. Las semillas no mostraron problemas en germinación y/o retardo del mismo. Las plántulas mostraron un fenotipo similar a las plantas no transplastómicas, a) semillas de siete días en medio de cultivo RM suplementado con espectinomicina  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , b) plántulas de tabaco de dos semanas de edad, c) plántulas de tabaco de cuatro semanas de edad colocadas en medio RM sin antibiótico para su desarrollo, d) plántulas de tabaco de cinco semanas mostrando desarrollo normal.

## 4.7. Análisis Enzimáticos

### 4.7.1. Actividad de Pectin Liasa

Para determinar si las proteínas obtenidas a partir de los ARN mensajeros de los genes de interés fueron viables, extractos crudos de proteína total se sometieron a análisis de actividad enzimática bajo diferentes condiciones. Tres plantas jóvenes (tres semanas de edad) y tres plantas maduras (siete semanas de edad) de la línea pES4 se utilizaron (NtpES4A, NtpES4B, NtpES4C). La actividad enzimática fue 60% mayor en plantas adultas con respecto a plantas jóvenes por lo que plantas maduras se utilizaron para realizar los análisis enzimáticos (Figura 18 a). Pectina comercial de cáscara de naranja se utilizó como sustrato. La actividad enzimática de *PeIA* de plantas transplásticas fue superior ( $19.72 \pm 2.3$  U/mg) que la mostrada por una pectinasa comercial de *A. niger*.

La actividad enzimática de *PeIA* mostró que la actividad de la enzima recombinante es alta a pH neutral ( $60.6 \pm 3.6$  U/mg) decreciendo a pH alcalinos (pH 10) a  $30.29 \pm 1.85$  U/mg. Sin embargo, el pH ligeramente ácido no es favorable con un alto decremento en la actividad a  $12.99 \pm 1.0$  U/mg (Figura 18 b). Por otro lado, la temperatura también jugó un papel importante en el desarrollo de actividad con más actividad a 60°C con  $66.011 \pm 4.9$  U/mg decreciendo a  $53.65 \pm 4.1$  U/mg a 27°C pero a 45°C tuvo menor actividad decreciendo a  $19.14 \pm 2.1$  U/mg, una diferencia de 46.86 U/mg con respecto a la temperatura óptima (Figura 18 c).



**Figura 18.** Análisis enzimático de plantas transplásticas de tabaco modificadas con los genes *PelA* y *MnP-2*, (a, d) actividad enzimática de *PelA* y *MnP-2* en hojas jóvenes de tres semanas de edad y maduras de siete semanas de edad. (b, c) actividad enzimática de *PelA* de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura. (d, e) actividad enzimática de *MnP-2* de plantas maduras bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. El análisis muestra mayor actividad en plantas transplásticas comparadas con plantas no transformadas en todas las condiciones. Los resultados se muestran como un promedio de tres plantas (NtpES4A, B, C y NtpES5A, B, C).

#### 4.7.2. Actividad de Manganese Peroxidasa

Para analizar la actividad enzimática de la línea pES5 modificada con el gen *MnP-2*, tres plantas jóvenes y tres plantas adultas se utilizaron (NtpES5A, NtpES5B, NtpES5C), y la actividad de MnP se midió por monitoreo por la degradación de rojo fenol. La actividad enzimática fue 80% mayor en plantas adultas con respecto a plantas jóvenes por lo que plantas maduras se utilizaron para realizar los análisis enzimáticos (Figura 18 d); asimismo, la actividad de MnP se incrementó de pH ácidos (pH 4.5) ( $91.65 \pm 5.6$  U/mg) a pH 6 ( $103.47 \pm 7.0$  U/mg), pero mostraron actividad no favorable a pH alcalino (pH 8), decreciendo a  $39.51 \pm 7.3$  U/mg (Figura 18 e). La temperatura también tuvo una influencia en la actividad enzimática, mostrando un incremento de actividad conforme aumenta la temperatura: de  $42.40 \pm 5.4$  U/mg a 30°C hasta  $113.0 \pm 6.1$  U/mg a 65°C (Figura 18 f).

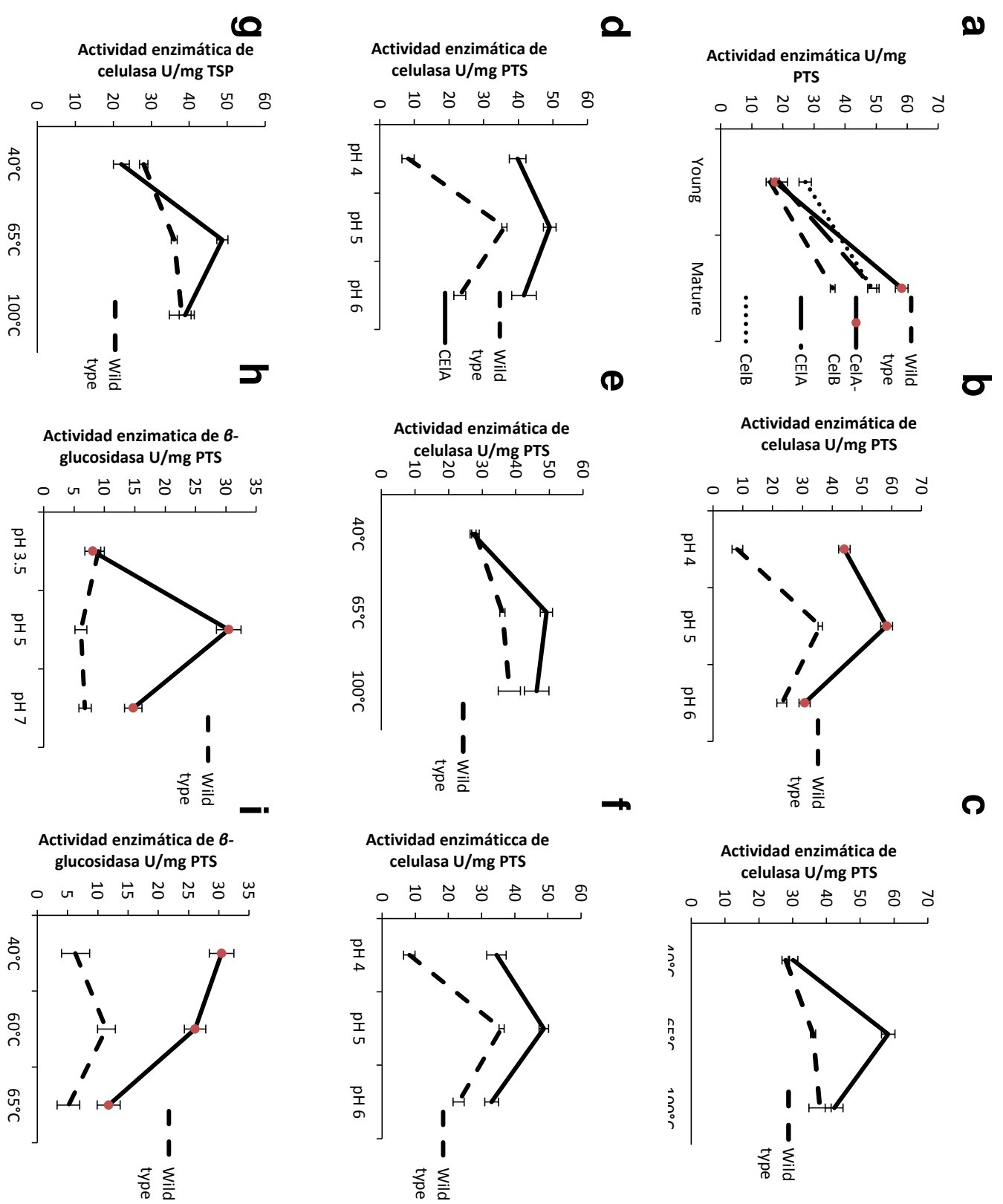
#### 4.7.3. Actividad de Celulasas *Bgl1*, *CelA* y *CelB*

Para el análisis enzimático de celulasas, se utilizaron tres plantas de la línea pES6 (NtpES6A, NtpES6B, NtpES6C), tres plantas de la línea pHM4 (NtpHM4A, NtpHM4B, NtpHM4C), tres plantas de la línea pHM5 (NtpHM5A, NtpHM5B, NtpHM5C) y tres plantas de la línea pHM6 (NtpHM6A, NtpHM6B, NtpHM6C); los resultados se mostraron como un promedio de cada línea transplastómica. Extractos de proteínas se obtuvieron de tres plantas jóvenes y tres plantas maduras transformadas con los genes *Bgl1*, *CelA*, *CelB* y *CelA-CelB*. La actividad de  $\beta$ -glucosidasa se midió usando pNPG como sustrato; además, la actividad de celulasa

fue medida utilizando CMC como sustrato. En todas las líneas transplastómicas, la actividad enzimática fue ~50% mayor en plantas maduras que en plantas jóvenes (Figura 19 a); debido a esto, plantas maduras se utilizaron para los análisis enzimáticos. La actividad enzimática de celulasas de plantas transplastómicas fueron  $22.18 \pm 1.98$  U/mg superior con respecto a una celulasa comercial de *A. niger*. La actividad enzimática del dicistrón *CelA-CelB* mostró que la actividad de la enzima recombinante es alta a pH 5 ( $58.21 \pm 1.99$  U/mg) decreciendo a pH 4 a  $44.04 \pm 1.91$  U/mg. Sin embargo, a pH 6 la actividad se redujo drásticamente a  $30.68 \pm 1.85$  U/mg (Figura 19 b). Por otro lado, la temperatura también jugó un papel importante en la actividad con mayor actividad a 65°C con  $58.21 \pm 1.99$  U/mg decreciendo a  $42.30 \pm 2.65$  U/mg a 100°C pero a 40°C tuvo menos actividad decreciendo a  $30.11 \pm 1.38$  U/mg, una diferencia de 28.28 U/mg con respecto a la temperatura óptima (Figura 19 c). La actividad enzimática en el monocistrón *CelA* se incrementó de pH 6 ( $41.67 \pm 3.52$  U/mg) a pH 5 ( $49.10 \pm 1.84$  U/mg), pero mostraron actividad desfavorable a pH 4 decreciendo a  $39.82 \pm 2.42$  U/mg (Figura 19 d). La temperatura también mostró influencia en el desarrollo de actividad con incremento de la temperatura, de  $27.26 \pm 0.90$  U/mg a 40°C hasta  $49.10 \pm 1.84$  U/mg a 65°C, aunque a 100°C la actividad fue ligeramente disminuida a  $46.20 \pm 3.65$  U/mg (Figura 19 e). En el caso del monocistrón *CelB*, también mostró actividad estable a pH 5 ( $48.72 \pm 1.44$  U/mg) pero a pH 4 y pH6 mostró decremento en la actividad ( $34.49 \pm 2.92$  U/mg y  $33.04 \pm 2.12$  U/mg respectivamente) (Figura 19 f). Se mostró alta actividad a 65°C con  $48.72 \pm 1.44$  U/mg decreciendo a  $38.95 \pm 1.57$  U/mg a 100°C, pero a 40°C la actividad se redujo a  $22.13 \pm 2.08$  U/mg (Figura 19 g). El análisis sobre plantas transplastómicas con el gen *Bgl1* mostró que la actividad de la enzima recombinante es más estable y

alta a pH 5 ( $30.45 \pm 2.01$  U/mg) decreciendo a pH 7 a  $14.73 \pm 1.40$  U/mg pero a pH 3.5 la actividad se redujo hasta  $8.06 \pm 1.28$  U/mg (Figura 19 h). Asimismo, con respecto a la temperatura se mostró más actividad a 40°C con  $30.45 \pm 2.01$  U/mg decreciendo ligeramente a 60°C ( $26.06 \pm 1.74$  U/mg) pero a 65°C la actividad enzimática fue reducida hasta  $11.81 \pm 1.90$  U/mg (Figura 19 i).





**Figura 19.** Actividad enzimática en plantas transplastómicas de tabaco. (a) actividad enzimática de 'bgl1, CeIA-CeIB, CeIA y CeIB' en plantas jóvenes (tres semanas de edad) y maduras (siete semanas de edad), (b, c) Actividad enzimática de proteínas 'CeIA-CeIB' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de temperatura y pH, (d, e) Actividad enzimática de proteínas de 'CeIA' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura, (f, g) Actividad enzimática de proteínas de 'CeIB' de hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura, (h, i) Actividad enzimática de proteínas 'bgl1' e hojas de plantas maduras sujetas a diferentes condiciones de pH y temperatura. Los análisis muestran mayor actividad en plantas transplastómicas con respecto a plantas wild type en todas las condiciones. Los resultados son mostrados como un promedio de tres plantas (NtpES6-A, B, C, NtpHM4-A, B, C, NtpHM5-A, B, C, NtpHM6-A, B, C).

#### **4.8. Niveles de Actividad en Hojas de las Enzimas *PelA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* y *CelB***

La actividad enzimática de pectin liasa ( $304 \text{ U g}^{-1}$  en hojas frescas de plantas maduras) fue 55 veces más alta en plantas transplastómicas de la línea NtpES4 con respecto a plantas no transformadas ( $5.5 \text{ U g}^{-1}$  en hojas frescas de plantas maduras) con una producción de 66676.25 unidades por planta. La actividad de MnP ( $84.0 \text{ U g}^{-1}$  en hojas frescas de plantas maduras) fue 22 veces más alta en plantas transplastómicas de la línea NtpES5 con respecto a plantas no transformadas ( $3.7 \text{ U g}^{-1}$  en hojas frescas de plantas maduras) con una producción de 21715.46 unidades por planta (Cuadro1). Para el dicistrón de celulasa *CelA-CelB* ( $1290 \text{ U g}^{-1}$  en hoja fresca de plantas maduras) fue 24 veces más alta en plantas transplastómicas de la línea NtpHM4 con una producción de 338081.0 unidades por planta, en líneas transplastómicas NtpHM5 la actividad fue 21 veces más alta ( $1150 \text{ U g}^{-1}$  hoja fresca madura) con respecto a plantas no transformadas con una producción de 231456.7 unidades por planta, la línea NtpHM6 mostró 19 veces más actividad ( $1033 \text{ U g}^{-1}$  hoja fresca madura) con respecto a plantas no transformadas ( $53 \text{ U g}^{-1}$  de hoja fresca en plantas maduras) con un producción de 206669.8 unidades por planta, mientras que en la línea transplastómica NtpES6 ( $620 \text{ U g}^{-1}$  hoja fresca madura) el incremento fue 68 veces más alta con respecto a plantas no transformadas ( $9 \text{ U g}^{-1}$  hoja fresca madura) con una producción de 139395.0 unidades por planta (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Producción de proteínas de *PelA* y *MnP-2* en plantas transplásticas de tabaco de acuerdo a Jin *et al.* (2011). Una unidad de actividad de pectin liasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido poligalacturónico por minuto bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad para MnP es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo las condiciones del ensayo. Los resultados se muestran como el promedio de tres plantas transplásticas (NtpES4A, B, C y NtpES5A, B, C).

Enzima	Edad de la hoja	mg/ml	mg/g	U/mg	Promedio de hojas por planta	Promedio de peso por hoja (g)	U g <sup>-1</sup> en hoja	Unidades		Producción por planta
								Por hoja	Por edad de grupo	
Wild type	Joven	-	-	-	8.5 ± 2.31	1.56 ± 0.96	-	-	-	
	Madura	-	-	-	11.4 ± 1.35	16.82 ± 1.98	-	-	-	<i>Unidades</i>
PelA	Joven	1.31 ± 0.07	5.2 ± 0.3	27.1 ± 2.8	8.3 ± 1.15	1.37 ± 0.28	142.7 ± 13.9	195.98	1632.53	66676.25
	Madura	2.0 ± 0.17	8.3 ± 0.69	36.5 ± 2.2	12.3 ± 1.52	17.31 ± 4.43	304.6 ± 20	5275.24	65043.72	
MnP	Joven	0.29 ± 0.01	1.1 ± 0.07	18.3 ± 1.8	6.3 ± 2.5	1.27 ± 0.16	21.5 ± 3.4	27.44	173.70	21715.46
	Madura	0.6 ± 0.06	2.6 ± 0.2	31.9 ± 2.4	15.3 ± 1.52	16.75 ± 1.25	83.8 ± 8.0	1405.20	21541.75	

**Cuadro 2.** Producción de proteínas de *Bgl1*, *CelA-CelB*, *CelA* y *CelB* en plantas transplásticas de tabaco de acuerdo a Jin *et al.* (2011). Una unidad de actividad  $\beta$ -Glucosidasa es definida como 1  $\mu$ mol de *p*-nitrophenol liberado por minuto bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad de celulasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. Los resultados se muestran como el promedio de tres plantas transplásticas (NtpES6A, B, C, NtpHM4A, B, C, NtpHM5A, B, C, NtpHM6A, B, C).

Enzima	Edad de la hoja	mg/ml	mg/g	U/mg	Promedio de hojas por planta	Promedio de peso por hoja (g)	U g <sup>-1</sup> en hoja	Unidades		Producción por planta
								Por hoja	Por edad de grupo	
CelA-CelB	Joven	1.94 ± 0.75	19.45 ± 0.16	17.48 ± 0.20	13.33 ± 1.52	1.452 ± 0.05	340 ± 12.5	493.68	6580.75	<i>Unidades</i>
	Madura	2.21 ± 0.12	22.16 ± 0.98	58.21 ± 0.16	15.75 ± 0.95	16.316 ± 0.78	1290 ± 34.2	21047.64	331500.33	338081.084
CelA	Joven	2.23 ± 1.23	22.3 ± 0.91	18.83 ± 0.60	7.25 ± 0.50	1.255 ± 0.04	420 ± 20.1	527.1	3821.47	231456.788
	Madura	2.34 ± 0.90	23.42 ± 0.05	49.10 ± 0.07	12.75 ± 0.95	15.525 ± 0.89	1150 ± 16.5	17853.75	227635.31	
CelB	Joven	1.54 ± 0.75	15.46 ± 0.89	27.21 ± 0.74	9.25 ± 0.50	1.375 ± 0.15	420.8 ± 9.2	578.6	5352.05	206669.811
	Madura	2.12 ± 0.89	21.22 ± 0.12	48.72 ± 0.22	11.5 ± 1.73	16.932 ± 1.05	1033.8 ± 12.4	17505.8	201317.76	
Bgl1	Joven	1.91 ± 0.25	19.14 ± 0.16	9.92 ± 0.08	10.75 ± 0.95	1.345 ± 0.12	190 ± 23.5	255.55	2747.16	139395.163
	Madura	2.03 ± 0.42	20.36 ± 1.2	30.45 ± 0.32	15.2 ± 1.30	14.5 ± 2.92	620 ± 13.1	8990	136648.0	

## 5. DISCUSIÓN

La producción de múltiples enzimas para la degradación de polímeros de pared celular ha sido realizada por diferentes métodos, principalmente químicos o a través de la expresión de genes heterólogos en bacterias; para suplementar grandes cantidades de proteínas, la biotecnología vegetal puede ayudar disminuyendo los costos de producción (Svab *et al.*, 1990a; Verma y Daniell, 2007); y en este sentido, múltiples proteínas de interés para el sector agrícola han sido expresadas con alta producción de proteínas (Oey *et al.*, 2009a; Maliga y Bock, 2011).

En este estudio se reportó la expresión estable de seis genes (*PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA*, *CelB* y *CelA-CelB*) en el genoma de cloroplasto. Las zonas de recombinación homóloga *rrn16S* y *3'rps12* de los vectores de expresión (pES4, pES5, pEs6, pHM4, pHM5, pHM6) derivados de pPRV111A (Zoubenko *et al.*, 1994) fueron adecuados para la eficiente integración de los transgenes en el genoma de cloroplastos; además, las regiones 5', 3'-UTR y SD fueron eficientes para la expresión y estabilización del ARN mensajero; además, esos elementos regulatorios, mostraron eficiencia en la integración y expresión de los transgenes tal como lo reportaron Kuroda y Maliga (2001). La obtención de la eficiente expresión en los cloroplastos de tabaco en este estudio se atribuye al uso de

secuencias sintéticas previamente reportadas para maximizar la eficiencia de la región 5'UTR y las secuencias terminales, mismas que son importantes para maximizar el contenido de proteína en plantas transgénicas (Maliga, 2002). No obstante, los sitios de recombinación homóloga permitieron la integración sitio específica de genes para enzimas hidrolíticas, tal como se ha reportado para otros sitios de las regiones de Repetidos Invertidos del genoma de cloroplasto (Yu *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010; Davarpanah *et al.*, 2012). Los análisis de PCR y Southern blot confirmaron que todos los genes se integraron en el genoma de cloroplasto y que fue posible la regeneración de plantas con un estado homoplásmico; además, el análisis de transcritos mostró que los genes *PeIA*, *MnP-2*, *Bgl1*, *CelA* y *CelB* se procesaron como mensajes monocistrónico. La construcción dicistrónica formada con los genes *CelA-CelB* mostró un solo fragmento correspondiente al peso molecular de ambos genes indicando que el procesamiento ocurre de forma monocistrónica.

Se ha reportado que las pectin liasas desempeñan diferentes funciones dentro de las plantas, como el rompimiento de los enlaces glucosídicos o en la defensa de las plantas contra patógenos (Barras *et al.*, 1994; Wegener y Olsen, 2004; Verma *et al.*, 2010). Aunque existen reportes de expresión de pectin liasas en diferentes organismos (Brühlmann y Keen, 1997; Shih *et al.*, 2000; Chotigeat *et al.*, 2009), son pocos estudios relacionados a la expresión en cloroplastos de tabaco; en este sentido, evaluamos la actividad enzimática de pectin liasa de *S. thermocarboxydus* cepa B1 usando sustratos comerciales encontrando alta actividad. La actividad enzimática fue alta en plantas transplastómicas comparadas con plantas no transformadas; asimismo, la actividad mostró mayor actividad en plantas transplastómicas maduras con respecto a plantas jóvenes tal

como fue reportado por Verma *et al.* (2010). Pectin liasa codifica para el gen *PeIA* cuya proteína mostró más actividad a pH neutral mientras que a pH ácido (pH 5) la actividad decreció un 78.5% contrario a lo reportado por Nakano *et al.* (2012) quienes mostraron que la actividad era mayor en condiciones ácidas; asimismo, se ha reportado que el pH alcalino es óptimo para la expresión de pectin liasas en bacterias (Tardy *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2014); sin embargo, se encontró un decremento de 50% en actividad a pH 10. Estos resultados fueron similares a los reportados por Verma *et al.* (2010) quienes expresaron genes *PeIA*, *PeIB* y *PeID* de *Fusarium solani* en cloroplastos de tabaco y *E. coli* mostrando que el pH óptimo en *E. coli* es alcalino mientras que para plantas el pH óptimo es de 6 a 7 con decremento de 38% de actividad a pH 10. Previamente, Tonouchi *et al.* (2010) expresaron el gen *PeIA* utilizado en este reporte en *E. coli* obteniendo bajos niveles de actividad; asimismo, Tonouchi *et al.* (2010) también reportaron que la proteína heteróloga fue inactivada a 30°C, mientras que en este estudio la enzima fue activa a 60°C reportada como temperatura fue óptima; no obstante, hay reportes de diferentes temperaturas óptimas para diferentes pectin liasas (Tardy *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha reportado que manganeso peroxidasa (MnP) interviene en la degradación de lignina facilitando la ruptura de compuestos fenólicos en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scheel, 2000; Nagai *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). Se han reportado diferentes enzimas que degradan lignina en diferentes organismos (Iimura *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2008) y hasta el momento este es el primer reporte acerca de la expresión de una Manganeso Peroxidasa isozima H3 codificada por el gen *MnP-2* de *P. chrysosporium* en cloroplastos de tabaco. El gen *MnP-2* gene se insertó en la misma región que el gen *PeIA*, esta línea de

plantas mostró más actividad en estado de crecimiento maduro tal como se reportó en la expresión del gen *PeIA*. La actividad de esta enzima se evaluó en tres pH diferentes mostrando alta actividad a pH 6 tal como lo reportó Jiang *et al.* (2008) pero diferente a reportes previos de pH óptimos de 5.5 y pH 4.5 (Sutherland y Aust, 1996; Urek y Pazarlioglu, 2004). La actividad enzimática fue desfavorable a pH alcalino con decrementos de 61.8% a pH 8, mientras que a pH ácido se observó un decremento de 11.4%. La actividad enzimática exhibió una temperatura óptima de 65°C la cual decrece con el decremento de la temperatura (30°C) hasta un 62.4% lo cual difiere a reportes previos en sistemas bacterianos para temperaturas de 37°C y 30°C (Sutherland y Aust, 1996; Urek y Pazarlioglu, 2004; Jiang *et al.*, 2008).

Previamente, en tabaco se reportó la expresión de una MnP de *Coriolus versicolor* mediada por *Agrobacterium* y controlada por un doble promotor CaMV 35S mostrando 54 veces más expresión comparado con plantas no transformadas (Iimura *et al.*, 2002); sin embargo, en nuestro estudio la plantas que degradaron lignina mostraron 22 veces más actividad comparadas con las plantas silvestres sin mostrar diferencias en el crecimiento, floración y producción de semillas, posiblemente debido al nivel de proteínas expresado y el tipo de genes utilizados tal como lo reportó Austin *et al.* (1995) en alfalfa y Verma *et al.* (2010) en tabaco.

Se ha reportado que las  $\beta$ -glucosidasas están implicadas en el desarrollo de procesos, hidrolisis hormonal, crecimiento y contra ataques microbianos (Kleczkowski *et al.*, 1995; Wakuta *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Aunque hay reportes de expresión de  $\beta$ -glucosidasas en diferentes organismos (Bok *et al.*, 1998; Dan *et al.*, 2000; Kolotilin *et al.*, 2013; Kurniasih *et al.*, 2014;



Souza *et al.*, 2014) hay pocos estudios relacionados a su expresión en los cloroplastos de tabaco; en este estudio, se evaluó la expresión y actividad enzimática de una  $\beta$ -glucosidasa Familia 3 de *Aspergillus niger* usando sustratos comerciales encontrando alta actividad. La actividad enzimática fue alta comparada con plantas de tipo silvestre, pero la actividad en diferentes estados de desarrollo también fue diferente, con más actividad en plantas maduras tal como lo reportó Verma *et al.* (2010) para otras enzimas celulósicas. La actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa codificada por el gen *Bgl1* mostró más actividad a pH 5 similar a lo reportado por Jung *et al.* (2010) en tabaco y a resultados obtenidos con otras  $\beta$ -glucosidasa de otros organismos (Saha y Bothast, 1996; Yan y Lin, 1997; Uchima *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2014) mientras que a pH neutral la actividad enzimática decreció 51.6 %; sin embargo, un alto decremento se observó a pH 3.5 con 73.5% comparado con la temperatura óptima tal como lo reportó Petersen y Bock (2011) en tabaco. Las propiedades enzimáticas en este estudio, indican que las enzimas recombinantes tienen un gran potencial para la aplicación en procesos de hidrólisis enzimática en la industria, toda vez que los procesos son llevados a pH 4.5–5.0 (Souza *et al.*, 2014). Asimismo, las proteínas recombinantes mostraron mayor actividad a 40°C, similar a reportes de Petersen y Bock (2011) en tabaco con ligero decremento a 60°C (14.4%) contrario a lo reportado por Souza *et al.* (2014) quienes reportaron 60°C como temperatura óptima en *E. coli*. Sin embargo, ambos reportes concuerdan en que a 65°C muestran un alto decremento de hasta 61.2% según nuestros resultados; no obstante, hay reportes donde la temperatura óptima excede los 80°C cuando se expresa en cloroplastos de tabaco (Jung *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2012). Este estudio se suma a reportes con diferentes condiciones de temperatura óptima en la

expresión de  $\beta$ -glucosidasas (Pérez-Pons *et al.*, 1995; Zanoelo *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2010; Jabbour *et al.*, 2012).

En este estudio, también se logró la expresión de dos enzimas endocelulósicas codificadas por los genes *CelA* y *CelB* provenientes de *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998). Los productos de los genes *CelA* y *CelB* mostraron mayor actividad a pH 5 decreciendo a pH 6 hasta 15.2 % en *CelA* y 32.1% en *CelB*, contrario a los reportado por Verma *et al.* (2010) cuyo pH óptimo fue pH 6. A pH 4, *CelA* decreció 18.9% en contraste con los 29.1% mostrados por *CelB*. Sin embargo, ambas enzimas mostraron mayor actividad a 65°C con decremento de 5.9% en *CelA* y un decremento de 20.0% en *CelB* a 100°C; también, ambas enzimas mostraron alto decremento a 40°C con 44.0% en *CelA* y hasta un 54.5% en *CelB*. Para evaluar la capacidad de los cloroplastos para expresar la secuencia de *CelA* y *CelB* como un dicistrón se adicionaron regiones complementarias a las secuencias reportadas por Bok *et al.* (1998). Enzimas del dicistrón *CelA-CelB* mostraron mayor actividad a pH 5 con decremento a pH 4 (24.3%) pero hasta un 47.2% a pH 6. También, la actividad máxima en los productos del dicistrón se obtuvo a 65°C con decremento de 27.3% a 100°C y 48.2% a 40°C. Expresiones óptimas cerca de los 60°C también se han reportado por Verma *et al.* (2010) al expresar celulasas (*CelD*) en cloroplastos de tabaco y *E. coli*; sin embargo, hay reportes de temperaturas óptimas de hasta 80 °C para celulasas (Zhang *et al.*, 2012b). Las secuencias fusionadas de *CelA-CelB* permitieron un ligero incremento en la actividad comparado con las enzimas de productos monocistrónicos de *CelA* y *CelB*.

La expresión de diferentes genes que codifican para enzimas hidrolíticas de polímeros de pared celular en cloroplastos de tabaco se han logrado con diferentes resultados. Algunos reportes muestran efectos bajos en la pigmentación con la expresión de genes de lacasa (Davarpanah *et al.*, 2012) o con severo retardo en el crecimiento de las plantas al expresar xilanasas en el genoma del cloroplasto (Kolotilin *et al.*, 2013). Reportes previos muestran que expresar celulasas, las plantas pueden mostrar serias anomalías en el fenotipo que resultan en la muerte de las plantas (Petersen y Bock, 2011). No obstante, también se han reportado efectos benéficos como elevado nivel de fitohormonas, incremento de biomasa, incremento de tricomas y protección contra áfidos o mosquita blanca al expresarse  $\beta$ -glucosidasas (Jin *et al.*, 2011). En este estudio se reportó una línea transplastómica con efectos anormales en coloración de hojas (línea NtpHM4/gen *CeIA-CeIB*); las siete plantas obtenidas mostraron fenotipo variegado aunque no mostraron deficiencias en el crecimiento, desarrollo, formación de flores, fenotipos de flores y/o producción de semillas. Debido a que la progenie de las plantas variegadas no mostraron alteraciones en el color y el color verde fue restaurado, se asume que los sectores variegados en las hojas son homoplásmicos, lo cual se verificó con análisis moleculares; resultados similares se obtuvieron por Lutz y Maliga (2008) en ensayos con segregación de fenotipos aurea, mostrando tejidos homoplásmicos en hojas variegadas. Este tipo de mutaciones en la pigmentación es una herramienta genética útil que permiten generar líneas evolutivas con relativa facilidad (Diers, 1971; Smith, 1989; Derepas y Dulieu, 1992).

## 6. CONCLUSIONES

Se diseñaron vectores de expresión cloroplastídicos que contenían los genes que codifican para enzimas pectin liasa (*PeIA*), manganeso peroxidasa (*MnP-2*),  $\beta$ -glucosidasa (*Bgl1*), y celulasa tipo A y B (*CeIA*, *CeIB*) implicadas en la degradación polímeros de paredes celulares.

La integración de los genes en el genoma de cloroplastos de plantas de tabaco utilizando biobalística fue eficiente, y su integración pudo verificarse mediante análisis moleculares por PCR, Southern blot y Northern blot.

Las enzimas recombinantes mostraron actividad enzimática la cual fue verificada utilizando sustratos comerciales; esta actividad no tuvo repercusiones en los fenotipos de cinco líneas de plantas transplastómicas; sin embargo, la expresión de la secuencia dicistrónica mostró un fenotipo variegado el cual desapareció en la progenie.

Debido a la alta respuesta de los cloroplastos para la expresión de genes, estos sistemas podrían ser usados para producir enzimas hidrolíticas involucradas en la degradación de moléculas complejas ubicadas de pared celular para su uso en tratamiento de residuos como desechos urbanos, agricultura o producción de papel. Este estudio presenta y sustenta bases para el desarrollo de nuevos

métodos y estrategias para la sobreexpresión de enzimas implicadas en la degradación de pectina, lignina y celulosa para su aplicación en la industria biotecnológica usando plantas transgénicas.

## 7. LITERATURA CITADA

- Agrawal, P., Verma, D. y Daniell, H. 2011. Expression of *Trichoderma reesei* beta-mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis. *PLoS One*, **6**(12), e29302.
- Ahlert, D., Ruf, S. y Bock, R. 2003. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(26), 15730-5.
- Alexander, C., Faber, N. y Klaff, P. 1998. Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Research*, **26**(10), 2265-2272.
- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D., Stoger, E., Taylor, N. y Visser, R. 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, **15**(3), 305-327.
- Allison, L.A., Simon, L.D. y Maliga, P. 1996. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J*, **15**(11), 2802-9.
- Apel, W. y Bock, R. 2009. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiol*, **151**(1), 59-66.

- Apel, W., Schulze, W.X. y Bock, R. 2010. Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J*, **63**(4), 636-50.
- Austin, S., Bingham, E.T., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Will, J. y Burgess, R.R. 1995. Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica*, **85**(1-3), 381-393.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, **10**(5), 411-21.
- Barascu, A., Grabarz, A. y Lopez, B. 2013. Homologous Recombination in Mammals. in: *Site-directed insertion of transgenes*, (Eds.) S. Renault, P. Duchateau, Vol. 23, Springer Netherlands, pp. 91-120.
- Barkan, A. 2011. Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant physiology*, **155**(4), 1520-1532.
- Barkan, A. y Goldschmidt-Clermont, M. 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, **82**(6-7), 559-72.
- Barneche, F., Winter, V., Crevecoeur, M. y Rochaix, J.D. 2006. ATAB2 is a novel factor in the signalling pathway of light-controlled synthesis of photosystem proteins. *EMBO J*, **25**(24), 5907-18.
- Barnes, D., Franklin, S., Schultz, J., Henry, R., Brown, E., Coragliotti, A. y Mayfield, S.P. 2005. Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics*, **274**(6), 625-36.
- Barras, F., van Gijsegem, F. y Chatterjee, A.K. 1994. Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, **32**(1), 201-234.

- Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M. y Matzke, A.M. 1986. The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, **6**(5), 347-357.
- Bayer, E.A., Lamed, R. y Himmel, M.E. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**(3), 237-245.
- Becerra-Moreno, A., Benavides, J., Cisneros-Zevallos, L. y Jacobo-Velazquez, D.A. 2012. Plants as biofactories: glyphosate-induced production of shikimic acid and phenolic antioxidants in wounded carrot tissue. *J Agric Food Chem*, **60**(45), 11378-86.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M. y Hoondal, G.S. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **24**(6), 396-402.
- Beguin, P. y Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, **13**(1), 25-58.
- Berghem, L.E. y Pettersson, L.G. 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur J Biochem*, **37**(1), 21-30.
- Biochemicals, R.M. 2000. DIG Application Manual for filter hybridization. *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*.
- Birch - Machin, I., Newell, C.A., Hibberd, J.M. y Gray, J.C. 2004. Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant biotechnology journal*, **2**(3), 261-270.



- Birky, C.W., Maruyama, T. y Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**(3), 513-527.
- Bock, R. 2007. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol*, **18**(2), 100-6.
- Bock, R. 2000. Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, **82**(6-7), 549-57.
- Bock, R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol*, **312**(3), 425-38.
- Bock, R. y Koop, H.U. 1997. Extraplasmidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO J*, **16**(11), 3282-8.
- Bogorad, L. 2000. Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol*, **18**(6), 257-63.
- Bok, J.D., Yernool, D.A. y Eveleigh, D.E. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol*, **64**(12), 4774-81.
- Bollenbach, T.J., Schuster, G. y Stern, D.B. 2004. Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **78**, 305-37.
- Borisova, G.P., Volkova, T.M., Berzin, V., Rosenthal, G. y Gren, E.J. 1979. The regulatory region of MS2 phage RNA replicase cistron. IV. Functional activity of specific MS2 RNA fragments in formation of the 70 S initiation complex of protein biosynthesis. *Nucleic Acids Res*, **6**(5), 1761-74.

- Boulouis, A., Raynaud, C., Bujaldon, S., Aznar, A., Wollman, F.-A. y Choquet, Y. 2011. The nucleus-encoded trans-acting factor MCA1 plays a critical role in the regulation of cytochrome f synthesis in *Chlamydomonas* chloroplasts. *The Plant Cell Online*, **23**(1), 333-349.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M. y Shark, K.B. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, **240**(4858), 1534-1538.
- Brühlmann, F. y Keen, N.T. 1997. Cloning, sequence and expression of the pel gene from an *Amycolata* sp. *Gene*, **202**(1-2), 45-51.
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P. y Nixon, P.J. 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J*, **17**(4), 868-76.
- Campos-Quevedo, N., Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L., Martínez-Salgado, L., Guevara-Arauz, J. y Soria-Guerra, R. 2013. Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **113**(2), 217-225.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, **37**(Database issue), D233-8.

- Carrer, H., Hockenberry, T.N., Svab, Z. y Maliga, P. 1993. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet*, **241**(1-2), 49-56.
- Carrer, H. y Maliga, P. 1995. Targeted Insertion of Foreign Genes into the Tobacco Plastid Genome without Physical Linkage to the Selectable Marker Gene. *Nat Biotech*, **13**(8), 791-794.
- Cerutti, H., Johnson, A.M., Boynton, J.E. y Gillham, N.W. 1995. Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of Escherichia coli RecA. *Mol Cell Biol*, **15**(6), 3003-11.
- Clarke, J.L. y Daniell, H. 2011. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol Biol*, **76**(3-5), 211-20.
- Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z. y Maliga, P. 2001. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *Plant J*, **27**(2), 171-8.
- Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**(11), 850-861.
- Cosgrove, D.J. 1993. How Do Plant Cell Walls Extend? *Plant Physiology*, **102**(1), 1-6.
- Cseplö, A., Etzold, T., Schell, J. y Schreier, P. 1988. Point mutations in the 23 S rRNA genes of four lincomycin resistant *Nicotiana plumbaginifolia* mutants could provide new selectable markers for chloroplast transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, **214**(2), 295-299.
- Chakrabarti, S.K., Lutz, K.A., Lertwiriawong, B., Svab, Z. y Maliga, P. 2006. Expression of the cry9Aa2 B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. *Transgenic Res*, **15**(4), 481-8.

- Chen, F. y Dixon, R.A. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotech*, **25**(7), 759-761.
- Chen, M., Liu, X., Wang, Z., Song, J., Qi, Q. y Wang, P.G. 2005. Modification of plant N-glycans processing: the future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Med Res Rev*, **25**(3), 343-60.
- Chotigeat, W., Duangchu, S., Wititsuwannakun, R. y Phongdara, A. 2009. Cloning and characterization of pectate lyase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**(4), 243-247.
- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B.A., He, S., Withers, S.G. y Shoseyov, O. 2000. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *J Biol Chem*, **275**(7), 4973-80.
- Daniell, H. 1993. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol*, **217**, 536-56.
- Daniell, H. 2006a. Henry Daniell: chloroplast genetic engineering. *Biotechnol J*, **1**(1), 31-3.
- Daniell, H. 1999. New tools for chloroplast genetic engineering. *Nat Biotechnol*, **17**(9), 855-6.
- Daniell, H. 2006b. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J*, **1**(10), 1071-9.
- Daniell, H. 2007. Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(17), 6879-80.

- Daniell, H., Chebolu, S., Kumar, S., Singleton, M. y Falconer, R. 2005a. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*, **23**(15), 1779-83.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. y Lee, S.B. 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol*, **16**(4), 345-8.
- Daniell, H. y Dhingra, A. 2002. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, **13**(2), 136-41.
- Daniell, H., Kumar, S. y Dufourmantel, N. 2005b. Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol*, **23**(5), 238-45.
- Daniell, H., Lee, S.B., Grevich, J., Saski, C., Quesada-Vargas, T., Guda, C., Tomkins, J. y Jansen, R.K. 2006. Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet*, **112**(8), 1503-18.
- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T. y Wiebe, P.O. 2001a. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*, **311**(5), 1001-9.
- Daniell, H., Muthukumar, B. y Lee, S.B. 2001b. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet*, **39**(2), 109-16.
- Daniell, H., Ruiz, G., Denes, B., Sandberg, L. y Langridge, W. 2009. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human

- insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnol*, **9**, 33.
- Daniell, H., Ruiz, O.N. y Dhingra, A. 2005c. Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol*, **286**, 111-38.
- Dauvillee, D., Hilbig, L., Preiss, S. y Johanningmeier, U. 2004. Minimal Extent of Sequence Homology Required for Homologous Recombination at the psbA Locus in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts using PCR-generated DNA Fragments. *Photosynthesis Research*, **79**(2), 219-224.
- Davarpanah, S., Ahn, J.-W., Ko, S., Jung, S., Park, Y.-I., Liu, J. y Jeong, W. 2012. Stable expression of a fungal laccase protein using transplastomic tobacco. *Plant Biotechnology Reports*, **6**(4), 305-312.
- Davoodi-Semiromi, A., Samson, N. y Daniell, H. 2009. The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum Vaccin*, **5**(7), 488-93.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M. y Daniell, H. 2001. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol*, **19**(1), 71-4.
- DeGray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J. y Daniell, H. 2001. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol*, **127**(3), 852-62.
- Del, L.Y.M., Farran, I., Becher, M.L., Sander, V., Sanchez, V.R., Martin, V., Veramendi, J. y Clemente, M. 2012. A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice. *Plant Biotechnol J*, **10**(9), 1136-44.

- Deng, X.W. y Gruissem, W. 1987. Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell*, **49**(3), 379-87.
- Derepas, A. y Dulieu, H. 1992. Inheritance of the Capacity to Transfer Plastids by the Pollen Parent in *Petunia hybrida* Hort. *Journal of Heredity*, **83**(1), 6-10.
- Dhingra, A., Portis, A.R., Jr. y Daniell, H. 2004. Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(16), 6315-20.
- Diers, L. 1971. Übertragung von Plastiden durch den Pollen bei *Antirrhinum majus*. *Molecular and General Genetics MGG*, **113**(2), 150-153.
- Dosanjh, N.S. y Hoondal, G.S. 1996. Production of constitutive, thermostable, hyper active exo-pectinase from *Bacillus* GK-8. *Biotechnology Letters*, **18**(12), 1435-1438.
- Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants. in: *Molecular techniques in taxonomy*, Springer, pp. 283-293.
- Drapier, D., Girard-Bascou, J., Stern, D.B. y Wollman, F.A. 2002. A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the atpA transcript. *Plant J*, **31**(6), 687-97.
- Drechsel, O. y Bock, R. 2011. Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids. *Nucleic Acids Res*, **39**, 1427 - 1438.
- Dreesen, I.A.J., Hamri, G.C.-E. y Fussenegger, M. 2010. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Biotechnology*, **145**(3), 273-280.

- Dufourmantel, N., Pelissier, B., Garcon, F., Peltier, G., Ferullo, J.M. y Tissot, G. 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol*, **55**(4), 479-89.
- Dwivedi, U.N., Campbell, W.H., Yu, J., Datla, R.S., Bugos, R.C., Chiang, V.L. y Podila, G.K. 1994. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol Biol*, **26**(1), 61-71.
- Eberhard, S., Drapier, D. y Wollman, F.A. 2002. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, **31**(2), 149-60.
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J. y Koop, H.U. 1999. In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *The Plant Journal*, **19**(3), 333-345.
- Elghabi, Z., Karcher, D., Zhou, F., Ruf, S. y Bock, R. 2011a. Optimization of the expression of the HIV fusion inhibitor cyanovirin-N from the tobacco plastid genome. *Plant Biotechnol J*, **9**(5), 599-608.
- Elghabi, Z., Ruf, S. y Bock, R. 2011b. Biolistic co-transformation of the nuclear and plastid genomes. *Plant J*, **67**(5), 941-8.
- Erickson, J.M. 1996. Chloroplast transformation: current results and future prospects. in: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Springer, pp. 589-619.
- 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**(3), 161-168.
- Farquhar, J., Zerkle, A.L. y Bekker, A. 2011. Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis. *Photosynth Res*, **107**(1), 11-36.
- Fernández-San Millán, A., Mingo-Castel, A., Miller, M. y Daniell, H. 2003. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal*, **1**(2), 71-79.
- Fernandez-San Millan, A., Ortigosa, S.M., Hervas-Stubbs, S., Corral-Martinez, P., Segui-Simarro, J.M., Gaetan, J., Coursaget, P. y Veramendi, J. 2008. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J*, **6**(5), 427-41.
- Fitzpatrick, T.B., Basset, G.J., Borel, P., Carrari, F., DellaPenna, D., Fraser, P.D., Hellmann, H., Osorio, S., Rothan, C., Valpuesta, V., Caris-Veyrat, C. y Fernie, A.R. 2012. Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? *Plant Cell*, **24**(2), 395-414.
- Fouad, W.M. y Altpeter, F. 2009. Transplastomic expression of bacterial L-aspartate-alpha-decarboxylase enhances photosynthesis and biomass production in response to high temperature stress. *Transgenic Res*, **18**(5), 707-18.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C. y Bramley, P.M. 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects

- on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell*, **19**(10), 3194-211.
- Glenn, J.K. y Gold, M.H. 1983. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(6), 1741-1747.
- Glenz, K., Bouchon, B., Stehle, T., Wallich, R., Simon, M.M. y Warzecha, H. 2006. Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat Biotechnol*, **24**(1), 76-7.
- Gold, M.H. y Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*, **57**(3), 605-622.
- Golds, T., Maliga, P. y Koop, H.-U. 1993. Stable Plastid Transformation in PEG-treated Protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Nat Biotech*, **11**(1), 95-97.
- 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.
- Gomez, L.D., Steele-King, C.G. y McQueen-Mason, S.J. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*, **178**(3), 473-485.
- Goyal, A.K. y Eveleigh, D.E. 1996. Cloning, sequencing and analysis of the ggh-A gene encoding a 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase from *Microbispora bispora*. *Gene*, **172**(1), 93-98.

- Gray, B., Yang, H., Ahner, B. y Hanson, M. 2011. An efficient downstream box fusion allows high-level accumulation of active bacterial beta-glucosidase in tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, **76**(3-5), 345-355.
- Gruissem, W. y Tonkyn, J.C. 1993. Control mechanisms of plastid gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **12**(1-2), 19-55.
- Hagemann, R. 2002. Milestones in plastid genetics of higher plants. *Prog. bot*, **63**, 1–51.
- Hagemann, R. 2004. The Sexual Inheritance of Plant Organelles. in: *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, (Eds.) H. Daniell, C. Chase, Springer Netherlands, pp. 93-113.
- Hajdukiewicz, P.T., Allison, L.A. y Maliga, P. 1997. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J*, **16**(13), 4041-8.
- Hassan, S., Shevchik, V.E., Robert, X. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2013. PeIN Is a New Pectate Lyase of *Dickeya dadantii* with Unusual Characteristics. *Journal of Bacteriology*, **195**(10), 2197-2206.
- Hasunuma, T., Miyazawa, S., Yoshimura, S., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., Shindo, K., Choi, S.K., Misawa, N. y Miyake, C. 2008. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J*, **55**(5), 857-68.
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. y Gruissem, W. 1996. Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J*, **15**(5), 1132-41.

- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R.G. y Börner, T. 2002. Six active phage - type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *The Plant Journal*, **30**(6), 625-637.
- Herron, S.R., Benen, J.A.E., Scavetta, R.D., Visser, J. y Journak, F. 2000. Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(16), 8762-8769.
- Hicks, A., Drager, R.G., Higgs, D.C. y Stern, D.B. 2002. An mRNA 3' processing site targets downstream sequences for rapid degradation in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J Biol Chem*, **277**(5), 3325-33.
- Hirose, T., Kusumegi, T. y Sugiura, M. 1998. Translation of tobacco chloroplast rps14 mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Lett*, **430**(3), 257-60.
- Hirose, T. y Sugiura, M. 2004. Multiple elements required for translation of plastid atpB mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. *Nucleic Acids Res*, **32**(11), 3503-10.
- Hoch, B., Maier, R.M., Appel, K., Igloi, G.L. y Kossel, H. 1991. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, **353**(6340), 178-80.
- Holland, H.D. 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**(1470), 903-915.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. y Beg, Q.K. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **59**(4-5), 409-18.

- Huang, F.C.H., Klaus, S.K., Herz, S.H., Zou, Z.Z., Koop, H.U.K. y Golds, T.G. 2002. Efficient plastid transformation in tobacco using the *SMALL* aphA-6/*SMALL* gene and kanamycin selection. *Molecular Genetics and Genomics*, **268**(1), 19-27.
- Hussein, H.S., Ruiz, O.N., Terry, N. y Daniell, H. 2007. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. *Environ Sci Technol*, **41**(24), 8439-46.
- Iamtham, S. y Day, A. 2000. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol*, **18**(11), 1172-6.
- Iimura, Y., Ikeda, S., Sonoki, T., Hayakawa, T., Kajita, S., Kimbara, K., Tatsumi, K. y Katayama, Y. 2002. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, **59**(2-3), 246-51.
- Irie, T., Honda, Y., Ha, H.-C., Watanabe, T. y Kuwahara, M. 2000. Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of wood science*, **46**(3), 230-233.
- Jabbour, D., Klippel, B. y Antranikian, G. 2012. A novel thermostable and glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Fervidobacterium islandicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**(5), 1947-1956.
- Jansen, R.K., Raubeson, L.A., Boore, J.L., dePamphilis, C.W., Chumley, T.W., Haberle, R.C., Wyman, S.K., Alverson, A.J., Peery, R., Herman, S.J., Fourcade, H.M., Kuehl, J.V., McNeal, J.R., Leebens-Mack, J. y Cui, L.

2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol*, **395**, 348-84.
- Jayaraj, J., Devlin, R. y Punja, Z. 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res*, **17**(4), 489-501.
- Jiang, F., Kongsaree, P., Schilke, K., Lajoie, C. y Kelly, C. 2008. Effects of pH and temperature on recombinant manganese peroxidase production and stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **146**(1-3), 15-27.
- Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T. y Daniell, H. 2011. Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of beta-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), 222-35.
- Jukes, T.H. y Osawa, S. 1990. The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia*, **46**(11-12), 1117-1126.
- Jung, S., Kim, S., Bae, H., Lim, H.-S. y Bae, H.-J. 2010. Expression of thermostable bacterial  $\beta$ -glucosidase (BglB) in transgenic tobacco plants. *Bioresource Technology*, **101**(18), 7144-7150.
- Jung, S., Lee, D.-S., Kim, Y.-O., Joshi, C. 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**(4-5), 317-328.
- Juturu, V. y Wu, J.C. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **33**(0), 188-203.
- Kahlau, S. y Bock, R. 2008. Plastid transcriptomics and translaticomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation:

- chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *The Plant Cell Online*, **20**(4), 856-874.
- Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yokota, A. y Tomizawa, K. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*, **15**(2), 205-17.
- Kang, T.J., Loc, N.H., Jang, M.O., Jang, Y.S., Kim, Y.S., Seo, J.E. y Yang, M.S. 2003. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res*, **12**(6), 683-91.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. y Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol*, **77**(3), 215-27.
- Keeling, P.J. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **365**(1541), 729-48.
- Khakhlova, O. y Bock, R. 2006. Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion. *Plant J*, **46**(1), 85-94.
- Khan, M.S. y Maliga, P. 1999. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, **17**(9), 910-5.
- Kim, J. y Mayfield, S.P. 2002. The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol*, **43**(10), 1238-43.
- Kim, J.Y., Kavas, M., Fouad, W.M., Nong, G., Preston, J.F. y Altpeter, F. 2011. Production of hyperthermostable GH10 xylanase Xyl10B from *Thermotoga*

- maritima in transplastomic plants enables complete hydrolysis of methylglucuronoxylan to fermentable sugars for biofuel production. *Plant Mol Biol*, **76**(3-5), 357-69.
- Kindle, K.L., Richards, K.L. y Stern, D.B. 1991. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(5), 1721-5.
- Kleczkowski, K., Schell, J. y Bandur, R. 1995. Phytohormone Conjugates: Nature and Function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **14**(4), 283-298.
- Klein, R. y Mullet, J. 1990. Light-induced transcription of chloroplast genes. psbA transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *Journal of Biological Chemistry*, **265**(4), 1895-1902.
- 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.
- Koonin, E.V. y Novozhilov, A.S. 2009. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life*, **61**(2), 99-111.
- Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F. y Moar, W.J. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(5), 1840-5.
- 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 Mol Biol*, **60**(3), 405-22.



- Kumar, S. y Daniell, H. 2004. Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol Biol*, **267**, 365-83.
- 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), 2843-54.
- Kumar, S., Dhingra, A. y Daniell, H. 2004b. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol*, **56**(2), 203-16.
- Kumar, S., Hahn, F.M., Baidoo, E., Kahlon, T.S., Wood, D.F., McMahan, C.M., Cornish, K., Keasling, J.D., Daniell, H. y Whalen, M.C. 2012. Remodeling the isoprenoid pathway in tobacco by expressing the cytoplasmic mevalonate pathway in chloroplasts. *Metab Eng*, **14**(1), 19-28.
- Kurniasih, S.D., Alfi, A., Natalia, D., Radjasa, O.K. y Nurachman, Z. 2014. Construction of individual, fused, and co-expressed proteins of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase for hydrolyzing sugarcane bagasse. *Microbiological Research*, **169**(9–10), 725-732.
- Kuroda, H. y Maliga, P. 2002. Overexpression of the clpP 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a clpP-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts. *Plant Physiol*, **129**(4), 1600-6.
- Kuroda, H. y Maliga, P. 2003. The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature*, **425**(6953), 86-9.

- Kuroda, H. y Maliga, P. 2001. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol*, **125**(1), 430-6.
- Langbecker, C.L., Ye, G.N., Broyles, D.L., Duggan, L.L., Xu, C.W., Hajdukiewicz, P.T., Armstrong, C.L. y Staub, J.M. 2004. High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol*, **135**(1), 39-46.
- Lee, S.B., Kaittanis, C., Jansen, R.K., Hostetler, J.B., Tallon, L.J., Town, C.D. y Daniell, H. 2006a. The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Genomics*, **7**, 61.
- Lee, S.M., Kang, K., Chung, H., Yoo, S.H., Xu, X.M., Lee, S.B., Cheong, J.J., Daniell, H. y Kim, M. 2006b. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, **21**(3), 401-10.
- Leister, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet*, **19**(1), 47-56.
- Lelivelt, C.L., McCabe, M.S., Newell, C.A., Desnoo, C.B., van Dun, K.M., Birch-Machin, I., Gray, J.C., Mills, K.H. y Nugent, J.M. 2005. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol*, **58**(6), 763-74.
- Leon, R., Couso, I. y Fernandez, E. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*, **130**(2), 143-52.
- Igloi, G.L. y Kössel, H. 1992. The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **10**(6), 525-558.

- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T. y Wurtzel, E.T. 2008. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol*, **147**(3), 1334-46.
- Li, Q., Li, P., Sun, L., Wang, Y., Ji, K., Sun, Y., Dai, S., Chen, P., Duan, C. y Leng, P. 2012. Expression analysis of  $\beta$ -glucosidase genes that regulate abscisic acid homeostasis during watermelon (*Citrullus lanatus*) development and under stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, **169**(1), 78-85.
- Li, W., Ruf, S. y Bock, R. 2010. Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, **76**(3-5), 443-51.
- Lieberman-Lazarovich, M. y Levy, A. 2011. Homologous Recombination in Plants: An Antireview. in: *Plant Chromosome Engineering*, (Ed.) J.A. Birchler, Vol. 701, Humana Press, pp. 51-65.
- Liere, K. y Börner, T. 2007. Transcription and transcriptional regulation in plastids. in: *Cell and molecular biology of plastids*, Springer, pp. 121-174.
- Liere, K. y Börner, T. 2011. Transcription in Plant Mitochondria. in: *Plant Mitochondria*, (Ed.) F. Kempken, Vol. 1, Springer New York, pp. 85-105.
- Liere, K. y Maliga, P. 2004. Plastid RNA Polymerases in Higher Plants. in: *Regulation of Photosynthesis*, (Eds.) E.-M. Aro, B. Andersson, Vol. 11, Springer Netherlands, pp. 29-49.
- Link, G. 1996. Green life: Control of chloroplast gene transcription. *BioEssays*, **18**(6), 465-471.
- Liu, C.W., Lin, C.C., Chen, J.J. y Tseng, M.J. 2007. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep*, **26**(10), 1733-44.

- Liu, X.-Q., Huang, C. y Xu, H. 1993. The unusual rps3-like orf712 is functionally essential and structurally conserved in *Chlamydomonas*. *FEBS Letters*, **336**(2), 225-230.
- Lossl, A., Eibl, C., Harloff, H.J., Jung, C. y Koop, H.U. 2003. Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep*, **21**(9), 891-9.
- Lowe, J.A., 3rd y Jones, P. 2007. Biopharmaceuticals and the future of the pharmaceutical industry. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **10**(5), 513-4.
- Lu, Y., Rijzaani, H., Karcher, D., Ruf, S. y Bock, R. 2013. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(8), E623-32.
- Lutz, K.A., Corneille, S., Azhagiri, A.K., Svab, Z. y Maliga, P. 2004. A novel approach to plastid transformation utilizes the phiC31 phage integrase. *Plant J*, **37**(6), 906-13.
- Lutz, K.A., Knapp, J.E. y Maliga, P. 2001. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol*, **125**(4), 1585-90.
- Lutz, K.A. y Maliga, P. 2007. Construction of marker-free transplastomic plants. *Curr Opin Biotechnol*, **18**(2), 107-14.
- Lutz, K.A. y Maliga, P. 2008. Plastid genomes in a regenerating tobacco shoot derive from a small number of copies selected through a stochastic process. *Plant J*, **56**(6), 975-83.
- Lutz, K.A., Svab, Z. y Maliga, P. 2006. Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat Protoc*, **1**(2), 900-10.

- Lysenko, E.A. y Kuznetsov, V.V. 2005. [Plastid RNA polymerases]. *Mol Biol (Mosk)*, **39**(5), 762-75.
- Ma, S. y Jevnikar, A.M. 2008. Plant-based edible vaccines for immunotherapy against autoimmune and allergic diseases. *Journal of Biotechnology*, **136**, **Supplement**(0), S202-S203.
- Madoka, Y., Tomizawa, K.-I., Mizoi, J., Nishida, I., Nagano, Y. y Sasaki, Y. 2002. Chloroplast Transformation with Modified accD Operon Increases Acetyl-CoA Carboxylase and Causes Extension of Leaf Longevity and Increase in Seed Yield in Tobacco. *Plant and Cell Physiology*, **43**(12), 1518-1525.
- Maliga, P. 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, **5**(2), 164-72.
- Maliga, P. 2001. Plastid engineering bears fruit. *Nat Biotechnol*, **19**(9), 826-7.
- Maliga, P. 2012. Plastid transformation in flowering plants. *Genomics of chloroplasts and mitochondria. Volume 35*, 393 - 414.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 289-313.
- Maliga, P. 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol*, **21**(1), 20-8.
- Maliga, P. y Bock, R. 2011. Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiol*, **155**(4), 1501-10.
- Margulis, L. 1970. *Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth*. Yale University Press New Haven.
- Marin-Navarro, J., Manuell, A.L., Wu, J. y S, P.M. 2007. Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res*, **94**(2-3), 359-74.

- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. y Penny, D. 2002. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(19), 12246-51.
- Mayfield, S.P., Franklin, S.E. y Lerner, R.A. 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(2), 438-442.
- Mayfield, S.P., Manuell, A.L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M. y Marin-Navarro, J. 2007. Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**(2), 126-133.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M. y Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N Y)*, **13**(4), 362-5.
- McCabe, M.S., Klaas, M., Gonzalez-Rabade, N., Poage, M., Badillo-Corona, J.A., Zhou, F., Karcher, D., Bock, R., Gray, J.C. y Dix, P.J. 2008. Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnol J*, **6**(9), 914-29.
- McCormick, A.A., Reddy, S., Reinl, S.J., Cameron, T.I., Czerwinski, D.K., Vojdani, F., Hanley, K.M., Garger, S.J., White, E.L., Novak, J., Barrett, J., Holtz, R.B., Tusé, D. y Levy, R. 2008. Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. y Schuster, G. 2003. HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell*, **15**(6), 1480-95.
- Meng, B.Y., Tanaka, M., Wakasugi, T., Ohme, M., Shinozaki, K. y Sugiura, M. 1988. Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping. *Curr Genet*, **14**(4), 395-400.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**(3), 426-428.
- Miyairi, K., Ogasawara, A., Tonouchi, A., Hosaka, K., Kudou, M. y Okuno, T. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *Journal of Applied Glycoscience (Japan)*.
- Molina, A., Hervas-Stubbs, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A.M. y Veramendi, J. 2004. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J*, **2**(2), 141-53.
- Monde, R.A., Greene, J.C. y Stern, D.B. 2000. Disruption of the petB-petD intergenic region in tobacco chloroplasts affects petD RNA accumulation and translation. *Mol Gen Genet*, **263**(4), 610-8.
- Nagai, M., Sakamoto, Y., Nakade, K. y Sato, T. 2007. Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*. *Mycoscience*, **48**(2), 125-130.
- Nakamura, M. y Sugiura, M. 2009. Selection of synonymous codons for better expression of recombinant proteins in tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology*, **26**(1), 53-56.

- Nakano, Y., Uenoyama, M. y Kobayashi, E. 2012. Pectin lyase, pectin lyase gene, enzyme preparation, and method for production of single cells of plant tissue, Google Patents.
- Nascimento, C., Souza, F., Masui, D., Leone, F., Peralta, R., Jorge, J. y Furriel, R. 2010. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated  $\beta$ -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *The Journal of Microbiology*, **48**(1), 53-62.
- Newell, C.A., Birch-Machin, I., Hibberd, J.M. y Gray, J.C. 2003. Expression of Green Fluorescent Protein from Bacterial and Plastid Promoters in Tobacco Chloroplasts. *Transgenic Research*, **12**(5), 631-634.
- Newman, S., Gillham, N., Harris, E., Johnson, A. y Boynton, J. 1991. Targeted disruption of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics MGG*, **230**(1-2), 65-74.
- Nguyen, H.M., Cuine, S., Beyly-Adriano, A., Legeret, B., Billon, E., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G. y Li-Beisson, Y. 2013. The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has a single omega-3 fatty acid desaturase which localizes to the chloroplast and impacts both plastidic and extraplastidic membrane lipids. *Plant Physiol.*
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A. y Hanson, A.D. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J*, **16**(4), 487-96.
- 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 science : an international journal of experimental plant biology*, **170**(1), 135-142.
- O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J. y Medgyesy, P. 1993. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J*, **3**(5), 729-38.
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B. y Bock, R. 2009a. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*, **57**(3), 436-45.
- Oey, M., Lohse, M., Scharff, L.B., Kreikemeyer, B. y Bock, R. 2009b. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(16), 6579-84.
- Ohama, T., Inagaki, Y., Bessho, Y. y Osawa, S. 2008. Evolving genetic code. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **84**(2), 58-74.
- Okumura, S., Sawada, M., Park, Y., 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**(- 1573-9368 (Electronic)).
- Oldenburg, D.J. y Bendich, A.J. 2004. Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol*, **335**(4), 953-70.
- Orth, A.B., Rzhetskaya, M., Cullen, D. y Tien, M. 1994. Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: genomic organization of lignin and manganese peroxidase-encoding genes. *Gene*, **148**(1), 161-5.

- Palmer, J.D. 1985. Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu Rev Genet*, **19**, 325-54.
- Palmer, J.D. 1991. Plastid chromosomes: structure and evolution. . *Stat Med*, **Vol. 7A**(In: Cell Culture and Somatic Genetics of Plant, , Molecular Biology of Plastids, eds. L. Bogorad and I.K. Vasil, Academic Press, San Diego, ), pp. 5-53.
- Pei, J., Pang, Q., Zhao, L., Fan, S. y Shi, H. 2012. Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum  $\beta$ -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol Biofuels*, **5**(31), 1-10.
- Pérez-Pons, J.A., Rebordosa, X. y Querol, E. 1995. Properties of a novel glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase purified from Streptomyces sp. (ATCC 11238). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1251**(2), 145-153.
- 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), 311-21.
- Pourcel, L., Moulin, M. y Fitzpatrick, T.B. 2013. Examining strategies to facilitate vitamin B1 biofortification of plants by genetic engineering. *Front Plant Sci*, **4**, 160.
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. y Barkan, A. 2011. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(1), 415-420.

- Quesada-Vargas, T., Ruiz, O.N. y Daniell, H. 2005. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation. *Plant Physiol*, **138**(3), 1746-62.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. y Posewitz, M.C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell*, **9**(4), 486-501.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J. y Liotta, C.L. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *science*, **311**(5760), 484-489.
- Rajan, A., Kurup, J.G. y Abraham, T.E. 2010. Solid state production of manganese peroxidases using arecanut husk as substrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**(3), 555-562.
- Ramessar, K., Sabalza, M., Capell, T. y Christou, P. 2008. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*, **174**(4), 409-419.
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.-C., Nye, G.J., Scott, P., Golbeck, J.H. y Hanson, A.D. 1997. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(7), 3454-3458.
- Rixon, J.E., Ferreira, L.M., Durrant, A.J., Laurie, J.I., Hazlewood, G.P. y Gilbert, H.J. 1992. Characterization of the gene celD and its encoded product 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase D from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *Biochem J*, **285** ( Pt 3), 947-55.

- Rogalski, M. y Carrer, H. 2011. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. *Plant Biotechnol J*, **9**(5), 554-64.
- Rott, R., Drager, R.G., Stern, D.B. y Schuster, G. 1996. The 3' untranslated regions of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii* do not serve as efficient transcriptional terminators. *Mol Gen Genet*, **252**(6), 676-83.
- Ruf, M. y Kössel, H. 1988. Occurrence and spacing of ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants. *FEBS Letters*, **240**(1-2), 41-44.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I., Carrer, H. y Bock, R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol*, **19**, 870 - 875.
- Ruf, S., Karcher, D. y Bock, R. 2007. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(17), 6998-7002.
- 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), 2088-104.
- Ruiz, O.N. y Daniell, H. 2009. Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. *Curr Opin Biotechnol*, **20**(2), 213-9.
- Ruiz, O.N., Hussein, H.S., Terry, N. y Daniell, H. 2003. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol*, **132**(3), 1344-52.

- Rujan, T. y Martin, W. 2001. How many genes in Arabidopsis come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. *Trends Genet*, **17**(3), 113-20.
- Saha, B.C. y Bothast, R.J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Appl Environ Microbiol*, **62**(9), 3165-70.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**(2), 185-194.
- Sasaki, T., Yukawa, Y., Miyamoto, T., Obokata, J. y Sugiura, M. 2003. Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (*Nicotiana tabacum*): comparative analysis shows the involvement of distinct trans-factors for *ndhB* editing. *Mol Biol Evol*, **20**(7), 1028-35.
- Sato, N., Fujiwara, S., Kawaguchi, A. y Tsuzuki, M. 1997. Cloning of a gene for chloroplast omega6 desaturase of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biochem*, **122**(6), 1224-32.
- Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S., & Hölker, U. . 2000. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. . *Applied microbiology and biotechnology*., **54**(5), 686-691.
- Schmitz-Linneweber, C. y Small, I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci*, **13**(12), 663-70.
- Serino, G. y Maliga, P. 1997. A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *Plant J*, **12**(3), 697-701.

- Shaver, J.M., Oldenburg, D.J. y Bendich, A.J. 2006. Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, *Medicago truncatula*, pea, and maize. *Planta*, **224**(1), 72-82.
- Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997. Pectate lyase Pell of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *Journal of Bacteriology*, **179**(23), 7321-30.
- Shih, J., Wei, Y. y Goodwin, P.H. 2000. A comparison of the pectate lyase genes, pel-1 and pel-2, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, **243**(1-2), 139-150.
- 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.
- Shumskaya, M., Bradbury, L.M., Monaco, R.R. y Wurtzel, E.T. 2012. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant Cell*, **24**(9), 3725-41.
- Sidorov, V.A., Kasten, D., Pang, S.Z., Hajdukiewicz, P.T., Staub, J.M. y Nehra, N.S. 1999. Technical Advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*, **19**(2), 209-216.

- Sinagawa-Garcia, S.R., Tungsuchat-Huang, T., Paredes-Lopez, O. y Maliga, P. 2009. Next generation synthetic vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Mol Biol*, **70**(5), 487-98.
- Singh, A.K., Verma, S.S. y Bansal, K.C. 2010. Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res*, **19**(1), 113-9.
- Smith, S.E. 1989. Influence of parental genotype on plastid inheritance in *Medicago sativa*. *J Hered*, **80**(3), 214-7.
- Sørensen, I., Domozych, D. y Willats, W.G.T. 2010. How Have Plant Cell Walls Evolved? *Plant Physiology*, **153**(2), 366-372.
- Soriano, M., Diaz, P. y Pastor, F.I.J. 2006. Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin. *Microbiology*, **152**(3), 617-625.
- Souza, F.H.M., Meleiro, L.P., Machado, C.B., Zimbardi, A.L.R.L., Maldonado, R.F., Souza, T.A.C.B., Masui, D.C., Murakami, M.T., Jorge, J.A., Ward, R.J. y Furriel, R.P.M. 2014. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **106**(0), 1-10.
- Sriraman, P., Silhavy, D. y Maliga, P. 1998. The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res*, **26**(21), 4874-9.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. y Russell, D.A. 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, **18**(3), 333-8.

- Staub, J.M. y Maliga, P. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA. *EMBO J*, **12**(2), 601-6.
- Staub, J.M. y Maliga, P. 1995. Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J*, **7**(5), 845-8.
- Staub, J.M. y Maliga, P. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell*, **4**(1), 39-45.
- Staub, J.M. y Maliga, P. 1994. Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J*, **6**(4), 547-53.
- Stern, D.S., Higgs, D.C. y Yang, J. 1997. Transcription and translation in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, **2**(8), 308-315.
- Stiekema, W.J., Heidekamp, F., Dirkse, W.G., van Beckum, J., de Haan, P., Bosch, C.T. y Louwerse, J.D. 1988. Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol Biol*, **11**(3), 255-69.
- Sugita, M. y Sugiura, M. 1996. Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol*, **32**(1-2), 315-26.
- Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol*, **19**(1), 149-168.
- Sugiura, M. 2008. RNA Editing in Chloroplasts, (Ed.) H.U. Göringer, Vol. 20, Springer Berlin Heidelberg, pp. 123-142.
- Sugiura, M., Wakasugi, T. y Kung, S.d. 1989. Compilation and comparison of transfer RNA genes from tobacco chloroplasts. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **8**(2), 89-101.
- Sutherland, G.R.J. y Aust, S.D. 1996. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **332**(1), 128-134.



- Suzuki, J.Y., Sriraman, P., Svab, Z. y Maliga, P. 2003. Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell*, **15**(1), 195-205.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. 1990a. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(21), 8526-30.
- Svab, Z., Harper, E.C., Jones, J.D. y Maliga, P. 1990b. Aminoglycoside-3'-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, **14**(2), 197-205.
- Svab, Z. y Maliga, P. 2007. Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(17), 7003-8.
- 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), 913-7.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J Bacteriol*, **179**(8), 2503-11.
- Taylor, N.L., Stroher, E. y Millar, A.H. 2014. Arabidopsis organelle isolation and characterization. *Methods Mol Biol*, **1062**, 551-72.
- Teeri, T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, **15**(5), 160-167.
- Thorpe, H.M. y Smith, M.C.M. 1998. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase

- family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(10), 5505-5510.
- Thorpe, H.M., Wilson, S.E. y Smith, M.C. 2000. Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol Microbiol*, **38**(2), 232-41.
- Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schottler, M.A. y Bock, R. 2012. The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J*, **69**(2), 302-16.
- Tonouchi, A., Hara, Y., Umehara, R., Sanuki, T., Fukusawa, T. y Miyairi, K. 2010. Cloning of the gene encoding an endo-acting pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**(2), 433-6.
- Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G. y Maliga, P. 2003. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, **31**(4), 1174-9.
- Tungsuchat-Huang, T., Sinagawa-Garcia, S.R., Paredes-Lopez, O. y Maliga, P. 2010. Study of plastid genome stability in tobacco reveals that the loss of marker genes is more likely by gene conversion than by recombination between 34-bp loxP repeats. *Plant Physiol*, **153**(1), 252-9.
- Uchima, C., Tokuda, G., Watanabe, H., Kitamoto, K. y Arioka, M. 2011. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the termite *Neotermes kosshunensis* in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**(6), 1761-1771.
- Urek, R.O. y Pazarlioglu, N.K. 2004. *Process Biochemistry*, **39**, 2061-2068.

- 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 Res*, **20**(1), 137-51.
- Valkov, V.T., Scotti, N., Kahlau, S., Maclean, D., Grillo, S., Gray, J.C., Bock, R. y Cardi, T. 2009. Genome-wide analysis of plastid gene expression in potato leaf chloroplasts and tuber amyloplasts: transcriptional and posttranscriptional control. *Plant Physiol*, **150**(4), 2030-44.
- Vera, A. y Sugiura, M. 1995. Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr Genet*, **27**(3), 280-4.
- Verma, D. y Daniell, H. 2007. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol*, **145**, 1129 - 1143.
- Verma, D., Jin, S., Kanagaraj, A., Singh, N.D., Daniel, J., Kolattukudy, P.E., Miller, M. y Daniell, H. 2013. Expression of fungal cutinase and swollenin in tobacco chloroplasts reveals novel enzyme functions and/or substrates. *PLoS One*, **8**(2), e57187.
- Verma, D., Kanagaraj, A., Jin, S., Singh, N.D., Kolattukudy, P.E. y Daniell, H. 2010. Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnol J*, **8**(3), 332-50.
- Viitanen, P.V., Devine, A.L., Khan, M.S., Deuel, D.L., Van Dyk, D.E. y Daniell, H. 2004. Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Echerichia coli* ubiC gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol*, **136**(4), 4048-60.

- Wakasugi, T., Tsudzuki, T. y Sugiura, M. 2001. The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynth Res*, **70**(1), 107-18.
- Wakuta, S., Hamada, S., Ito, H., Matsuura, H., Nabeta, K. y Matsui, H. 2010. Identification of a  $\beta$ -glucosidase hydrolyzing tuberonic acid glucoside in rice (*Oryza sativa* L.). *Phytochemistry*, **71**(11–12), 1280-1288.
- Wang, H., Li, X., Ma, Y. y Song, J. 2014. Characterization and high-level expression of a metagenome-derived alkaline pectate lyase in recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, **49**(1), 69-76.
- Wang, H., Yin, W. y Hu, Z. 2009. Advances in chloroplast engineering. *J Genet Genomics*, **36**, 387 - 398.
- Wani, S.H., Haider, N., Kumar, H. y Singh, N. 2010. Plant plastid engineering. *Current Genomics*, **11**(7), 500.
- Watson, J., Koya, V., Leppla, S.H. y Daniell, H. 2004. Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine*, **22**(31-32), 4374-84.
- Wegener, C.B. y Olsen, O. 2004. Heterologous pectate lyase isoenzymes are not different in their effects on soft rot resistance in transgenic potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**(2), 59-66.
- Wei, H., Xu, Q., Taylor li, L.E., Baker, J.O., Tucker, M.P. y Ding, S.-Y. 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(3), 330-338.
- Westhoff, P. y Herrmann, R.G. 1988. Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur J Biochem*, **171**(3), 551-64.

- Wilson, D.B. 2009. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(3), 295-299.
- Wong, D.W. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, **157**(2), 174-209.
- Wood, T.M. y Bhat, K.M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. in: *Methods in Enzymology*, (Ed.) S.T.K. Willis A. Wood, Vol. Volume 160, Academic Press, pp. 87-112.
- Wu, S., Jiang, Z., Kempinski, C., Eric Nybo, S., Husodo, S., Williams, R. y Chappell, J. 2012. Engineering triterpene metabolism in tobacco. *Planta*, **236**(3), 867-77.
- Xia, J., Martinez, A., Daniell, H. y Ebert, S.N. 2011. Evaluation of biolistic gene transfer methods in vivo using non-invasive bioluminescent imaging techniques. *BMC Biotechnol*, **11**, 62.
- Xie, G. y Allison, L.A. 2002. Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco atpB NEP promoter in chloroplasts in vivo. *Curr Genet*, **41**(3), 176-82.
- Yan, T.-R. y Lin, C.-L. 1997. Purification and Characterization of a Glucose-tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**(6), 965-970.
- Yang, H., Gray, B.N., Ahner, B.A. y Hanson, M.R. 2013. Bacteriophage 5' untranslated regions for control of plastid transgene expression. *Planta*, **237**(2), 517-27.
- Ye, G.N., Hajdukiewicz, P.T., Broyles, D., Rodriguez, D., Xu, C.W., Nehra, N. y Staub, J.M. 2001. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate

- synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, **25**(3), 261-70.
- Yu, L., Gray, B., Rutzke, C., Walker, L., Wilson, D. y Hanson, M. 2007. Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *J Biotechnol*, **131**, 362 - 369.
- Yu, W. y Spreitzer, R.J. 1992. Chloroplast heteroplasmy is stabilized by an amber-suppressor tryptophan tRNA (CUA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**(9), 3904-3907.
- Yukawa, M., Tsudzuki, T. y Sugiura, M. 2006. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics*, **275**(4), 367-73.
- Zanoelo, F.F., Polizeli, M.d.L.T.d.M., Terenzi, H.F. y Jorge, J.A. 2004.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiology Letters*, **240**(2), 137-143.
- Zhang, J., Ruf, S., Hasse, C., Childs, L., Scharff, L.B. y Bock, R. 2012a. Identification of cis-elements conferring high levels of gene expression in non-green plastids. *Plant J*, **72**(1), 115-28.
- Zhang, Q., Zhang, W., Lin, C., Xu, X. y Shen, Z. 2012b. Expression of an *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in transgenic rice seeds. *Protein Expression and Purification*, **82**(2), 279-283.
- Zhou, F., Badillo-Corona, J.A., Karcher, D., Gonzalez-Rabade, N., Piepenburg, K., Borchers, A.M., 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.
- Zhou, F., Karcher, D. y Bock, R. 2007. Identification of a plastid intercistronic expression element (IEE) facilitating the expression of stable translatable monocistronic mRNAs from operons. *Plant J*, **52**(5), 961-72.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, **6**(2), 66-71.
- Zicker, A.A., Kadakia, C.S. y Herrin, D.L. 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 Mol Biol*, **63**(5), 689-702.
- Zoschke, R., Liere, K. y Borner, T. 2007. From seedling to mature plant: arabidopsis plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant J*, **50**(4), 710-22.
- Zoubenko, O.V., Allison, L.A., Svab, Z. y Maliga, P. 1994. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res*, **22**(19), 3819-24.
- Zurbriggen, M.D., Tognetti, V.B., Fillat, M.F., Hajirezaei, M.R., Valle, E.M. y Carrillo, N. 2008. Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol*, **26**(10), 531-7.