



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

**“MODELAMIENTO *IN SILICO*, UN MECANISMO DE PREDICCIÓN PARA
EL ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CAROTENOGÉNICO *psy* DE
Dunaliella sp”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
Previa a la obtención de Título de:
BIÓLOGO MARINO

AUTOR:

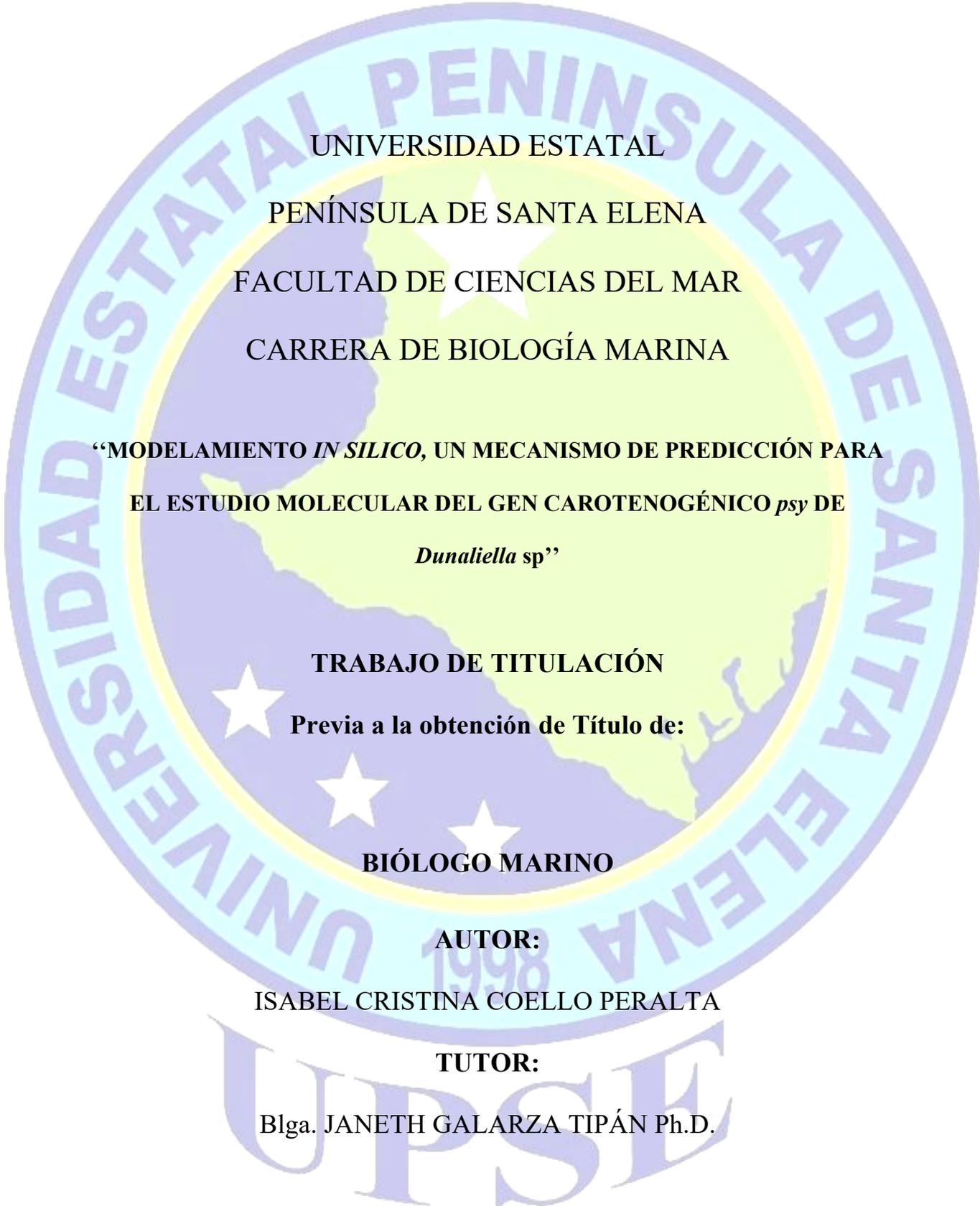
ISABEL CRISTINA COELLO PERALTA

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2022



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

“MODELAMIENTO *IN SILICO*, UN MECANISMO DE PREDICCIÓN PARA
EL ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CAROTENOGÉNICO *psy* DE
Dunaliella sp”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previa a la obtención de Título de:

BIÓLOGO MARINO

AUTOR:

ISABEL CRISTINA COELLO PERALTA

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2022

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional durante mi
trayectoria académica.

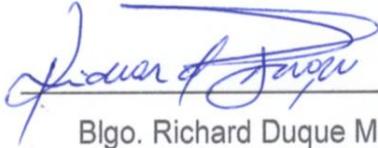
AGRADECIMIENTO

A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

En particular a la Blga. Janeth Galarza Ph.D., tutora de tesis porque con sus ideas científicas profesionales orientó nuestro trabajo.

A mis padres y hermanos, por ser mi apoyo incondicional y que siempre me impulsaron a hacer lo mejor durante todo este proceso.

TRIBUNAL DE GRADO



Blgo. Richard Duque Marin, Mgt.
DECANO DE LA FACULTAD



Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE CARRERA



Firmado electrónicamente por:
**ISABEL JANETH
GALARZA TIPAN**

Blga. Janeth Galarza, Ph.D:
DOCENTE TUTOR



Blga. Ericka Salavarría Palma, Ph.D
DOCENTE DE ÁREA



Abg. Víctor Coronel Ortiz, M.Sc.
SECRETARIO GENERAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por las ideas, hechos, investigación y resultados expuestos en este trabajo de titulación, pertenece exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Isabel Cristina Coello Peralta

C.I: 0301902664

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. OBJETIVOS	9
5.1. Objetivo General	9
5.2. Objetivos específicos	9
6. HIPÓTESIS	10
7. MARCO TEÓRICO	11
7.1. Las microalgas y su importancia	11
7.1.1. Género <i>Dunaliella</i> : Caracterización Morfológica y fisiológica	12
7.1.2. Importancia del Género <i>Dunaliella</i>	14
7.2. Producción de carotenoides a partir de microalgas.....	15
7.2.1. Biosíntesis de carotenoides	17
7.2.2. Enzima fitoeno sintasa (gen <i>psy</i>)	18
7.3. Modelamiento <i>in silico</i>	20
7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) <i>in silico</i>	21
7.5. Patrones de digestión <i>in silico</i>	23
7.5.1. Enzimas de restricción	23
7.6. Clonación <i>in silico</i>	24
7.6.1. Tipos de vectores de clonación	26
7.7. Transformación bacteriana.....	28
7.7.1. Plataforma o programa BioRender.....	29
8. MARCO METODOLÓGICO.....	30
8.1. Alineamiento de secuencias y regiones conservadas	30
8.1.1. Selección de secuencias del gen <i>psy</i>	30
8.1.2. Alineamiento de secuencias	30
8.2. Diseño de partidores universales y específicos	31
8.2.1. Amplificación <i>in silico</i> del gen <i>psy</i>	31
8.3. Patrones de restricción modelados <i>in silico</i>	31
8.4. Clonación <i>in silico</i>	32
8.4.1. Transformación de bacteria	33

8.4.2.	El diseño de la selección	34
9.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	35
9.1.	Alineamiento de secuencias y análisis de regiones conservadas	35
9.1.1.	Alineamiento doble.....	35
9.1.2.	Alineamiento múltiple.....	42
9.2.	Diseño de partidores y Amplificación <i>in silico</i> del gen <i>psy</i>	43
9.2.1.	Partidores específicos	43
9.2.2.	Partidores universales.....	46
9.3.	Patrones de restricción modelados <i>in silico</i>	49
9.4.	Clonación <i>in silico</i>	55
9.4.1.	Diseño de cassette de clonación	55
9.4.2.	Diseño del vector de clonación	56
9.4.3.	Transformación de bacteria	58
9.4.4.	Diseño de selección	59
10.	DISCUSIÓN.....	62
10.1.	General.....	62
10.1.1.	Alineamiento doble.....	64
10.1.2.	Alineamiento múltiple.....	66
10.2.	Diseño de partidores y amplificación <i>in silico</i>	66
10.3.	Patrones de restricción modelados <i>in silico</i>	69
10.4.	Clonación <i>in silico</i>	70
10.4.1.	Diseño del cassette de clonación.....	70
10.4.2.	Diseño del vector de clonación	71
10.4.3.	Transformación de bacteria	74
10.4.4.	Diseño de selección	75
11.	CONCLUSIONES.....	76
12.	RECOMENDACIONES.....	78
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	79
14.	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Biosíntesis de carotenoides y rutas metabólicas relacionadas (Aguilera, 2018).	17
Figura 2 Alineamiento doble de la primera secuencia seleccionada del gen psy perteneciente a la especie <i>Dunaliella salina</i>	39
Figura 3 Alineamiento doble de la segunda secuencia seleccionada del gen psy perteneciente a la especie <i>Dunaliella bardawil</i>	39
Figura 4 Alineamiento doble de la tercera secuencia seleccionada del gen psy perteneciente a la especie <i>Dunaliella bardawil</i>	40
Figura 5 Alineamiento doble de la cuarta secuencia seleccionada del gen psy perteneciente a la especie <i>Dunaliella salina</i>	40
Figura 6 Gráfico del alineamiento donde se demuestra la distribución de las 4 secuencias del gen psy pertenecientes al género <i>Dunaliella</i>	42
Figura 7 Alineamiento múltiple de 4 secuencias del gen psy pertenecientes al género <i>Dunaliella</i> . A: Vista general de una región conservada dentro del alineamiento; B: Vista general de una región variable dentro del alineamiento.	43
Figura 8 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-001F y PSY-001R, con un producto amplificado de 464 pb.	44
Figura 9 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-002F y PSY-002R, con un producto amplificado de 412 pb.	46
Figura 10 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-003F y PSY-003R, con un producto amplificado de 1218 pb.	47
Figura 11 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-004F y PSY-004R, con un producto amplificado de 1302 pb.	48
Figura 12 Mapa de restricción modelado in silico a través del programa BioEdit.....	49
Figura 13 Mapa de restricción modelado in silico a través del programa BioEdit.....	50
Figura 14 Mapa de restricción lineal in silico de la secuencia consenso para secuencias del género <i>Dunaliella</i> con el gen psy, representando las enzimas seleccionadas en el programa NEBcutter 2.0.	51
Figura 15 Mapa de restricción lineal in silico de la secuencia consenso para secuencias del género <i>Dunaliella</i> con el gen psy, representando las enzimas seleccionadas en el programa NEBcutter 2.0.	52
Figura 16 Modelamiento in silico del patrón de restricción para el gen psy de <i>Dunaliella</i> . Las líneas corresponden al tamaño de los fragmentos producidos por la digestión con las enzimas (BceAI, BsgI y BsrI), PM: marcador de peso molecular 1Kb, en gel de agarosa al 1%.	53
Figura 17 Modelamiento in silico del patrón de restricción del gen psy de <i>Dunaliella</i> . Las líneas corresponden al tamaño de los fragmentos producidos por la digestión con las	

enzimas (HaeII, HgaII y MboII), PM: marcador de peso molecular 1Kb, en gel de agarosa al 1%.....	54
Figura 18 Cassette de clonación/expresión diseñado como inserto para clonarlo en el vector Topo.....	55
Figura 19 Vector comercial pCR2.1-TOPO (3.9 Kb).....	57
Figura 20 Vector de clonación TOPO-PSY DUNALIELLA (6.1 Kb).....	57
Figura 21 Vector de clonación lineal TOPO-PSY DUNALIELLA (6.1 Kb).....	58
Figura 22 Esquema sobre la transformación de bacterias utilizando programa BioReder.....	59
Figura 23 Esquema de la selección y conservación de bacterias transformadas, utilizando el programa BioReder.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de secuencias que producen alineaciones significativas entregadas por el programa BLAST, entre organismos que contienen el gen psy. La tabla indica el % de cobertura y % de similitud e identidad entre estas especies.	36
Tabla 2 Descripción de secuencias del gen psy del género Dunaliella. Los datos registran los porcentajes de cobertura y similitud.	37
Tabla 3 Descripción de las mutaciones existentes dentro las secuencias alineadas del gen psy. La tabla completa se puede observar en el Anexo 1.	41
Tabla 4 Partidores diseñados para la amplificación de la secuencia del gen psy de Dunaliella salina.	44
Tabla 6 Partidores universales diseñados para la amplificación del gen psy del género Dunaliella.	47
Tabla 7 Partidores universales diseñados para la amplificación del gen psy del género Dunaliella.	48
Tabla 8 Descripción de los números de fragmentos, sitios de corte y tamaño de los fragmentos de la secuencia consenso.	50
Tabla 9 Descripción de los números de fragmentos, sitios de restricción y tamaño de los fragmentos de la secuencia consenso.	51

GLOSARIO

Material genético

Se refiere al ADN o ARN que se encuentra en el núcleo, las mitocondrias y el citoplasma de las células. Estos ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas por nucleótidos de los cuales hay cuatro en cada molécula.

Gen

El gen es la unidad física básica de la herencia, estos genes se transmiten de los padres a la descendencia y contienen información necesaria para fines puntuales. Los genes se encuentran en los cromosomas.

Banco de secuencias

Base de datos que contiene una o más secuencias de ADN, ARN o proteínas. Varios de estos bancos son públicos y pueden ser consultados en internet.

Herramientas bioinformáticas

Son programas o software que permiten el análisis de secuencias de interés con el fin de realizar modelamientos *in silico* para predecir resultados experimentales.

Modelamiento *in silico*

Simulación de procesos biológicos por medio de herramientas bioinformáticas en computadoras.

Amplificación *in silico*

Es una técnica utilizada para amplificar o copiar un objetivo de ADN específico de una mezcla de moléculas de ADN con ayuda de un software o programa.

Partidores

Es una secuencia corta de ADN de cadena simple que contiene un extremo 3' libre complementario con una cadena de ADN y funciona como punto de inicio para la adición de nucleótidos que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Patrones de restricción *in silico*

Son patrones modelados *in silico* que permiten encontrar la secuencia de genes dentro de una molécula de ADN, esta se fragmenta a causa de las enzimas de restricción, cada fragmento puede ser visualizado en la electroforesis.

Enzimas de restricción

Son enzimas que reconocen sitios diana dentro de la secuencia de interés, donde realizan cortes de tipo romo y cohesivo.

Sitio de restricción

Lugar diana donde cortan las enzimas de restricción para formar fragmentos en la secuencia de ADN específica.

ABREVIATURAS

<i>psy</i>	Fitoeno sintasa
<i>pds</i>	Fitoeno desaturasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rcbL	Subunidad mayor del gen de la ribulosa bifosfato carboxilasa
IPP	Isopentil difosfato
DMAPP	Dimetilalil difosfato
GPP	Geranilpirofosfato
FPP	Farnesilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato

1. RESUMEN

El uso de herramientas bioinformáticas es indispensable para realizar modelamientos *in silico* con el fin de predecir resultados experimentales. Existen gran cantidad de microalgas como recurso no explotado en la parte biotecnológica debido al desconocimiento de los genes involucrados en la ruta metabólica de carotenoides en especies del género *Dunaliella*, como lo es el gen *psy* (fitoeno sintasa). El cual participa en sitios regulatorios clave en la ruta de los carotenoides, por tal razón en este trabajo se aplicó el modelamiento *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas, tomando como patrón el gen *psy* de *Dunaliella* sp, como mecanismo de análisis de predicción en diversos procesos celulares moleculares. Se llevó a cabo mediante el alineamiento de secuencias, amplificación *in silico* del gen *psy* utilizando los partidores específicos y universales, además de la elaboración de patrones de restricción *in silico* y clonación *in silico*. En el alineamiento doble de las 4 secuencias del gen *psy* se evidenciaron las mutaciones de tipo por sustitución, inserción y delección, mientras que el alineamiento múltiple nos permitió reconocer las regiones conservadas, dentro de las cuales se pudo diseñar partidores específicos PSY-001F/PSY-001R y PSY-002F/PSY-002R los cuales generaron un amplicón de 464 pb y 412 pb respectivamente y partidores universales PSY-003F/PSY-003R y PSY-004F/PSY-004R los cuales generaron un amplicón de 1218 pb y 1302 pb respectivamente. Los 2 patrones de restricción modelados *in silico* fueron diseñados a partir de la secuencia consenso de 1302 pb, en donde se utilizaron las enzimas *BceAI*, *BsgI*, *BsrI*, *HgaI*, *MboII* y *HaeII* que generaron fragmentos que variaron en tamaños entre 12 pb y 363 pb. El cassette de clonación resultó en un inserto 5' rcbL/gen *psy*/rcbL3' con un tamaño de 2142 pb, mismo que fue clonado *in silico* en el vector comercial pCR2.1-TOPO, obteniendo el vector denominado TOPO-PSY DUNALIELLA con un tamaño de 6.1 Kb y para asegurar la amplificación del vector se transformó en bacterias de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el uso de herramientas bioinformáticas ayudan a la elaboración modelamientos *in silico* que aportan al conocimiento e investigación científica.

Palabras claves: gen *psy* (fitoeno sintasa), *Dunaliella* sp, beta-caroteno, modelamiento *in silico*, programas bioinformáticos.

ABSTRACT

The use of bioinformatic tools is essential to carry out *in silico* modeling in order to predict experimental results. There is a large amount of microalgae as an unexploited resource in the biotechnological part due to the lack of knowledge of the genes involved in the metabolic pathway of carotenoids in species of the *Dunaliella* genus, such as the *psy* gene (phytoene synthase). Which participates in key regulatory sites in the carotenoid pathway, for this reason *in silico* modeling was applied in this work using bioinformatic tools, taking the *psy* gene of *Dunaliella* sp as a pattern, as a mechanism for predictive analysis in various molecular cellular processes. It was carried out by sequence alignment, *in silico* amplification of the *psy* gene using specific and universal primers, in addition to the elaboration of *in silico* restriction patterns and *in silico* cloning. In the double alignment of the 4 sequences of the *psy* gene, the mutations of type by substitution, insertion and selection were evidenced, while the multiple alignment recognized the conserved regions, within which it was possible to design specific primers PSY-001F/PSY-001R y PSY-002F/PSY-002R which generated an amplification of 464 pb and 412 pb respectively and universal primers PSY-003F/PSY-003R y PSY-004F/PSY-004R which generated an amplification of 1218 bp and 1302 bp respectively. The 2 restriction patterns modeled *in silico* were designed from the consensus sequence of 1302 bp, where the enzymes *BceAI*, *BsgI*, *BsrI*, *HgaI*, *MboII* and *HaeII* were used to generate fragments that varied in size between 12 bp and 363 bp. The cloning cassette resulted in a 5' rcbL/*psy* gene/rcbL3' insert with a size of 2142 bp, which was cloned *in silico* in the commercial vector pCR2.1-TOPO, obtaining the vector called TOPO-PSY DUNALIELLA with a size of 6.1 Kb and to ensure the amplification of the vector it was transformed into *Escherichia coli* bacteria. The results obtained in this work show that the use of bioinformatic tools help the development of *in silico* modeling that contribute to knowledge and scientific research.

Keywords: *psy* gene (phytoene synthase), *Dunaliella* sp, beta-carotene, *in silico* modeling, bioinformatic programs.

2. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son los pigmentos más diversos encontrados en la naturaleza, son sintetizados por algunos organismos no fotosintéticos como bacterias y hongos (Couso et al., 2011) y se encuentran presentes en todos los organismos fotosintéticos, donde juegan un papel fundamental en la recepción y protección contra el daño fotooxidativo por su alto poder antioxidante (Takaichi, 2011). En *D. salina* los diferentes parámetros que controlan los niveles de estrés tales como salinidad, temperatura, deficiencia de nitrógeno y flujo de fotones, son incitadores para la síntesis de beta-caroteno, además provocan una elevada acumulación de este pigmento (Wan et al., 2019).

El alga unicelular *Dunaliella* spp puede encontrarse en ambientes con alta intensidad lumínica, elevada salinidad y deficiencia de nutrientes (Coesel et al., 2008). En respuesta a los estresores abióticos, *D. salina* acumula gran cantidad de beta-caroteno en su cloroplasto hasta llegar a un 14% de su peso seco (Fariz, 2019). Lo que hace que *Dunaliella* spp sea el organismo ideal para la producción de beta-caroteno a gran escala biotecnológica. Las microalgas del género *Dunaliella* (Chlorophyta) presentan un gran cloroplasto que abarca el mayor volumen en la célula, además que no presentan pared celular. En *Dunaliella salina* numerosas gotas de aceite pueden acumularse en los espacios intertilacoidales situados en la periferia del cloroplasto; esas gotas contienen carotenoides que cumplen la función

de proteger y absorber la luz excesiva antes de que pase a los fotosistemas (Coesel et al., 2008).

Las primeras dos enzimas comprometidas en la ruta metabólica biosintética de los carotenoides son fitoeno sintasa (gen *psy*) y fitoeno desaturasa (gen *pds*). Estos genes están controlados en respuesta a estímulos ambientales y se considera que cumplen un papel fundamental en la regulación de carotenogénesis (Pillacela, 2019) y en microalgas clorofitas como en el caso de *D. salina* (Grossman et al., 2004).

El gen *psy* ha sido regularmente estudiado, mientras que el gen *pds* ha sido fuertemente estudiado a nivel molecular, utilizando herramientas bioinformáticas por ejemplo los mapas de restricción, clonación de genes, distancias genéticas, estructuras y funcionamiento de proteínas (Galarza et al., 2018; Pillacela, 2019; Li et al., 2013; Jiménez y Chaparro, 2016). Estas herramientas bioinformáticas permiten desarrollar modelamientos *in silico* del gen de interés para demostrar su actividad biológica; además, se encuentran altamente caracterizados y testeados estadísticamente para modelar un proceso o producto biológico, como lo es la ruta carotenogénica (Huang et al., 2008). Existen varios programas bioinformáticos útiles para estos estudios moleculares, como son: NEBcutter 2.0, BioEdit Sequence Alignment Editor, OligoCalc y SnapGene.

El uso de estas herramientas bioinformáticas o software permiten escoger libremente las secuencias de interés ya sean promotoras, terminadoras, genes, regiones conservadas, regiones no conservadas, alineamientos de secuencias, construir partidores, reconocer sitios de restricción que faciliten la manipulación en la parte experimental en un laboratorio, entre otros; todas estas aplicaciones mejoran significativamente los estudios moleculares en los niveles de expresión genética (Li et al., 2013; Jiménez y Chaparro, 2016).

Está demostrado que al momento de realizar estudios a nivel molecular los modelamientos *in silico* resultan muy útiles, indispensables y versátiles, debido a que permiten al investigador la manipulación de varias variables en las secuencias de ADN, ARN o de aminoácidos, además de permitirle tomar decisiones acertadas y concretas sobre el organismo en estudio (Jiménez y Chaparro, 2016; Pillacela, 2019).

Los modelamientos *in silico* ayudan a los investigadores a predecir reacciones biológicas, comprender actividades celulares y tomar decisiones importantes antes de realizar trabajos experimentales, además, estos análisis ayudan a minimizar gastos de reactivos, tiempo y falsos positivos. De la misma manera, gracias a que se cuenta con el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica), que es

una plataforma universal donde se encuentran las secuencias de ADN, ARN y proteínas, facilita los análisis *in silico*. Con base en estos antecedentes en este trabajo se propone aplicar el modelamiento *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas, tomando como patrón el gen *psy* de *Dunaliella* sp, como mecanismo de análisis de predicción en diversos procesos celulares moleculares.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe gran cantidad de microalgas como recurso no explotado en la parte biotecnológica para la producción de beta-caroteno debido al desconocimiento del potencial que presentan estos microorganismos. Además, no se tiene conocimiento acerca de los genes involucrados en la ruta metabólica de biosíntesis de carotenoides en *Dunaliella* sp, por ejemplo el gen *psy* (fitoeno sintasa), que es la primera enzima clave involucrada en el inicio de la biosíntesis de los carotenoides. Si no existe un estudio molecular basado en el modelamiento *in silico* no se puede predecir la reacción de tales procesos; en la actualidad no hay el conocimiento suficiente para que los modelamientos ayuden a conocer los procesos celulares, si no existieran estos estudios *in silico* el investigador pierde tiempo y dinero, debido a que experimentaría varias veces, teniendo resultados erróneos o falsos positivos. No hay estudios *in silico* del gen *psy* a pesar de ser un importante gen de la vía metabólica de los carotenoides y para iniciar estudios moleculares y de biotecnología se necesita conocer dicho gen.

4. JUSTIFICACIÓN

El gen *psy* (fitoeno sintasa) participa en sitios regulatorios claves en la ruta metabólica de la biosíntesis de carotenoides por lo que su estudio y expresión contribuirá a un mejor entendimiento de la biogénesis del beta-caroteno, con lo cual aportará información valiosa a el área biotecnológica. Los modelamientos *in silico* de genes son desarrollados con ayuda de herramientas bioinformáticas que al momento de realizar estudios a nivel molecular resultan muy útiles, indispensables y versátiles, debido a que permiten al investigador la manipulación de varias variables en las secuencias de ADN, además de permitirle tomar decisiones convenientes y específicas sobre el organismo en estudio (Jiménez y Chaparro, 2016; Pillacela, 2019). El uso de estas herramientas bioinformáticas o software permiten escoger libremente las secuencias de interés ya sean promotoras, terminadoras, genes, regiones conservadas, regiones no conservadas, alineamientos de secuencias, construir partidores, reconocer sitios de restricción que faciliten la manipulación en la parte experimental en un laboratorio, entre otros; todas estas aplicaciones mejoran significativamente los estudios moleculares en los niveles de expresión genética (Li et al., 2013; Jiménez y Chaparro, 2016). Por último, en el caso de clonación *in silico*, estos software permiten una simulación completa de la clonación y esto hace que se minimice la probabilidad de error al momento de realizar la clonación *in vitro*, lo que conlleva a una optimización de tiempo, disminución de costos (González et al., 2015).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Aplicar el modelamiento *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas, tomando como patrón el gen *psy* de *Dunaliella* sp, como mecanismo de análisis de predicción en diversos procesos celulares moleculares.

5.2. Objetivos específicos

- Analizar las secuencias del gen *psy* de *Dunaliella* sp, obtenidas desde el GenBank y mediante alineamientos seleccionar las regiones altamente conservadas para el diseño de partidores.
- Amplificar *in silico* el gen *psy*, utilizando partidores universales y específicos para la identificación del gen en estudio.
- Obtener *in silico* patrones de digestión del gen *psy* utilizando varias enzimas de restricción.
- Resguardar el gen *psy* de *Dunaliella* sp, en un plásmido comercial mediante la clonación *in silico*.

6. HIPÓTESIS

Si el modelamiento *in silico* permite predecir procesos celulares entonces, el modelamiento del gen *psy* de *Dunaliella* sp nos entregará información confiable para estudios experimentales.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Las microalgas y su importancia

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas capaces de convertir la energía lumínica en energía química en la fotosíntesis. Estas cuentan con una amplia variedad de formas, tamaños, pigmentaciones y hábitats ya que se pueden encontrar en ríos, lagos mares y otros hábitats similares (Fariz, 2019).

Dentro del grupo de las microalgas se encuentran las clorofitas que generalmente contienen mayor contenido de carotenoides frente a las plantas superiores (García, 2011). Como es el caso de las especies *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*, que presentan valores valiosos de beta-caroteno, además de ser ricas en glicerol y proteína (Gómez, 1997).

Desde hace muchos años atrás, las microalgas han sido utilizadas para mejorar la calidad del medio ambiente, debido a que tienen la capacidad de degradar materia orgánica en aguas residuales (Fariz, 2019). La importancia de las microalgas para el ser humano se basa en las propiedades de los compuestos bioactivos que contienen estos microorganismos para la salud humana y uso comercial como: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), vitaminas y carotenoides como el beta-

caroteno, astaxantina, luteína (Vila, 2010). Otras de las aplicaciones de las microalgas es en la alimentación animal siendo el uso más antiguo (Vila, 2010); mayormente en el área de la acuicultura, donde se utilizan como alimento vivo para crustáceos, como biomasa para bivalvos y cultivo de peces como salmónidos ya que los pigmentos como el beta-caroteno y la astaxantina presentes en las microalgas, les incrementan el color rosado de la masa muscular (Gómez et al., 2019).

7.1.1. Género *Dunaliella*: Caracterización Morfológica y fisiológica

El género *Dunaliella* presenta pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y b (Ramos, 2009). Las algas del género *Dunaliella* (Chlorophyta, Chlorophyceae), crecen en ambientes acuáticos con un elevado grado de salinidad (Parra et al., 1990). Además, presentan formas unicelulares móviles de morfología variable, que pueden cambiar debido a las condiciones de cultivo, tomando una forma esférica bajo condiciones de estrés (Ramos, 2009). Las microalgas dentro de este género tienen la capacidad de producir y acumular elevadas cantidades de beta-caroteno (Ramos et al., 2011).

Además, las especies de este género tienen una forma ovoide bajo condiciones normales, más anchas en la región basal y estrechas en la parte anterior y bajo condiciones adversas las células presentan formas esféricas, no motiles, cubiertas

por una pared de mucus con textura gelatinosa (Preising, 1992). Cada célula presenta un único cloroplasto parietal en forma de copa que ocupa gran parte de la célula, con un pirenoide embebido en la región basal, donde a su alrededor se acumulan polisacáridos de reserva, el núcleo se localiza en la mitad anterior de la célula, que muchas veces se describe como una mancha ocular (Gómez, 1997). El sistema flagelar es un patrón típico de dos flagelos isomorfos de igual tamaño (Fariz, 2019).

Este género presenta dos subgéneros: *Pascheria* que incluye especies de agua dulce y *Dunaliella* que incluye 23 especies de agua marina (Guiry y Guiry, 2008; López, 2008). A continuación, se presenta su escala taxonómica obtenida desde la página de Algaebase:

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Dunaliellaceae

Género: *Dunaliella*

7.1.2. Importancia del Género *Dunaliella*

Las microalgas eucariotas como las del género *Dunaliella*, son utilizadas biotecnológicamente gracias a su habilidad de acumular glicerol y beta-caroteno ante una respuesta de estrés osmótica (Srinivasan et al., 2017). Esta aplicación biotecnológica es conocida como bioprospección o prospección de la biodiversidad, la cual consiste en la búsqueda sistemática de genes y compuestos naturales para el desarrollo de productos beneficiosos para la humanidad sin alterar la naturaleza (Morgado y Vieira, 2020).

Desde el año 1980, en varios países como Australia, China, Israel e India, se ha desarrollado el incremento del cultivo a gran escala de las especies de algas de este género (Campo et al., 2007). En respuesta a estresores externos como variaciones de salinidad, temperatura y deficiencia de nutrientes, *Dunaliella salina* sintetiza y acumula beta-caroteno como gotas de lípidos en el estroma de los cloroplastos (Coesel et al., 2008; Ramos, 2009).

Por lo tanto, la importancia de este género de microalgas consiste en que este producto beta-caroteno tiene un impacto económico elevado, debido a las aplicaciones industriales que puede tener, como por ejemplo: en la salud humana como elaboración de medicamentos por la capacidad antioxidante de los

carotenoides, en la cosmética con la creación de cremas de regeneración, cremas antiarrugas o cremas anti-irritantes; en la acuicultura en el uso de alimento vivo para los organismos en cultivo, aportándoles carotenoides que son asimilados como vitamina A en animales y como biodiesel o bioetanol para uso industrial (Coesel et al., 2008; Morgado y Vieira, 2020).

7.2. Producción de carotenoides a partir de microalgas

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales encontrados en plantas, bacterias, animales y hongos. Son sintetizados *de novo* por organismos fotosintéticos y en ciertas ocasiones por microorganismos no fotosintéticos como bacterias y hongos, mientras los animales son incapaces de sintetizarlos, no obstante, pueden metabolizar y cambiar químicamente la estructura de ciertos carotenoides que ingieren en la dieta para poder ser asimilados. En organismos unicelulares como las microalgas, los carotenoides se comportan como pigmentos accesorios para la captación de fotones y como protección ante la fotooxidación (Aguilera, 2018).

Los carotenoides primarios se encuentran en los tilacoides y están íntimamente relacionados con las clorofilas, debido a que estos pigmentos pueden absorber la luz y transmitir a los fotosistemas la energía que les transfieren los fotones, además que presentan funciones fotoprotectoras frente a estresores externos (Aguilera,

2018). Estos están involucrados en la captación de fotones emitidos por la luz y la estabilización de radicales O₂ (Lemoine y Schoefs, 2010; Fariz, 2019).

Los carotenoides secundarios tienden a estar presentes en el estigma y citoplasma de las algas, realizando funciones como fotoreceptoras que sirve para la fototaxis (Fariz, 2019). Estos carotenoides son los que se encuentran acumulados por la generación de este producto bajo condiciones de estrés abiótico, donde realizan las funciones anteriormente mencionadas para la estabilización de la célula (Lemoine y Schoefs, 2010).

La concentración de carotenoides en las algas varía entre el 0.1 al 2% de su peso seco, no obstante, en el caso de *Dunaliella salina* sometida a varios estresores como elevada salinidad, déficit nutricional y alta luminosidad, la concentración de este pigmento se acumula hasta un 14% de beta-caroteno (Coesel et al., 2008).

Los carotenoides secundarios en el caso de *Haematococcus pluvialis* se localizan en el citoplasma donde se acumula la astaxantina en la región perinuclear bajo condiciones de limitación de nutrientes (Gómez et al., 2019). Además, la síntesis de astaxantina por *Haematococcus* se lleva a cabo en situación de cese de la división

celular, fotosíntesis y algún cambio morfológico de la célula (Abalde et al., 1999). Durante cambios de estrés las células se agrupan, pierden los flagelos y al mismo tiempo las células empiezan a acumular masivamente la astaxantina alrededor del núcleo, y las células obtienen de 1 a 2% de su peso seco como astaxantina (Bubrick, 1991).

7.2.1. Biosíntesis de carotenoides

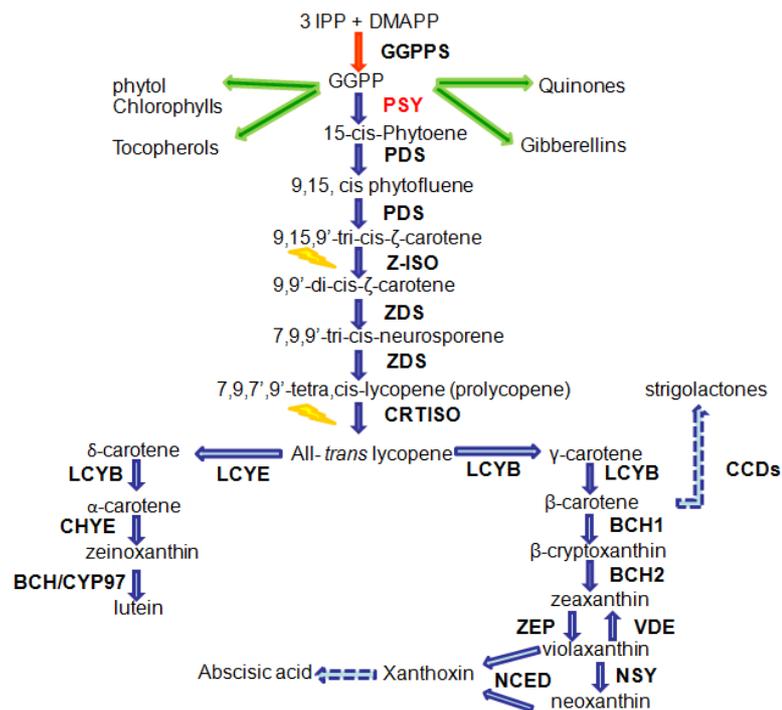


Figura 1 Biosíntesis de carotenoides y rutas metabólicas relacionadas (Aguilera, 2018).

La biosíntesis de carotenoides empieza con el precursor isoprenico C₅ isopentil difosfato (IPP) y su isómero alélico dimetilalil difosfato (DMAPP). A continuación el proceso de elongación de la cadena empieza con la isomerización del IPP a

dimetilalil difosfato (DMAPP), en donde ocurre un transferencia de 3 moléculas de IPP al DMAPP, dando como resultado geranilpirofosfato (GPP), farnesilpirofosfato (FPP) y geranilgeranilpirofosfato (GGPP) (Abalde et al., 1999). Entonces, la biosíntesis avanza con una condensación catalizada por fitoeno sintasa (PSY) entre dos moléculas de GGPP para formar el primer carotenoide de 40 átomos de carbono llamado fitoeno, el fitoeno va a comportarse como precursor de todos los demás carotenoides (Aguilera, 2018). Esta biosíntesis de carotenoides se presenta en un complejo enzimático localizado en el estroma del cloroplasto (Moreno, 2012).

7.2.2. Enzima fitoeno sintasa (gen *psy*)

El gen *psy* fitoeno sintasa es considerada la primera enzima clave en la ruta metabólica de la síntesis de los carotenoides, además que tiene un rol importante en la regulación del flujo de carbonos dentro de la biosíntesis (Coesel et al., 2008; Couso et al., 2011). La enzima *psy* controla el flujo metabólico de la ruta de los carotenoides, donde su expresión produce el incremento en los niveles de carotenoides y su acumulación (Rodríguez et al., 2009), entonces, la expresión del gen *psy* es regulada durante la fotomorfogénesis, presentando un aumento de la expresión a diferentes exposiciones de luz (López, 2017).

La primera parte de la biosíntesis de los carotenoides se da por la condensación de dos moléculas de GGPP para producir fitoeno (Aguilera, 2018). Esta reacción es catalizada por la fitoeno sintasa (gen *psy*), que se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso, ocurre cuando la *psy* cataliza un enlace de carbono de una molécula de GGPP y el doble enlace de los carbonos 2 y 3 de la segunda molécula de GGPP, produciendo de esta manera una molécula de ciclopropilcarbonil difosfato, que también se la conoce como profitoeno difosfato. El segundo paso, consiste en que el profitoeno pirofosfato se transforma en fitoeno cuando ocurre la eliminación del pirofosfato (Fernández, 2013) y posteriormente a partir del fitoeno se forma la ruta del beta-caroteno y la ruta de la astaxantina.

Los genes que codifican el gen *psy* han sido clonados de diversas plantas; en *Arabidopsis thaliana* esta codificada por un único gen, mientras que en *Licopersicon esculentum* y *Nicotiana plumgliflora* existen dos genes que codifican al gen *psy* funcionales (Araya, 2012).

La sobreexpresión de las enzimas implicadas en la ruta de los carotenoides es una de las técnicas más utilizadas, principalmente la fitoeno sintasa (*psy*) que ha sido registrada que al ser sobreexpresada aumentó 10 veces en los niveles de

carotenoides en los callos y hasta 100 veces en la raíz de la planta *A. thaliana* (Maass et al., 2009; Aguilera, 2018).

7.3. Modelamiento *in silico*

El modelamiento *in silico* se refiere al uso de herramientas bioinformáticas para la elaboración de estudios moleculares, con el fin de permitir al investigador la manipulación de diversas variables en las secuencias del ADN, estos modelamientos en computadora resultan muy útiles, indispensables y versátiles, además, que permiten al investigador tomar decisiones acertadas y concretas sobre el organismo en estudio (Jiménez y Chaparro, 2016; Pillacela, 2019). El uso de estas herramientas bioinformáticas o software permiten escoger libremente las secuencias de interés ya sean promotoras, terminadoras, genes, regiones conservadas, regiones no conservadas, alineamientos de secuencias, construir partidores, reconocer sitios de restricción que faciliten la manipulación de la parte experimental del estudio, entre otros; todas estas aplicaciones mejoran significativamente los estudios moleculares en los niveles de expresión genética (Li et al., 2013; Jiménez y Chaparro, 2016). Además, Los modelamientos o análisis *in silico* y el descubrimiento genético de biomoléculas complementan los trabajos experimentales de bioprospección (Johansen et al., 2010; Sperstad et al., 2011; Morgado y Vieira, 2020), ya que mediante la secuenciación de genes se puede identificar un perfil de expresión de un gen rentable económicamente para producir productos de primera necesidad de los seres humanos (Morgado y Vieira, 2020).

7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) *in silico*

La PCR es un método que se dio en el año 1983 por Kary Mullis, la cual influyó esta información en una de las herramientas más importantes en la biología molecular, un método para hacer copias ilimitadas de ADN (NCBI, 2017). Sin embargo, en términos técnicos, la PCR se especifica como un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* e *in silico* de secuencias de ADN usando dos partidores que se hibridan a las cadenas opuestas y flanquean la región de interés (Atawodi et al., 2010; Crespin, 2019).

La PCR *in silico* ayuda a la investigación a predecir resultados ya que es un método estándar en todos los laboratorios que realizan la amplificación de genes, la reacción en cadena de la polimerasa es considerablemente utilizada por diferentes ramas como la microbiología y biología molecular, permitiendo la determinación y cuantificación en la expresión génica, además que esta técnica a ayudado a tener una mejor comprensión para la investigación científica (Debnath et al., 2010; Crespin, 2019).

La PCR también se usa en laboratorios forenses debido a que es sumamente eficiente, ya que solo requiere una pequeña cantidad de ADN (Atawodi et al., 2010). Por otra parte, la mayoría de las aplicaciones de la PCR en investigación científica

se da a través de secuenciación directa de ADN amplificando *in vitro* o *in silico*; ingeniería de ADN para compensar necesidades como detección de mutaciones, expresión génica, amplificación específica de una especie y análisis evolutivo (Atawodi et al., 2010; Crespín, 2019).

Para realizar la amplificación de algún gen mediante la PCR se necesitan partidores que flaquean la región de interés en la secuencia de ADN objetivo. Los partidores determinan la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ende, para diseñar estos partidores se tienen que tener en cuenta varios aspectos como la cantidad de nucleótidos que van desde 20 a 25 nucleótidos, ya que si el tamaño sobrepasa los 25 nucleótidos podría existir una formación de estructuras secundarias, el contenido de citosina y guanina (CG) también resulta indispensable para la elaboración de partidores ya que es recomendable tener un contenido de CG entre 50 y 52%, debido a que si en el extremo 3' del partidador se encuentra una G, la eficacia y la especificidad aumentan en la hibridación llevada a cabo por la PCR, no obstante, es recomendable no sobrepasar más de tres G o C en los cinco últimos nucleótidos del extremo 3', por último, las temperaturas también son de suma importancia, dado que la temperatura de los partidores T_m (Temperatura melting o de difusión) no deben variar más de 3°C entre cada partidador, puesto que, si se llegase a diferir esta temperatura puede provocar un desajuste en los cambios de temperatura entre los partidores y el ADN molde (Escalante, 2019). Por estos

motivos, en la actualidad es de suma importancia aplicar programas que ayuden al diseño adecuado de partidores *in silico*, para que de esta manera se disminuya la probabilidad de errores o falsos positivos en la parte experimental de los estudios moleculares.

7.5. Patrones de digestión *in silico*

7.5.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción también llamadas nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción y por algunos investigadores llamadas restrictasas, pertenecen a un grupo de endodesoxirribonucleasas, determinadas como enzimas propias de diferentes bacterias. Estas enzimas de restricción cortan el ADN de doble cadena cuando reconocen un patrón específico en la secuencia diana (Montoya y Montes, 2020).

Las enzimas de restricción tienen la capacidad de reconocer sitios de corte específicos dentro de una secuencia de ADN, estos lugares se denominan sitios de restricción, al ser encontrados estos sitios, las enzimas cortan las dos cadenas de la secuencia de ADN y recurrentemente estos cortes ocurren sobre o encima de un sitio de restricción predecible (Pillacela, 2019). Los fragmentos de ADN resultantes

de los cortes de las enzimas se utilizan para iniciar la clonación celular, análisis del ADN y para elaborar mapas de restricción.

Los mapas de restricción ayudan a obtener una proyección de dianas, que presentan una secuencia de interés de ADN para varias enzimas de restricción, gracias a esto, el investigador puede establecer el número exacto de cortes, el tamaño de los fragmentos y sus posiciones en cada nucleótido de la secuencia de ADN (Olmos et al., 2000; Chaney et al., 2016; Pillacela, 2019).

Por otro lado, los patrones de restricción *in silico* son corroborados experimentalmente en un laboratorio luego de su respectivo análisis bioinformático, se comprueban los fragmentos y sus tamaños en un gel de agarosa (Srinivasan et al., 2017).

7.6. Clonación *in silico*

La clonación *in silico* es una técnica que se realiza mediante herramientas bioinformáticas, para predecir la inserción de un fragmento de ADN en un vector de clonación. Esta metodología ayuda a evitar errores al momento de realizar la clonación *in vitro* y disminuir la probabilidad de falsos positivos (González et al.,

2015). La clonación se define como el proceso para la producción de copias idénticas de una molécula, célula u organismo; para llevar a cabo esta clonación se utilizan vectores que deben ser seleccionados de acuerdo a la capacidad de albergar un inserto de interés. Estos vectores pueden ser los plásmidos genéticamente modificados, que son moléculas de ADN bicatenarias extracromosómicas que se replican independientemente de los cromosomas dentro de las células bacterianas (Pacheco, 2021). Gracias a que los vectores poseen un origen de replicación denominado (*ori*) ocurre la replicación de los plásmidos para producir cientos de copias de las secuencias de ADN (Pacheco, 2021).

Los plásmidos que actúan como vectores de clonaje son unos pequeños fragmentos de ADN que pueden replicarse y mantenerse de forma estable dentro de una célula huésped como las bacterias, se utilizan para introducir fragmentos del gen de interés en las células huésped mientras se obtienen numerosas copias del inserto (Mesas, 2006). Estos vectores de clonación presentan varias características como origen de replicación, sitio de múltiple clonación y marcador de selección (Cajachagua, 2018).

Por otro lado, los plásmidos que actúan como vectores de expresión son los que se utilizan para insertar un gen en específico en una célula huésped y regir los

mecanismos de la célula para producir el producto genético de interés, se utilizan para obtener un producto y que el gen se exprese (Vázquez, 2016). Estos vectores cuentan con un origen de replicación, promotor, sitio de múltiple clonaje, cola de Poli A y marcador de selección.

7.6.1. Tipos de vectores de clonación

Los vectores de clonación se clasifican de la siguiente manera:

Plásmidos: estos vectores de clonación son moléculas de ADN extracromosómico, generalmente de pequeño tamaño y circulares, se encuentran en varias bacterias y tienen la capacidad de replicarse independientemente del ADN cromosómico (Herrera, 2011).

Fagos: estos vectores de clonación contienen su material genético en una cobertura proteica; estos bacteriófagos son virus que infectan bacterias y su genoma es una molécula de ADN de doble cadena (Cough, 2017), también se pueden replicar sin matar a su hospedador, sin embargo, para poder usarlos como vectores de clonación es necesario obtener células infectadas (Gómez, 2004).

Cósmidos: son los vectores de clonación más antiguos usados para el análisis de genomas, son vectores híbridos ya que presentan las características de los plásmidos

y fagos, puesto que son plásmidos convencionales que cuentan con una o dos copias de regiones pequeñas de fagos (Sambrook y Russell, 2001; Couoh, 2017).

Fásmidos: estos vectores de clonación también combinan las características de un fago y un plásmido, por lo tanto presentan el origen de replicación de ambos; el origen del fago se responsabiliza de la replicación (Herrera, 2011).

Cromosomas artificiales: estos cromosomas han sido desarrollados para la clonación de segmentos grandes; dentro de estos se encuentran los YAC (Yeast artificial chromosomes), que son moléculas de ADN cuya estructura imita a los cromosomas de levadura; los BAC (Bacterial artificial Chromosomes) que son moléculas circulares de ADN capaces de transportar un marcador resistente a los antibióticos y se derivan del factor F (factor de fertilidad) de *Escherichia coli* (Sambrook y Russell, 2001); los PAC son similares a los BAC, presentan menor capacidad que los YAC, además de ser menos complejos y más simples de construir; los BACs se han convertido en los vectores más utilizados para la preparación de librerías genómicas (Herrera, 2011; Couoh, 2017).

7.7. Transformación bacteriana

La transformación es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio y adquieren nuevos marcadores genéticos por incorporación del ADN, es un fenómeno que ocurre de forma natural en varias bacterias, sin embargo, su eficiencia varía dependiendo de la especie. Para que la transformación se lleve a cabo, la bacteria tiene que estar en el llamado “estado de competencia”, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas, en este estado la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celular, que permiten la entrada de ácidos nucleicos a la célula (Cejudo et al., 2012).

La transformación en el laboratorio es una técnica rutinaria de suma importancia para los trabajos de investigación, este procedimiento fue descrito por primera vez en *Escherichia coli* por Mandel e Higa (Gómez et al., 2018), a partir de ese momento, la eficiencia del protocolo se ha ido mejorando prolongadamente, permitiendo de esta manera introducir cualquier plásmido en su forma circular o superenrollada en casi todos los tipos de bacterias (Gómez et al., 2018). El propósito de esta metodología es introducir el plásmido recombinante obtenido en una reacción de ligación en la estirpe de *Escherichia coli* DH5 α (Cejudo et al., 2012). Esta estirpe se encuentra modificada genéticamente de manera que sea posible estimular en laboratorio la competencia de las células así como mantener el

plásmido de forma estable en su interior (Cajachagua, 2018) y permitir la amplificación del vector.

En la naturaleza hay muy pocas bacterias que tienen la capacidad de captar ADN ajeno de forma natural, sin embargo, a nivel de laboratorio existen varias bacterias que poseen sistemas de transformación: bacterias gram positivas (*Streptococcus* y *Bacillus*) y bacterias gram negativas (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Synechosoccus*), estas bacterias se pueden inducir de forma artificial, teniendo en cuenta los parámetros implicados en la transformación como densidad celular del cultivo, temperatura, pH y nutrientes (Gómez et al., 2018).

7.7.1. Plataforma o programa BioRender

En la actualidad existen varios programas que facilitan la elaboración de esquemas en el ámbito científico, como es el caso del programa BioRender, una plataforma gratuita que permite tener iconografía prediseñada de elementos científicos, además que este programa permitirá demostrar la transformación bacteriana, el resguardo del vector y el diseño de selección.

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1. Alineamiento de secuencias y regiones conservadas

8.1.1. Selección de secuencias del gen *psy*

Desde la plataforma El Centro Nacional para la Información Biotecnológica, con sus siglas en inglés NCBI. Se seleccionaron las secuencias del gen *psy* reportadas para microalgas del género *Dunaliella* bajo los siguientes criterios: las secuencias deben proceder desde ADN o ADNc de acuerdo a la mayor información registrada en la plataforma con un tamaño entre 1000 pb a 1500 pb, las mismas que fueron descargadas en formato FASTA para posteriores análisis.

8.1.2. Alineamiento de secuencias

El alineamiento doble se realizó con el programa BLAST donde nos permitió conocer el porcentaje de similitud e identidad con otras especies de algas pertenecientes al mismo género y el porcentaje de cobertura de las secuencias comparadas. Mientras que, el alineamiento múltiple se realizó utilizando la herramienta BioEdit, ejecutada en el programa ClustalW Alignment (Julie et al., 1997). La misma que nos permitió analizar todas las secuencias seleccionadas desde el NCBI y reconocer las regiones conservadas y variables, desde donde se procedió a diseñar los partidores universales y específicos. A partir de este

alineamiento múltiple también se obtuvo la secuencia consenso para posteriores análisis.

8.2. Diseño de partidores universales y específicos

8.2.1. Amplificación *in silico* del gen *psy*

Los partidores tanto específicos como universales fueron diseñados desde las regiones mayormente conservadas de las secuencias y se tomaron varios criterios para su selección: número de nucleótidos entre 20-25 pb, contenido de citosina y guanina (%CG) entre 50-52% y temperatura de fusión o melting (T_m) entre 60-65°C. Una vez que los fragmentos cumplieron con todos los criterios, se los ejecutó en el programa Oligo Calc (Olonucleotide Properties Calculator). Posteriormente, para que los partidores diseñados garanticen la amplificación del gen *psy*, se utilizó la herramienta PRIMER-BLAST (NCBI) para realizar el modelamiento *in silico* de la PCR, lo que nos brindó información sobre el tamaño de los productos.

8.3. Patrones de restricción modelados *in silico*

A partir de la obtención de la secuencia consenso del gen *psy* de *Dunaliella*, se procedió a ingresar en el programa BioEdit en donde se ejecutó el mapa de restricción para la identificación de todos los sitios de corte y se escogieron 6 enzimas que corten 3 veces, pero que no hagan cortes a los extremos de la secuencia y que los fragmentos no sean menores a los 100 pb ya que esos fragmentos no

aparecerán en la electroforesis. Una vez que se escogieron las enzimas, se procedió a la elaboración de dos mapas de restricción *in silico* a través del software online NEBcutter 2.0 en el que se seleccionó las enzimas anteriormente seleccionadas en el programa BioEdit para cada mapa, a partir de las enzimas seleccionadas se modelaron los patrones de restricción al combinar las enzimas en cada mapa y se realizó la electroforesis *in silico* a través del software NEBcutter 2.0.

8.4. Clonación *in silico*

El primer paso para la clonación *in silico* del gen *psy* fue la selección del vector comercial, que presente las características de ser un vector de clonación y expresión. Para su selección primero se revisó la diferencia entre un vector de clonación y un vector de expresión: el vector de clonación contiene un origen de replicación, un sitio de múltiple clonaje que es una secuencia específica reconocida por varias enzimas de restricción para poder insertar la secuencia del gen de interés y un marcador de selección y el vector de expresión se utiliza para producir una proteína recombinante y además de contener los elementos anteriormente mencionados en el vector de clonación, también presenta un sitio IRES que es un sitio de entrada interna al ribosoma y una secuencia de poliadenilación, luego de la anterior revisión se siguieron varios criterios como: que presente el sitio de múltiple clonaje, que contenga un marcador de selección y que tenga el sitio ORI. Una vez que haya cumplido con los criterios, se procedió a insertar el vector en el programa SnapGen, en donde se seleccionaron dos enzimas que corten una sola vez en el sitio de

múltiple clonaje. Posteriormente se obtuvo el inserto de interés con un tamaño de 2142 pb a partir de la secuencia consenso del producto del PCR *in silico*, en el cual se buscaron tanto el codón de inicio como el codón de finalización. Luego se realizó la selección de las enzimas de restricción para el inserto de interés en el programa BioEdit, las enzimas fueron seleccionadas bajo el criterio que realicen un solo corte, no corten el vector y que se encuentren en el sitio de múltiple clonaje. Una vez que se obtuvo el vector y el inserto, se procedió a realizar el cassette de expresión, en donde se unió la secuencia de interés con los promotores y los terminadores, en este caso se utilizó la rubisco (rbcL) dado que en microalgas los promotores más eficientes para la expresión de genes exógenos para la producción de proteínas recombinantes son los RcbL (Surzycki et al 2009), y por último todo el inserto se lo añadió al vector.

8.4.1. Transformación de bacteria

Para la transformación se utilizó el programa BioRender, en donde se insertaron gráficos para diseñar el proceso, bajo los criterios: tipo de cultivo, obtención de ADN, amplificación del gen, PCR e inserto del gen. Luego, se realizó el diseño en donde se muestra la molécula de ADN recombinante, formada por un vector que contiene un segmento de ADN insertado del gen de interés, este se transfiere a la célula huésped y dentro de esta, la molécula de ADN recombinante se replica, generando docenas de copias idénticas, conocidas como clones que llevan la secuencia de interés clonada.

8.4.2. El diseño de la selección

Este diseño se la llevó a cabo en el programa BioRender y se refleja el proceso de selección de las bacterias transformadas, en donde se aprecia el crecimiento de las colonias en el medio de cultivo, en este se distinguen dos tipos de colonias, las blancas y las azules, las colonias blancas presentan el vector con el inserto del gen de interés gracias a que el operón Lac se ve intervenido por un inserto, mientras que las colonias azules solo contienen el vector, ambas colonias resistentes al marcador de selección. Posteriormente se refleja en el diseño, la selección de la sección que contiene el ADN recombinante, se hace el inserto y se lo coloca en placas, luego se lo guarda en tubos eppendorf a -80°C con 500ml de cultivo y 500ml de glicerina para que se conserve la bacteria.

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. Alineamiento de secuencias y análisis de regiones conservadas

9.1.1. Alineamiento doble

Para establecer una relación genética entre el género a estudiar y otras especies que registran las secuencias del gen *psy* en el GenBank se realizó un alineamiento doble, los resultados demuestran que existe una similitud con una especie de planta superior, microalgas del género *Micromonas*, *Chorella* y *Dunaliella* (Tabla. 1). A partir de estos resultados se seleccionaron solo especies del género *Dunaliella* para nuestro análisis, siendo 4 secuencias elegidas (Tabla. 2), siguiendo los criterios: secuencias que contengan de 1000 a 1500 pb, que el porcentaje de cobertura sea mayor al 70% y el porcentaje de similitud e identidad sea mayor al 80% tal como indica López (2017).

Las demás secuencias no fueron seleccionadas debido a que presentaban mayor tamaño, superior a 1500 pb, presentaban menor porcentaje de cobertura y similitud y las demás secuencias no pertenecían al género de interés para este estudio (Tabla. 1).

Tabla 1 Descripción de secuencias que producen alineaciones significativas entregadas por el programa BLAST, entre organismos que contienen el gen *psy*. La tabla indica el % de cobertura y % de similitud e identidad entre estas especies.

	Descripción	Nombre científico	% de cobertura	% de similitud e identidad	Tamaño pb	N° de acceso
X	<i>Dunaliella salina</i> isolate PSY carotene synthesis related protein mRNA, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	100	100.00	1305	MN732755.1
X	<i>Dunaliella bardawil</i> strain 847 phytoene synthase mRNA, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	97	99.76	1275	EU328287.1
X	<i>Dunaliella bardawil</i> phytoene synthase mRNA, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	78	87.58	1278	U91900.1
	<i>Dunaliella primolecta</i> genome assembly, chromosome: 1	<i>Dunaliella primolecta</i>	100	100.00	19719606	OU611751.1
	<i>Dunaliella bardawil</i> strain 847 phytoene synthase gene, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	97	99.82	3300	EU328288.1
	<i>Dunaliella parva</i> strain FACHB-815 phytoene synthase mRNA, complete cds	<i>Dunaliella parva</i>	81	81.97	1611	KY069272.1
X	<i>Dunaliella salina</i> phytoene synthase mRNA, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	81	81.97	1260	AY601075.1
	<i>Dunaliella salina</i> phytoene synthase (<i>PSY</i>) mRNA, partial cds	<i>Dunaliella salina</i>	31	88.22	416	JQ762451.1
	<i>Dunaliella bardawil</i> strain UTEX2538 phytoene synthase (<i>PSYIA</i>) gene, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	24	88.64	3028	DQ057342.1
	<i>Micromonas commoda</i> phytoene synthase (<i>PSYI</i>), partial mRNA	<i>Micromonas commoda</i>	63	72.93	1059	XM_002508472.1
	<i>Micromonas</i> sp. RCC299 chromosome 10, complete sequence	<i>Micromonas commoda</i>	63	72.93	1160640	CP001576.1

<i>Chlorella variabilis</i> hypothetical protein (PSY) mRNA, complete cds	<i>Chlorella variabilis</i>	63	72.61	1152	XM_005843836.1
<i>Dunaliella salina</i> phytoene synthase gene, complete cds	<i>Dunaliella salina</i>	11	88.51	2983	AY547325.1
PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> phytoene synthase 2. Chloroplastic (LOC100831790) mRNA	<i>Brachypodium distachyon</i>	39	72.49	1733	XM_003579062.4

Tabla 2 Descripción de secuencias del gen *psy* del género *Dunaliella*. Los datos registran los porcentajes de cobertura y similitud.

Especie	Código de Acceso	% de identidad y similitud	% de cobertura
<i>Dunaliella salina</i>	MN732755.1	100	100
<i>Dunaliella bardawil</i>	EU328287.1	99.76	97
<i>Dunaliella bardawil</i>	U91900.1	87.58	78
<i>Dunaliella salina</i>	AY601075.1	81.97	81

En el alineamiento entregado por la plataforma BLAST se puede evidenciar las similitudes de las secuencias y las mutaciones que se encuentran en cada una. Por ello, como resultados tenemos que en la primera secuencia alineada perteneciente a la especie *Dunaliella salina* (MN732755.1) no se encontraron mutaciones y la secuencia cuenta con un 100% de cobertura y similitud e identidad (Fig. 2) (Tabla. 3). En la segunda secuencia alineada perteneciente a la especie *Dunaliella bardawil*

(EU328287.1) se pudo observar tres mutaciones por sustitución de nucleótidos de tipo transición en los nucleótidos 522, 616 y 729 (Fig. 3) (Tabla. 3) y la secuencia cuenta con un 97% de cobertura y 99.76% de similitud e identidad. La tercera secuencia alineada perteneciente a la especie *Dunaliella bardawil* (U91900.1) (Fig. 4) presentó 128 mutaciones, de los cuales 83 mutaciones fueron por sustitución de tipo transición, 43 fueron mutaciones por sustitución de tipo transversión, 1 mutación por inserción y 1 mutación por delección, los nucleótidos mutados se ven reflejados en la Tabla 3 y la secuencia cuenta con un 78% de cobertura y 87.58% de similitud e identidad. En la cuarta secuencia alineada perteneciente a la especie *Dunaliella salina* (AY601075.1) (Fig. 5) se pudo evidenciar 192 mutaciones, de las cuales 80 fueron mutaciones por sustitución de tipo transición, 103 fueron mutaciones por sustitución de tipo transversión, 6 fueron mutaciones por inserción y 3 fueron mutaciones por delección, los nucleótidos mutados se ven reflejados en la Tabla 3 y la secuencia cuenta con un 81% de cobertura y 81.97% de similitud e identidad.

Dunaliella salina isolate PSY carotene synthesis related protein mRNA, complete cds

Sequence ID: [MN732755.1](#) Length: 1305 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1305 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2410 bits(1305)	0.0	1305/1305(100%)	0/1305(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGACGCTGTCAATGTTGGACGCGGAAGGATGGCACAGCGAACAGCAACTTCTCTCTCC	60		
Sbjct 1	ATGACGCTGTCAATGTTGGACGCGGAAGGATGGCACAGCGAACAGCAACTTCTCTCTCC	60		
Query 61	TCCTCTCTAGCATCATATATGCCCCATGCCATAAAGCAATCGCAGCGGCGAGGCGCGCA	120		
Sbjct 61	TCCTCTCTAGCATCATATATGCCCCATGCCATAAAGCAATCGCAGCGGCGAGGCGCGCA	120		
Query 121	GCAGCGAATCACGGCATCAGGAATGGTAGTCGCAGAGCAGCAGGCCGGATGGGACTCTGC	180		
Sbjct 121	GCAGCGAATCACGGCATCAGGAATGGTAGTCGCAGAGCAGCAGGCCGGATGGGACTCTGC	180		
Query 181	AGCACTGTGCAAGTGAAGTGCACGCTCGCGATGCCAGCCCAACACGGCCAGAAGATG	240		
Sbjct 181	AGCACTGTGCAAGTGAAGTGCACGCTCGCGATGCCAGCCCAACACGGCCAGAAGATG	240		
Query 241	CGATTgcagcagcagcagcagcaacaactgcagcagcagcagcaacagcaacTATCGGGA	300		
Sbjct 241	CGATTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAATGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAACTATCGGGA	300		
Query 301	AAGCAGGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCAGTGCATAAAGACCGCTCAGTCAGTGCCCCC	360		
Sbjct 301	AAGCAGGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCAGTGCATAAAGACCGCTCAGTCAGTGCCCCC	360		
Query 361	TCCACCGGACTCCTCAATCCTCGCGCCTGCGATGGCAGGGCAGCAGTTGGAAGCAGCG	420		
Sbjct 361	TCCACCGGACTCCTCAATCCTCGCGCCTGCGATGGCAGGGCAGCAGTTGGAAGCAGCG	420		

Figura 2 Alineamiento doble de la primera secuencia seleccionada del gen *psy* perteneciente a la especie *Dunaliella salina*.

Dunaliella bardawil strain 847 phytoene synthase mRNA, complete cds

Sequence ID: [EU328287.1](#) Length: 1275 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1275 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2338 bits(1266)	0.0	1272/1275(99%)	0/1275(0%)	Plus/Plus
Query 31	ATGGCACAGCGAACAGCAACTTCTCTCTCTCTCTCTCTAGCATCATATATGCCCATCG	90		
Sbjct 1	ATGGCACAGCGAACAGCAACTTCTCTCTCTCTCTCTCTAGCATCATATATGCCCATCG	60		
Query 91	CCCATAAGCAATCGCAGCGGCGAGGCGCGCAGCAGCAATCACGGCATCAGGAATGGTAGT	150		
Sbjct 61	CCCATAAGCAATCGCAGCGGCGAGGCGCGCAGCAGCAATCACGGCATCAGGAATGGTAGT	120		
Query 151	CGCAGAGCAGCAGGCCGGATGGGACTCTGCAGCACTGTGCAAGTGAAGTGCACGCTCGCG	210		
Sbjct 121	CGCAGAGCAGCAGGCCGGATGGGACTCTGCAGCACTGTGCAAGTGAAGTGCACGCTCGCG	180		
Query 211	ATGCCCCAGCCCAACACGGCCAGAAGATGCGATTgcagcagcagcagcagcaacaactg	270		
Sbjct 181	ATGCCCCAGCCCAACACGGCCAGAAGATGCGATTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAATG	240		
Query 271	cagcagcagcagcaacagcaacTATCGGAAAGCAGGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCAG	330		
Sbjct 241	CAGCAGCAGCAGCAACAGCAACTATCGGAAAGCAGGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCAG	300		
Query 331	TGCATAAAGACCGCTCAGTCAGTGCCCCCTCCACCGGACTCCTCAATCCTCGGGCCTG	390		
Sbjct 301	TGCATAAAGACCGCTCAGTCAGTGCCCCCTCCACCGGACTCCTCAATCCTCGGGCCTG	360		
Query 391	CGATGGCAGGGCAGCAGCTTGAAGCAGCGTACGAGCGATGTGGGGCGGTGTGCAGCGAG	450		
Sbjct 361	CGATGGCAGGGCAGCAGCTTGAAGCAGCGTACGAGCGATGTGGGGCGGTGTGCAGCGAG	420		

Figura 3 Alineamiento doble de la segunda secuencia seleccionada del gen *psy* perteneciente a la especie *Dunaliella bardawil*.

Dunaliella bardawil phytoene synthase mRNA, complete cds
Sequence ID: [U91900.1](#) Length: 1278 Number of Matches: 1

Range 1: 237 to 1266 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1194 bits(646)	0.0	903/1031(88%)	2/1031(0%)	Plus/Plus
Query 270	gcagcagcagcagcaacagcaacTATCGGGAAAGCAGGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCA	329		
Sbjct 237	GCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCTCTCAGGAAAACAAGTGGAGGAGCAGGCGATGCTGCG	296		
Query 330	GTGCATAAAGACCGCTCAGTCAGTGCCCCCTCCACCGGACTCCTCAATCCTCGCGGCT	389		
Sbjct 297	ATGCATACAAACCGACAGTCCGTGCCCCCTCCACCGGGCTCCTCGACCCTCGGACCCT	356		
Query 390	GCGATGGCAGGCGAGCAGCTTGAAGCAGCGTACGAGCGATGTGGGGCGGTGTCAGCGA	449		
Sbjct 357	CCGCTGGCAGGGTGGCAGTTTGGAGGGGGCGTATGAGCGATGTGGGGCAGTGTGACGCGA	416		
Query 450	GTACGCCAAGACCTTCTACCTCGGTAAGTACAGTCATGACACAGTGCAGGCCAGGTGCAT	509		
Sbjct 417	GTACGCCAAGACCTTCTACTTGGAACTCAGCTCATGACCCCTGTGACAGCTAGGTGCAT	476		
Query 510	CTGGGCCATCTATGTGTGGTGC CGCCGACAGATGAGCTGGTGGATGGCCCAATGCATC	569		
Sbjct 477	CTGGGCCATCTACGTGTGGTGC CGCCGACAGATGAGCTGGTGGATGGCCCAATGCTTC	536		
Query 570	AAAGATCACGCCTCAGGCCCTAGACAGATGGGAGGAGCGCCTTAAAAGCATGTTCCAAGG	629		
Sbjct 537	AAAGATCACGCCTCAGGCCCTGACAGTGGGAAGAGCGCCTGGAGGCCATGTTCCAAGG	596		
Query 630	CAAGCCCTATGATGTGCTGGACGCGCGCTCACAGACACCATCTCAAATTCCTCTGGA	689		
Sbjct 597	CAAGCCCTATGATGAGTGGATGCAGCACTACCCGACACCCCTCTCAAATACCCCTGGA	656		

Figura 4 Alineamiento doble de la tercera secuencia seleccionada del gen *psy* perteneciente a la especie *Dunaliella bardawil*.

Dunaliella salina phytoene synthase mRNA, complete cds
Sequence ID: [AY601075.1](#) Length: 1260 Number of Matches: 1

Range 1: 188 to 1249 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ P1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
894 bits(484)	0.0	873/1065(82%)	9/1065(0%)	Plus/Plus
Query 239	TGCGATTgcagcagcagcagcagcaacaactgcagcagcagcag---caacagcaacTAT	295		
Sbjct 188	TGCGCCTGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCAAGCCAGCAGCAGCAGGCCAGCAGCAGCTGT	247		
Query 296	CGGGAAAGCAGGTGGAGGAG-CAGGCGATGCTGCAGTGCATAAAGACCGCTCA-GTCAGT	353		
Sbjct 248	CCGGCAAGGACGTGGAGCAGGCA-GCGATGCAGGCGTGCATACGGACAGC-CACCTCCGT	305		
Query 354	GCCCCCTCCACCGGACTCCTCAATCCTCGCGGCTGCGATGGCAGGGCAGCAGC-TTGG	412		
Sbjct 306	GCCCCCTCGTCCGGCGTGTGGACCCAGCGGCTGCGCTGGAGGGGC-GGAGCGCTGG	364		
Query 413	AAGCAGCGTACGAGCGATGTGGGGCGGTGTGACGCGAGTACGCCAAGACCTTCTACCTCG	472		
Sbjct 365	AGGCAGCGTACGAGCGGTGTGGCGCGGTGTGCAAGGAGTACGCCAAGACCTTCTACCTGG	424		
Query 473	GTAAGCAGCTCATGACACAGTGCAGGCCAGGTGCATCTGGGCCATCTATGTGTGGTGGC	532		
Sbjct 425	GCACGCAGCTCATGACCCCGTCCAGGCACGCTGCATCTGGGCCATCTACGTGTGGTGGCA	484		
Query 533	GCCGCACAGATGAGCTGGTGGATGGCCCAATGCATCAAAGATCACGCCTCAGGCCCTAG	592		
Sbjct 485	GGCGCACGGATGAGCTGGTGGATGGCCCTAATGCCTCAAAGATCACACCACAGGCCCTGG	544		
Query 593	ACAGATGGGAGGAGCGCCTTAAAAGCATGTTCAAAGGAAGCCCTATGATGTGCTGGACG	652		
Sbjct 545	ACCGGTGGGAGGAGCGGCTAAACGGCGTCTTCAAAGGCAGGCCCTACGACGTGCTGGACG	604		

Figura 5 Alineamiento doble de la cuarta secuencia seleccionada del gen *psy* perteneciente a la especie *Dunaliella salina*.

Tabla 3 Descripción de las mutaciones existentes dentro las secuencias alineadas del gen *psy*. La tabla completa se puede observar en el Anexo 1.

Especie	Código de Acceso	N° de nucleótidos cambiados	Tipo de Mutación
<i>Dunaliella salina</i>	MN732755.1	0	N/A
<i>Dunaliella bardawil</i>	EU328287.1	3	Transición
<i>Dunaliella bardawil</i>	U91900.1	128	Transición Transversión Delección Inserción
<i>Dunaliella salina</i>	AY601075.1	192	Transversión Transición Inserción Delección

El programa BLAST también nos entregó un resumen gráfico del alineamiento, donde se puede corroborar la información anteriormente descrita, donde se demuestra que las secuencias dos primeras secuencias alineadas presentan un elevado porcentaje de cobertura y similitud entre sí (Fig. 6).

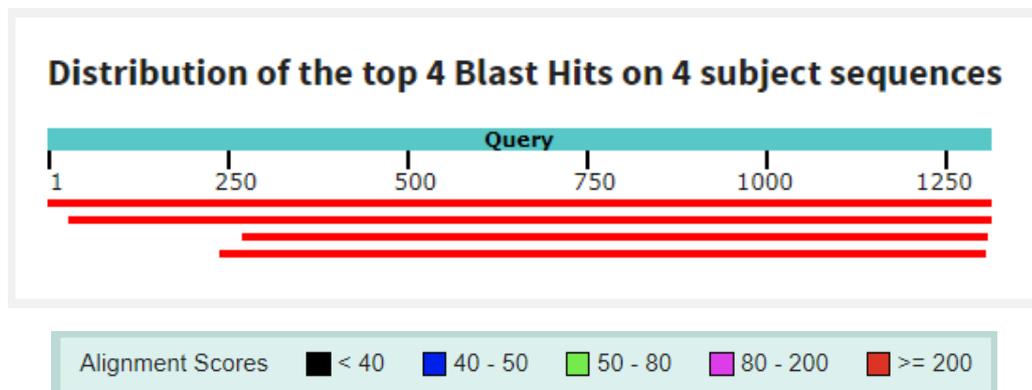


Figura 6 Gráfico del alineamiento donde se demuestra la distribución de las 4 secuencias del gen *psy* pertenecientes al género *Dunaliella*.

9.1.2. Alineamiento múltiple

De la misma manera, en el caso de alineamiento múltiple, para establecer una relación genética entre las secuencias del género en estudio, las 4 secuencias anteriormente seleccionadas fueron corridas en el programa BioEdit y el ClustalW Alignment demostró que las secuencias presentaban regiones conservadas y de la misma manera, se evidenciaron las regiones variables (Fig. 7).

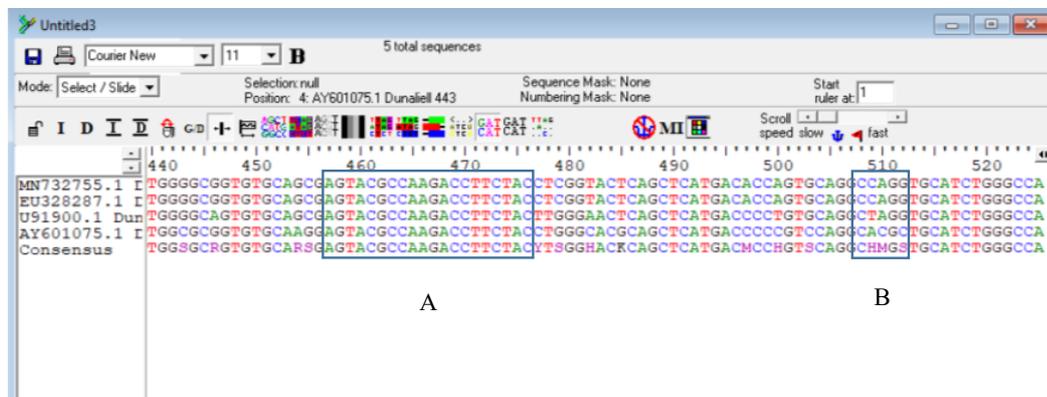


Figura 7 Alineamiento múltiple de 4 secuencias del gen *psy* pertenecientes al género *Dunaliella*. A: Vista general de una región conservada dentro del alineamiento; B: Vista general de una región variable dentro del alineamiento.

9.2. Diseño de partidores y Amplificación *in silico* del gen *psy*

A partir de las regiones conservadas se diseñaron 2 partidores específicos y 2 partidores universales, considerando los criterios de diseño, explicados en materiales y métodos.

9.2.1. Partidores específicos

Los partidores PSY-001F Forward (5'- GAGTACGCCAAGACCTTCTAC -3') y PSY-001R Reverse (5'- ATGTTTGTTCAGCTGGTTGGCG -3') fueron diseñados a partir del nucleótido 400 al 863 pb de la región conservada y el análisis *in silico* de la especificidad de los partidores cumplen las condiciones y parámetros de diseño (Tabla. 4).

Tabla 4 Partidores diseñados para la amplificación de la secuencia del gen *psy* de *Dunaliella salina*.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')	Largo (pb)	CG (%)	Tm (°C)	Tamaño Amplicón (pb)	Nº de Acceso
<i>Psy</i>	PSY-001F	GAGTACGCCAAGACCTTCTAC	21	52	57	464	AY601075.1
	PSY-001R	ATGTTTGTTCAGCTGGTTGGCG	21	52	62		

Además, la amplificación *in silico* en el PRIMER-BLAST de los partidores (Tabla. 4) generaron un amplicón de 464 pb teniendo como molde una secuenciación de *Dunaliella salina* (Fig. 8).

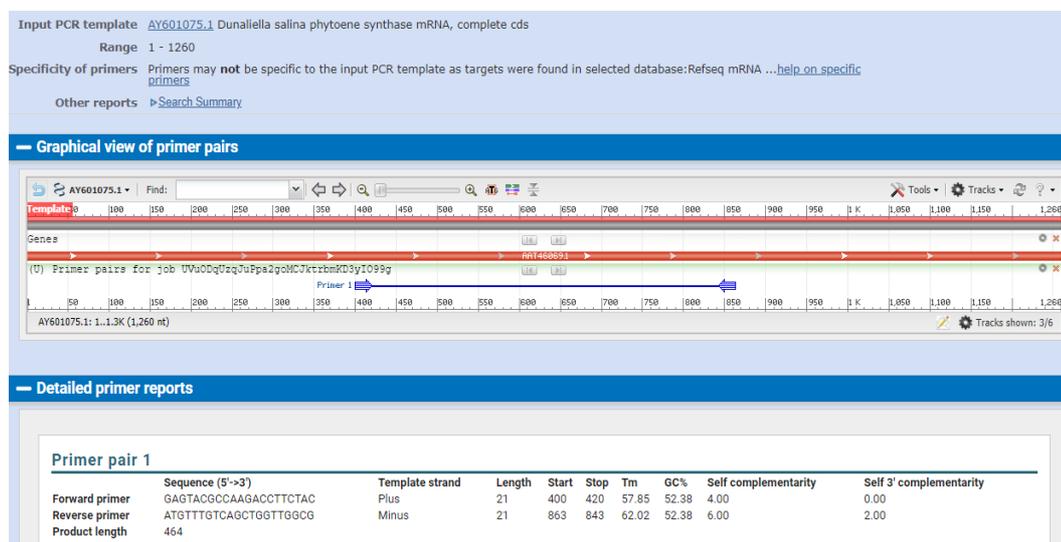


Figura 8 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-001F y PSY-001R, con un producto amplificado de 464 pb.

Los partidores PSY-002F Forward (5'- TGCCTCCAAGATCACACCACA -3') y PSY-002R Reverse (5'- TAGCTCATCCAAGGGCAGGTA -3') fueron diseñados a partir del nucleótido 516 al 927 pb de la región conservada y el análisis *in silico* de la especificidad de los partidores cumplen las condiciones y parámetros de diseño (Tabla. 5).

Tabla 5 Partidores diseñados para la amplificación de la secuencia del gen *psy* de *Dunaliella salina*.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')	Largo (pb)	CG (%)	Tm (°C)	Tamaño Amplicón (pb)	Nº de Acceso
<i>Psy</i>	PSY-002F	TGCCTCCAAGATCACACCACA	21	52	61	412	AY601075.1
	PSY-002R	TAGCTCATCCAAGGGCAGGTA	21	52	60		

Además, la amplificación *in silico* en el PRIMER-BLAST de los partidores (Tabla. 5) generaron un amplicón de 412 pb teniendo como molde una secuencia de *Dunaliella salina* (Fig. 9).

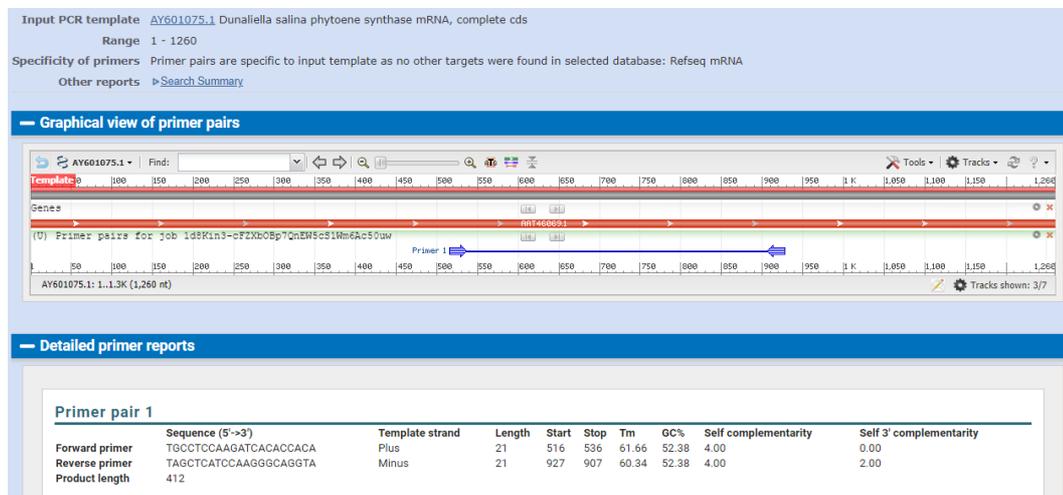


Figura 9 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-002F y PSY-002R, con un producto amplificado de 412 pb.

9.2.2. Partidores universales

Los partidores PSY-003F Forward (5'- ATGGCACAGCGAACAGCAACTT-3') y PSY-003R Reverse (5'-CTTGGACTTAGGCACGTATGC-3') fueron diseñados a partir del nucleótido 31 al 1248 pb de la región conservada y el análisis *in silico* de la especificidad de los partidores cumplen las condiciones y parámetros de diseño (Tabla. 6).

Tabla 5 Partidores universales diseñados para la amplificación del gen *psy* del género *Dunaliella*.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')	Largo (pb)	CG (%)	Tm (°C)	Tamaño Amplicón (pb)
<i>Psy</i>	PSY-003F	ATGGCACAGCGAACAGCAACTT	22	50	63	1218
	PSY-003R	CTTGGACTTAGGCACGTATGC	21	52	59	

Además, la amplificación *in silico* en el PRIMER-BLAST de los partidores (Tabla. 6) generaron un amplicón de 1218 pb teniendo como molde la secuencia consenso (Fig. 10).

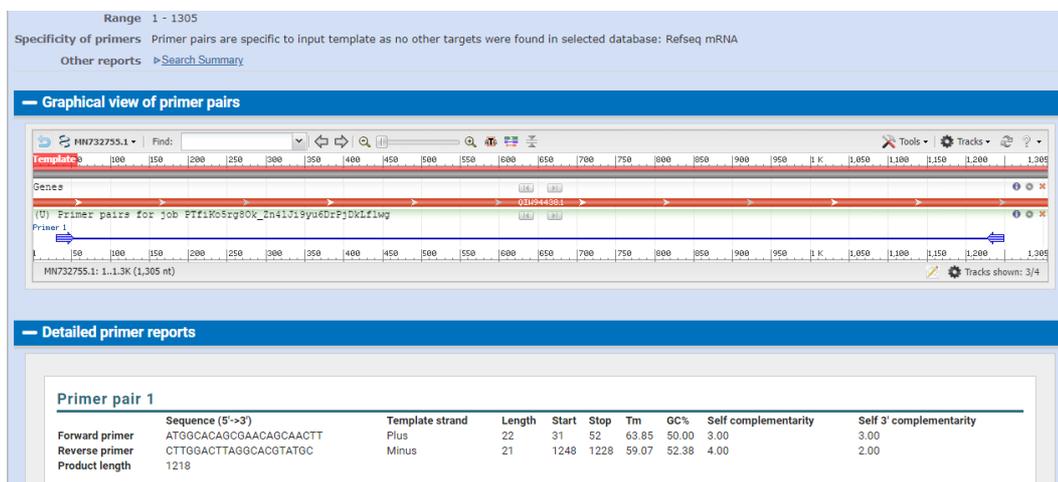


Figura 10 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-003F y PSY-003R, con un producto amplificado de 1218 pb.

Los partidores PSY-004F Forward (5'-ATGACGCTGTCAATGTTGGACG-3') y PSY-004R Reverse (5'-TTTGGTTCTTGGGCACCAAGGC-3') fueron diseñados a

partir del nucleótido 1 al 1302 pb de la región conservada y el análisis *in silico* de la especificidad de los partidores cumplen las condiciones y parámetros de diseño (Tabla. 7).

Tabla 6 Partidores universales diseñados para la amplificación del gen *psy* del género *Dunaliella*.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')	Largo (pb)	CG (%)	Tm (°C)	Tamaño Ampliación (pb)
<i>Psy</i>	PSY-004F	ATGACGCTGTCAATGTTGGACG	22	50	61	1302
	PSY-004R	TTTGTCTTGGGCACCAAGGC	21	52	61	

Además, la amplificación *in silico* en el PRIMER-BLAST de los partidores (Tabla. 7), generaron un amplicón de 1302 pb teniendo como molde una secuencia consenso de *Dunaliella sp* (Fig. 11).

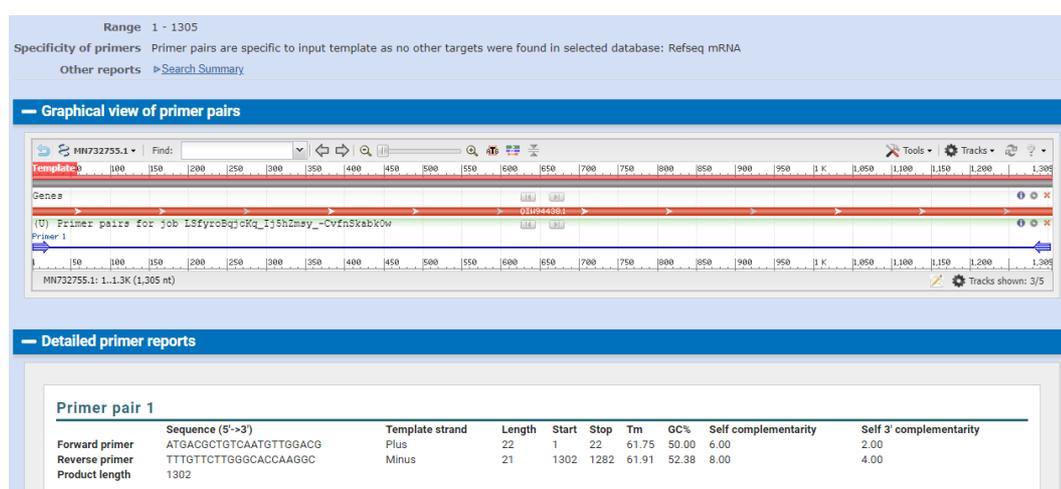


Figura 11 Resultado de la prueba PRIMER-BLAST en la página web del NCBI, utilizando los partidores PSY-004F y PSY-004R, con un producto amplificado de 1302 pb.

9.3. Patrones de restricción modelados *in silico*

A partir de la secuencia consenso, obtenida en el alineamiento en el programa BioEdit, se obtuvo dos mapas de restricción *in silico* por medio del mismo software (Fig. 12 y 13), el mapa indicó que el gen *psy* cuenta con sitios de restricción para enzimas que hacen cortes de tipo romo y cortes de tipo cohesivo. Los sitios de restricción se corroboraron con el programa NEBcutter 2.0 donde se elaboraron los dos mapas *in silico* con las siguientes enzimas de restricción elegidas: *BceAI*, *BsgI*, *BsrI*, *HgaI*, *MboII* y *HaeII* (Fig. 14 y 15) 3 enzimas en cada mapa, estas enzimas reconocen sitios específicos dentro de la secuencia escogida y realizan 3 cortes cada una, con excepción de la enzima *MboII* que realiza 4 cortes, que se ven reflejados en el modelo *in silico* del gel de agarosa (Fig. 16 y 17).

```

81      TGCCCCATCGCCATAAGCAATCGCAGCGGCAGGCGCGCAGCAGCGAATCACGGGCATCAGGAATGGTAGTCGCAGAGCAG      160
81      ACGGGGTAGCGGGTATTTCGTTAGCGTCGCCGTCGCCGCGCTCGCTTAGTGCCGTAGTCCTTACCATCAGCGTCTCGTC      160
      SfaNI                               MwoI      Cac8I                               BbvI      Hpy188III
                                       MspAII     Cac8I
161     CAGGCCGGATGGGACTCTGCAGCACTGTGCAAGTGAAGTGCACGCTCGCGATGCCCCAGCCCAACCACGGCCAGAAGATG      240
161     GTCCGGCCTACCCCTGAGACGTCGTGACACGTTCACTTGACGTGCGAGCGCTACGGGGTCGGGTTGGTGCCCGTCTTCTAC      240
      Cac8I  BbvI      SfcI  BsgI  TspRI          SfaNI  Hpy188III          BsaJI
481     CTCATGACACCAGTGCAGGCCAGGTGCATCTGGGCCATCTATGTGTGGTGCCGCGCACAGATGAGCTGGTGGATGGCCC      560
481     GAGTACTGTGGTCACGTCCGGTCCACGTAGACCCGGTAGATACACACCACGGCGGCGTGTCTACTCGACCACCTACCGGG      560
      BspHI  BspCNI  TspRI          BsgI  MslI  BanI
                                       BsrI

```

Figura 12 Mapa de restricción modelado *in silico* a través del programa BioEdit.

```

1      ATGACGCTGTCAATGTTGGACGCGCGAAGGATGGCACAGCGAACAGCAACTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTAGCATCATATA 80
1      TACTGCGACAGTTACAACCTGCGCGCTTCCTACCGTGTGCGTTGTCGTTGAAGGAGGAGGAGGAGGATCGTAGTATAT 80
      Tth111I      HgaI      BstF5I      BseRI      MnlI      MnlI

241    CGATTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACCTGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAACTATCGGGAAAGCAGGTGGAGGAGCAGGC 320
241    GCTAACGTCGTCGTCGTCGTTGTTGACGTCGTCGTCGTTGATAGCCCTTCGTCACCTCCTCGTCCG 320
      BceAI      MwoI      BbvI      BbvI      BbvI      MwoI      BbvI      BbvI      AarI      MnlI
      MboII      HpyF10VI      BbvI      HpyF10VI      BbvI      SfaNI

561    CAATGCATCAAAGATCACGCCTCAGGCCCTAGACAGATGGGAGGAGCGCCTTGAAAGCATGTTCCAAGGCAAGCCCTATG 640
561    GTTACGTAGTTTCTAGTGCAGGAGTCCGGGATCTGTCTACCCTCCTCGCGGAACTTTCGTACAAGGTTCCGTTCCGGGATAC 640
      Hin4I      SfaNI      Bsu36I      MnlI      Hin4I      HaeII      BseRI      BsaJI      Cac8I

```

Figura 13 Mapa de restricción modelado *in silico* a través del programa BioEdit.

La mezcla de las enzimas *BceAI*, *BsgI* y *BsrI* generaron 10 fragmentos, el fragmento número 7 con los sitios de restricción 515-817 fue el más grande con un tamaño de 303 pb y el fragmento número 6 fue el más pequeño con 24 pb en los sitios de restricción 491-514. Todos los fragmentos y sitios de restricción se ven reflejados en el mapa de restricción lineal *in silico* (Fig. 14) y en la Tabla 8.

Tabla 7 Descripción de los números de fragmentos, sitios de corte y tamaño de los fragmentos de la secuencia consenso.

Nº de Fragmentos	Sitios de restricción	Tamaño pb
1	1-147	147
2	148-183	36
3	184-243	60
4	244-462	219
5	463-490	28
6	491-514	24
7	515-817	303
8	818-905	88
9	906-1147	242
10	1148-1302	155

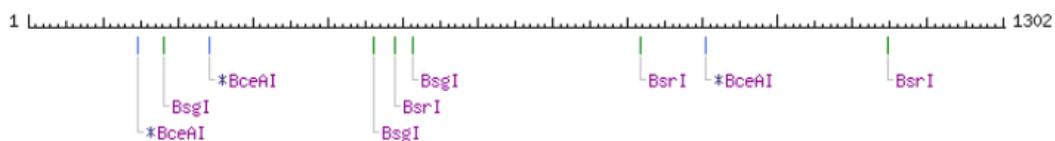


Figura 14 Mapa de restricción lineal *in silico* de la secuencia consenso para secuencias del género *Dunaliella* con el gen *psy*, representando las enzimas seleccionadas en el programa NEBcutter 2.0.

De la misma manera, la mezcla de las enzimas *HgaI*, *MboII* y *HaeII* generaron 10 fragmentos, el fragmento número 4 con los sitios de restricción 247-609 fue el más grande con un tamaño de 363 pb y el fragmento número 1 fue el más pequeño con 12 pb en los sitios de restricción 1-12. Todos los fragmentos y sitios de restricción se ven reflejados en el mapa de restricción lineal *in silico* (Fig. 15) y en la Tabla 9.

Tabla 8 Descripción de los números de fragmentos, sitios de restricción y tamaño de los fragmentos de la secuencia consenso.

Nº de Fragmentos	Sitios de restricción	Tamaño pb
1	1-12	12
2	13-28	16
3	29-246	218
4	247-609	363
5	610-658	49
6	659-726	68
7	727-1006	280
8	1007-1162	156
9	1163-1209	47
10	1210-1302	93

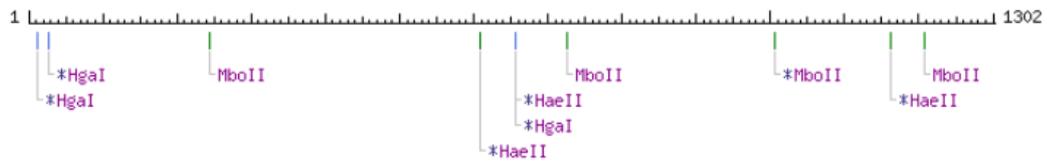


Figura 15 Mapa de restricción lineal *in silico* de la secuencia consenso para secuencias del género *Dunaliella* con el gen *psy*, representando las enzimas seleccionadas en el programa NEBcutter 2.0.

Otra forma de evaluar el mapa de restricción del gen *psy* es utilizando enzimas individuales, por ejemplo a partir del producto PCR con el tamaño de 1302 pb, se procedió a realizar un modelamiento *in silico* del patrón de restricción mediante el programa NEBcutter 2.0. Las enzimas de restricción para este primer modelamiento fueron *BceAI*, *BsgI* y *BsrI*, enzimas que presentaron tres sitios de restricción cada una en la secuencia consenso (Fig. 14). La enzima *BceAI* generó cuatro fragmentos, el más grande fue de 662 pb, seguido de uno de 400 pb, luego uno de 147 pb y el fragmento más pequeño fue de 96 pb. La enzima *BsgI*, también presentó cuatro fragmentos de los cuales el más grande fue de 791 pb, seguido de 279 pb, luego 183 pb y el más pequeño de 52 pb y por último la enzima *BsrI* con sus cuatro fragmentos, el primero fue de 490 pb, seguido de 330 pb, luego 327 pb y el más corto de 158 pb; todos estos fragmentos se ven reflejados en el gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Fig. 16).

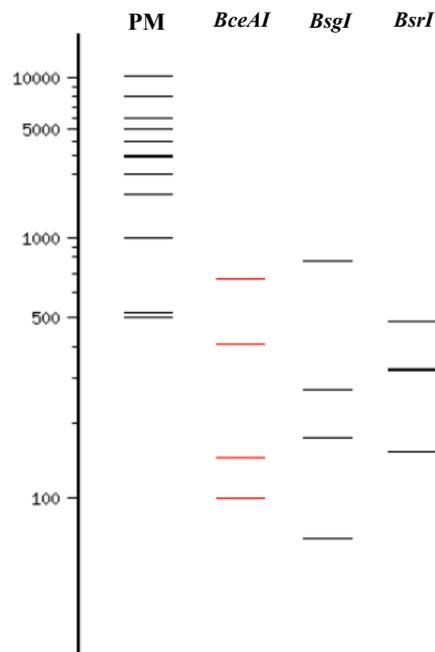


Figura 16 Modelamiento *in silico* del patrón de restricción para el gen *psy* de *Dunaliella*. Las líneas corresponden al tamaño de los fragmentos producidos por la digestión con las enzimas (*BceAI*, *BsgI* y *BsrI*), PM: marcador de peso molecular 1 Kb, en gel de agarosa al 1%.

Así también, con el producto PCR con un tamaño de 1302 pb, se procedió a realizar un modelamiento *in silico* del patrón de restricción mediante el programa NEBcutter 2.0. Las enzimas de restricción para este segundo modelamiento fueron *HgaI*, *MboII* y *HaeII*, enzimas que tuvieron tres cortes en la secuencia del gen *psy*, con excepción de la enzima *MboII* que reconoce y corta cuatro veces (Fig. 15). La enzima *HgaI*, generó cuatro fragmentos, el más grande fue de 647 pb, seguido de uno de 630 pb, luego uno de 16 pb y el fragmento más pequeño fue de 12 pb. La enzima *HaeII*, también presentó cuatro fragmentos de los cuales el más grande fue de 609 pb, seguido de 504 pb, luego 143 pb y el más pequeño de 49 pb y por último

la enzima *MboII* con sus cinco fragmentos, el primero fue de 480 pb, seguido de 280 pb, luego 246 pb, después de 203 pb y el más corto de 96 pb; todos estos fragmentos se ven reflejados en el gel de agarosa al 1% con marcador de peso molecular de 1 Kb (Fig. 17).

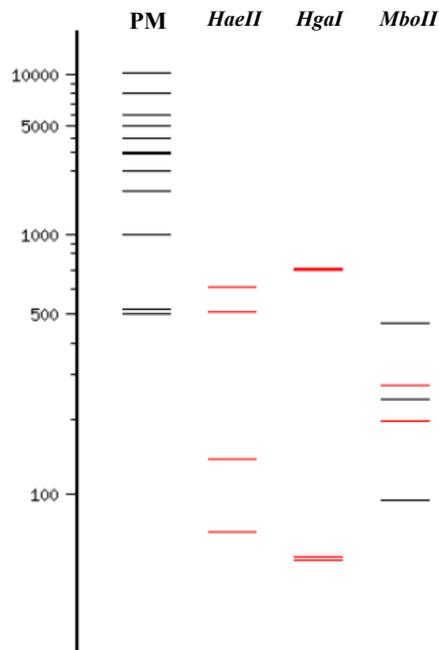


Figura 17 Modelamiento *in silico* del patrón de restricción del gen *psy* de *Dunaliella*. Las líneas corresponden al tamaño de los fragmentos producidos por la digestión con las enzimas (*HaeII*, *HgaI* y *MboII*), PM: marcador de peso molecular 1 Kb, en gel de agarosa al 1%.

9.4. Clonación *in silico*

9.4.1. Diseño de cassette de clonación

Con la finalidad de resguardar la secuencia del gen *psy* se procedió al diseño del cassette de clonación. Teniendo como inserto el gen *psy* anteriormente analizado y como vector de clonación el pCR2.1-TOPO.

El cassette de clonación resultó en un inserto 5' rcbL/gen *psy*/rcbL3', donde 5'rcbL y rcbL3' corresponde al promotor y terminador del gen que codifica para la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo) respectivamente. El promotor 5'rcbL tuvo un tamaño de 390 pb y el terminador rcbL3' tuvo un tamaño de 450 pb. El tamaño total del cassette de clonación resultó en 2142 pb. Además, para la evaluación del cassette de clonación se incluyeron sitios de restricción para 4 enzimas, que tienen la característica de realizar un solo corte en el sitio de reconocimiento diana (Fig. 18). Con estas características quedó listo el cassette de clonación que de aquí en adelante toma el nombre de inserto (Fig. 18).



Figura 18 Cassette de clonación/expresión diseñado como inserto para clonarlo en el vector Topo.

9.4.2. Diseño del vector de clonación

Para el diseño del clonamiento entre el inserto y el vector. Se seleccionó como base el vector comercial pCR2.1-TOPO, mismo que fue descargado desde el sitio web (https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=image_consortium_plasmids&plasmid=pCR2.1-TOPO) (Fig. 19).

En el sitio de múltiple clonaje del vector pCR2.1-TOPO se integró el inserto de 2142 pb, alcanzando un tamaño de 6.1 Kb. El mismo que tiene las siguientes características: marcadores de resistencia a la ampicilina (AmpR), neomicina (NeoR) y la kanamicina (KanR) que se utilizan como selección de bacterias transformantes, origen de replicación, un sitio de múltiple clonaje, sitio ORI para la replicación del inserto, inserto, promotor para el operón Lac Z. El nuevo vector se denomina TOPO-PSY DUNALIELLA (Fig. 20 y 21). Para evaluar el inserto, se puede hacer uso de la PCR convencional, con partidores que flanqueen los extremos 5' y 3' del gen *psy* y que generen un producto de 2142 pb. Así también se puede utilizar la digestión enzimática con las enzimas que flanquean el cassette de clonación. Finalmente se obtuvo el vector de clonación y expresión con el gen *psy* indispensable en la ruta de la biosíntesis de carotenoides para inducir a diferentes microorganismos fotosintéticos la producción de beta-caroteno.

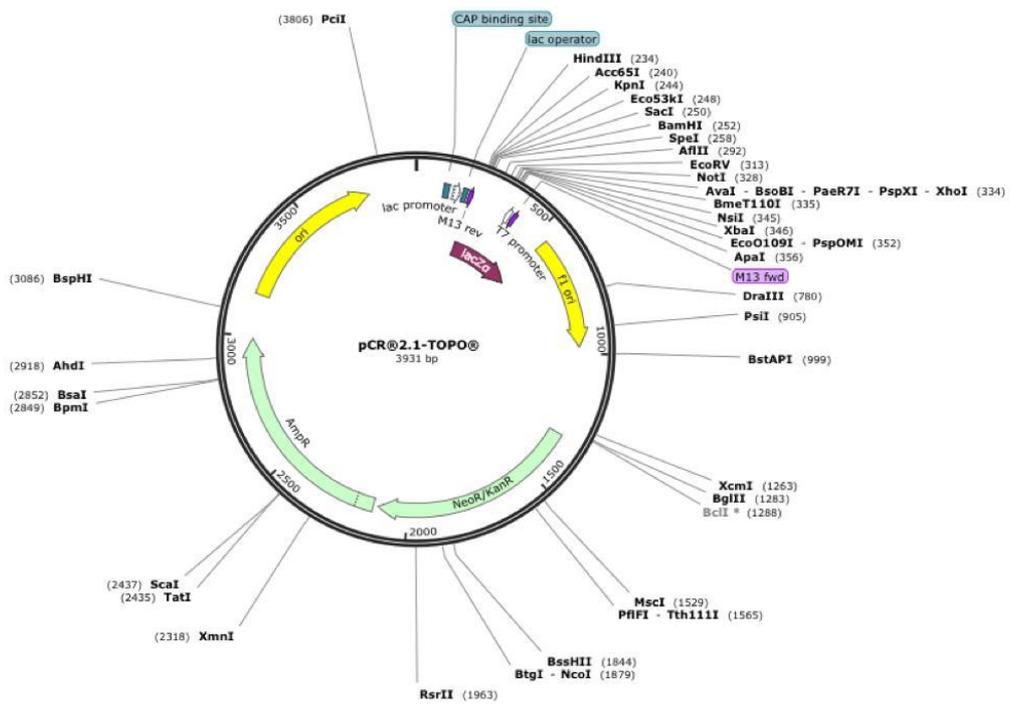


Figura 19 Vector comercial pCR2.1-TOPO (3.9 Kb).

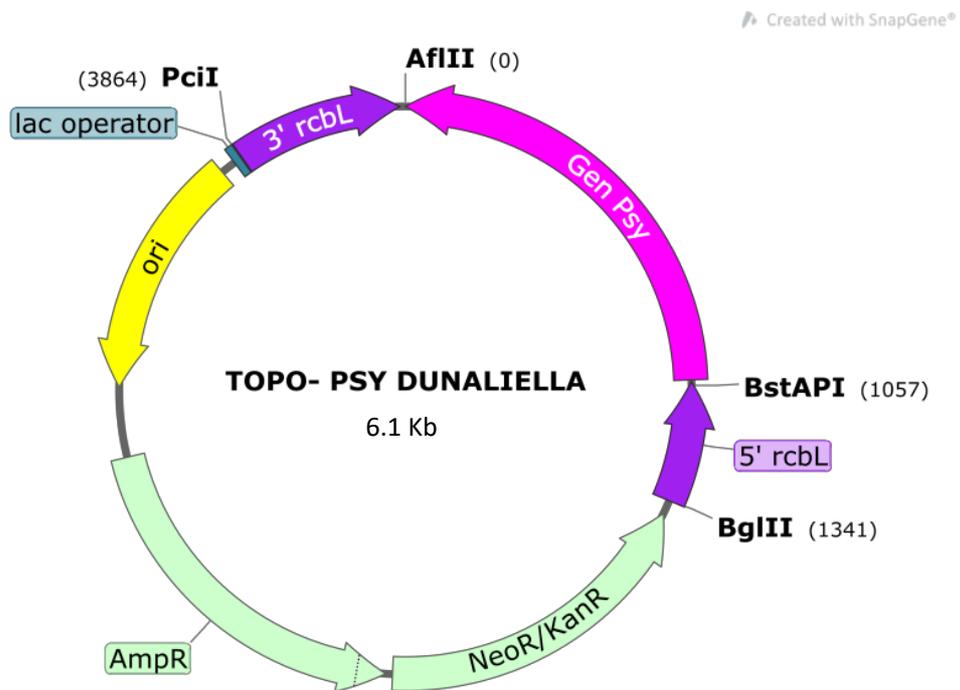


Figura 20 Vector de clonación TOPO-PSY DUNALIELLA (6.1 Kb).

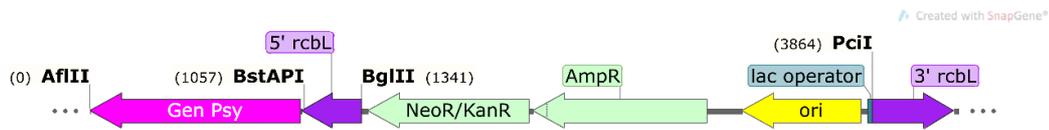


Figura 21 Vector de clonación lineal TOPO-PSY DUNALIELLA (6.1 Kb).

9.4.3. Transformación de bacteria

Una vez listo el vector TOPO-PSY DUNALIELLA de 6.1 Kb, se procede a la transformación bacteriana (integrar el vector dentro de la bacteria). Para este proceso se puede utilizar bacterias comerciales capaces de aceptar el vector por diferentes métodos, físicos o químicos, o choque térmico que estimulen a las bacterias abrir los poros de la pared e ingresar al vector. Luego de la transformación, se puede obtener 3 alternativas de transformación: i) la primera es aquella que contiene el vector recombinante, ii) la segunda es la que contiene solo el vector comercial y iii) la tercera bacteria es la célula que no se pudo transformar. Para llegar a ese resultado, se realiza lo anteriormente descrito: primero el análisis molecular del gen *psy* de la microalga *Dunaliella*, preparación del vector recombinante, y selección de la bacteria (Fig. 22).

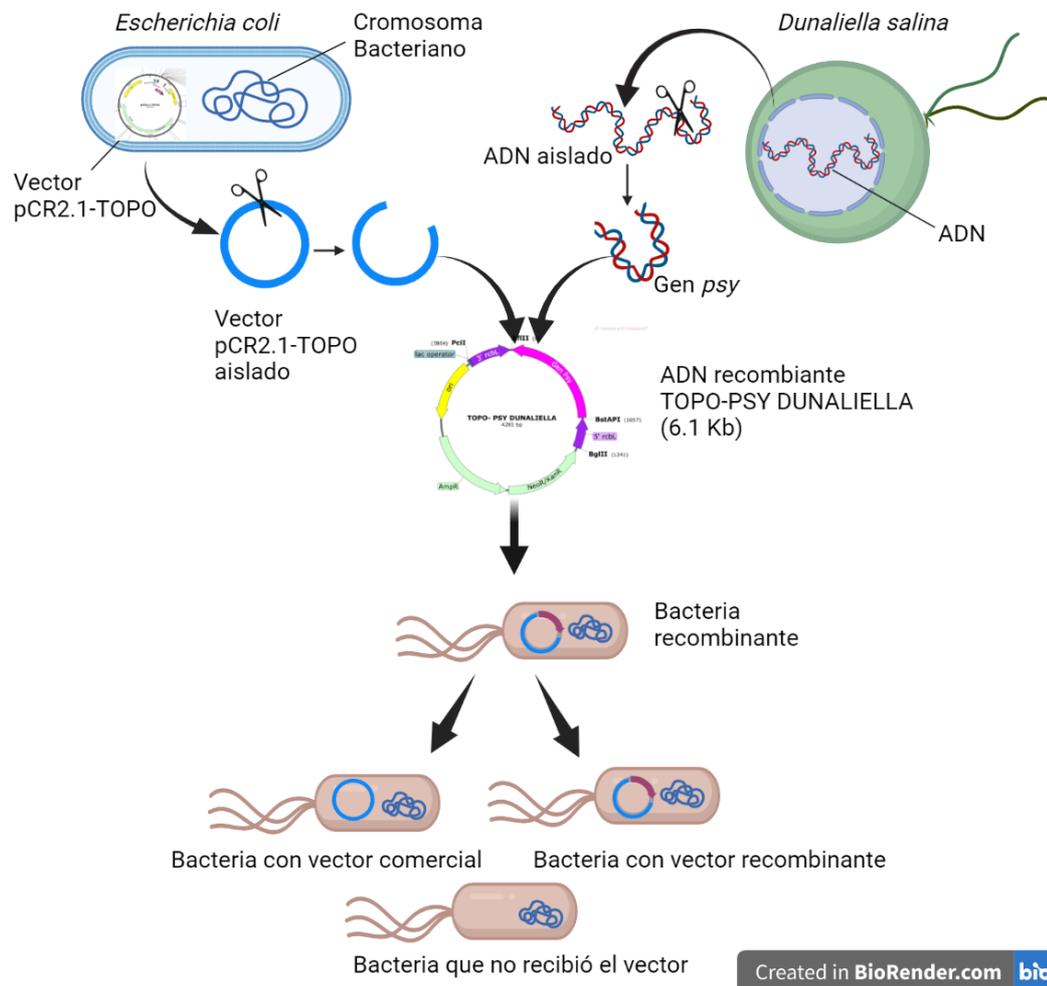


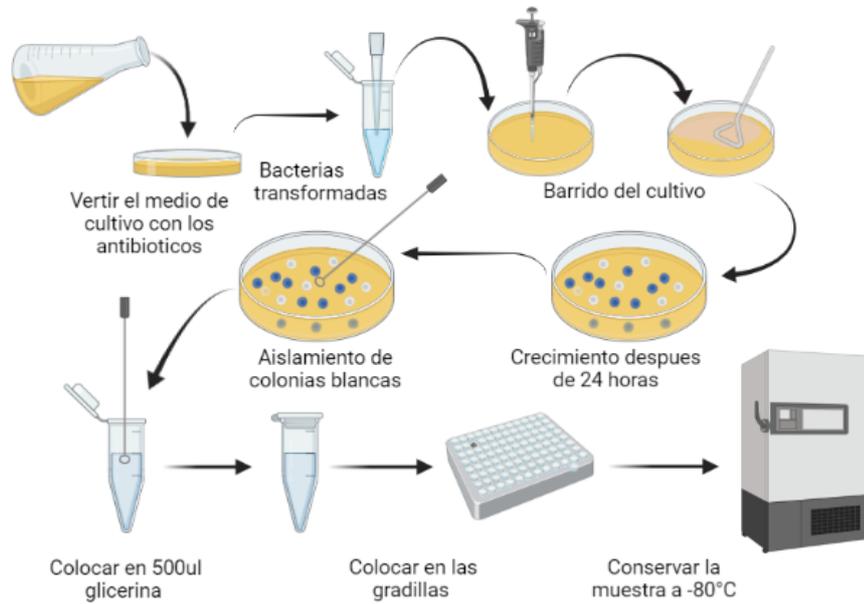
Figura 22 Esquema sobre la transformación de bacterias utilizando programa BioReder.

9.4.4. Diseño de selección

El ADN recombinante (vector + inserto) contiene el operón Lac Z, dirigido por el promotor Lac Z, el mismo que sirve para evaluar las bacterias transformadas. Si el operón Lac Z no ha sido interrumpido las colonias bacterianas presentaran un color azul, mientras que si el operón Lac Z ha sido interrumpido por el inserto presentan colonias blancas. Por tanto las colonias bacterianas que presenten color blanco,

serán aquellas que han integrado el vector recombinante TOPO-PSY DUNALIELLA 6.1 Kb correctamente. Puede ser expresado bajo el control del promotor Lac Z y permitir que al sembrar las bacterias transformantes en un medio selectivo aparezcan solamente colonias que contengan el inserto.

El medio de cultivo para la siembra de bacterias transformadas debe tener el antibiótico específico, en este caso ampicilina (AmpR), neomicina (NeoR) o la kanamicina (KanR), la siembra debe ser en placas Petri y luego de 24 h se deben observar colonias azules y/o blancas. Poco tiempo después, se deben aislar las colonias de color blanco, debido a que estas colonias contienen el vector recombinante como se explicó en el apartado anterior, por ende, solo aquellas bacterias que hayan sido transformadas son resistentes al antibiótico y podrán crecer en el medio de cultivo. Una vez aisladas las colonias blancas, estas se aislaron en tubos eppendorf con 500ul de glicerina y posteriormente conservadas a -80°C (Fig. 23).



Created in BioRender.com bio

Figura 23 Esquema de la selección y conservación de bacterias transformadas, utilizando el programa BioRender.

10. DISCUSIÓN

10.1. General

El gen *psy* ha sido estudiado por diversos autores (Maddi, 2010; Araya, 2012; Cerbantez, 2014; Couoh, 2017; Aguilera, 2018; Crespín, 2019; Pillacela, 2019), los cuales han utilizado herramientas bioinformáticas. Estas herramientas permiten desarrollar modelamientos *in silico* del gen de interés, además, se encuentran altamente caracterizados y testeados estadísticamente para modelar un proceso o producto biológico, tal como la ruta carotenogénica (Huang et al., 2008; Jiménez y Chaparro, 2016; Ávila, 2018; Pillacela, 2019). Además, estos programas ayudan a un mejor entendimiento de los procesos biológicos y pronosticar su funcionamiento, de esta manera los programas permiten tener un resultado confiable previsto y a menor costo, donde es posible aprovechar los datos arrojados y trabajar con mayor eficiencia en distintas áreas (Ávila, 2018).

De acuerdo con Cerbantez (2014), el alineamiento doble lo realizó utilizando la herramienta online BLAST, donde implementó un análisis y comparación de las secuencias de interés, del mismo modo Maddi (2010), para el alineamiento doble utilizó el programa BLAST y el software Biomatters Ltd, al igual que estos autores, en este trabajo también se utilizó el programa BLAST para realizar el alineamiento doble de cuatro secuencias del gen *psy* pertenecientes a especies del género *Dunaliella*. Según lo planteado por Crespín (2019), para el alineamiento múltiple

ejecutó el ClustalW Alignment, implementando el programa Geneious Prime, a diferencia de este estudio, para realizar el alineamiento múltiple ejecutando ClustalW Alignment se utilizó el software BioEdit, el cual también ha sido utilizado por Pillacela (2019) para alinear las secuencias y diseñar el mapa de restricción, estos fueron los argumentos científicos que en este trabajo nos permitieron aplicar modelamientos *in silico* semejantes. Aguilera (2018) y Maddi (2010), indican que en sus trabajos utilizaron el programa bioinformático OligoAnalyzer para la verificación de temperatura de fusión y demás características para la construcción de partidores, teniendo en cuenta lo manifestado por Cerbantez (2014), menciona que en su trabajo utilizó el programa Primer3 para el diseño de partidores, de la misma manera, el autor Araya (2012), utilizó el programa Primer Premier 5.0 (Biosoft International) para diseñar los partidores específicos, a pesar de ser un buen programa que cumple los propósitos de diseño, en este estudio se utilizó la herramienta Oligo Calc (Olonucleotide Properties Calculator) para la elaboración de partidores tanto específicos como universales, debido a que en trabajos anteriores de Pillacela (2019) y Crespín (2019) relacionados al modelamiento de secuencias de microalgas y diseño de partidores lo aplican, además, citando a los mismos autores, de la misma manera que en este trabajo se utilizó la herramienta PRIMER-BLAST (NCBI) para garantizar la amplificación, realizar un modelamiento *in silico* de la PCR y asegurar que ocurra la hibridación. Por otro lado Pillacela (2019) y Crespín (2019), quienes implementaron el programa online NEBcutter v2.0 para digerir mediante enzimas de restricción el

producto PCR y construir un mapa de restricción, de la misma manera, en este estudio se hizo uso del programa NEBcutter 2.0 con el fin de elaborar dos mapas de restricción *in silico* en el cual se seleccionaron enzimas de restricción anteriormente seleccionadas en el programa BioEdit. Couoh (2017), el cual argumenta que utilizó la herramienta bioinformática SnapGen para verificar que los sitios de restricción no estén dentro de la secuencia del gen de interés, tal como en este trabajo, dado que se utilizó el programa SnapGen para seleccionar dos enzimas que corten una sola vez en el sitio de múltiple clonaje para poder ligar el inserto que contiene el gen de interés, de igual modo se utilizó este programa para verificar que las enzimas de restricción seleccionadas corten el vector mas no el inserto y posteriormente construir el vector TOPO-PSY DUNALIELLA. Todos estos estudios realizaron análisis *in silico* mediante herramientas bioinformáticas, donde posteriormente corroboraron sus datos de manera experimental, concluyendo que el análisis *in silico* es de suma importancia en todos los estudios, por lo que a continuación detallamos.

10.1.1. Alineamiento doble

Para el alineamiento doble se seleccionaron secuencias que presenten un porcentaje de similitud e identidad mayor al 80% tal como expresa López (2017), en donde consideraron secuencias genómicas de los genes *psy*, con un porcentaje de identidad mayor al 80% para poder diseñar partidores específicos funcionales, debido a que

con ese porcentaje de identidad las secuencias aseguran gran cantidad de regiones conservadas.

Por otro lado, el alineamiento que entrega la plataforma BLAST nos permite reconocer las similitudes entre las secuencias en estudio y las mutaciones que presentan cada una. Flores (2005) sostiene que las secuencias pertenecientes a la especie *D. bardawil* contiene más mutaciones en el gen de interés comparadas con *D. salina*, sin embargo, esta afirmación no se sostuvo en este trabajo, debido a que la secuencias de *D. salina* presentaron 0 mutaciones (MN732755.1) y 192 mutaciones (AY601075.1), mientras que las secuencias de *D. bardawil* presentaron 3 mutaciones (EU328287.1) y 128 mutaciones (U91900.1). Desde el punto de vista de Junco y Rodríguez (2001), las mutaciones pueden ser de diferentes tipos, por sustitución (transversión y transición), delección e inserción de bases nitrogenadas. Además, Junco y Rodríguez (2001) argumentan que las mutaciones por sustitución pueden ser causadas por apareamiento erróneo entre las bases nitrogenadas complementarias durante la replicación y las mutaciones por delección e inserción de las bases interrumpen el orden en la traducción y por ende pueden alterar un codón y dar como resultado una secuencia proteica diferente, relacionando lo descrito por Junco y Rodríguez (2001) y este estudio, en la secuencia de *D. salina* (AY601075.1) se evidenciaron las mutaciones por sustitución, inserción y delección, en la secuencia de *D. bardawil* (EU328287.1) se apreció solamente

mutaciones por transición y por último en la secuencia de *D. bardawil* (U91900.1) se evidenciaron las mutaciones por sustitución, inserción y delección.

10.1.2. Alineamiento múltiple

Para el alineamiento múltiple se corrió el programa BioEdit con 4 secuencias del gen *psy* pertenecientes al género *Dunaliella*, en el cual se evidenciaron regiones variables y regiones conservadas dentro del alineamiento y de acuerdo con el trabajo realizado por Flores (2005) realizaron un alineamiento de secuencias pertenecientes al género *Dunaliella*, incluyendo las especies *D. bardawil*, *D. salina* y *D. parva* donde también identificaron regiones variables y conservadas del gen en estudio, al igual en los trabajos de Crespín (2019); Pillacela (2019). Yáñez (2011) y Lee & Hur (2009) enfatizan que para el diseño de los partidores específicos y universales, se requiere realizar los alineamientos a base de secuencias del sitio web GENBANK (NCBI) y que estas secuencias presenten amplios rangos de regiones conservadas.

10.2. Diseño de partidores y amplificación *in silico*

En Ecuador los estudios sobre identificación taxonómica de *Dunaliella salina* es muy escasa, sin embargo, existen pocos trabajos donde utilizan la técnica tradicional de taxonomía y otros que utilizan técnicas moleculares como en el trabajo de Tomalá (2021), el cual expresa que identificó una cepa aislada en la

Península de Santa Elena, aplicando técnicas moleculares y utilizando el gen *18S-ARNr*, logrando identificar la microalga *Dunaliella* a nivel de género. Teniendo en cuenta que esta microalga ha sido identificada en la Península de Santa Elena y tiene una gran importancia biotecnológica, se seleccionaron las secuencias específicas del género *Dunaliella* para el diseño de partidores.

Los partidores tanto específicos como universales fueron diseñados dentro de las regiones mayormente conservadas de las secuencias y para ellos se siguieron varios criterios como: tamaño del partidador entre 20 a 25 pb tal como menciona Mantilla (2010), ya que si contiene un mayor número de pares de bases pueden formar estructuras secundarias, contenido de citosina y guanina (%CG) debe estar entre 50-52% como indica Siqueiros (2017) y temperatura de fusión o melting (T_m) entre 60-65°C según Olmos et al (2000) y que entre los partidores no difieran más de 5°C afirma Mantilla (2010). Escalante (2019) reveló que la temperatura de fusión óptima fue de 65°C. No obstante, trabajos como los de van Pelt-Verkuil et al (2008); Debnath et al (2010); Escalante (2019) consideran que el partidador debe tener un tamaño entre los 18 a 30 nucleótidos, el contenido de CG entre el 40 y 50 % y la temperatura de fusión no debe variar de 2 a 3°C, ya que se podrían amplificar productos no deseados. Mientras que Pacheco (2021), describe que en el diseño de los cebadores procuraron que el porcentaje de CG no sea menor a 55%, debido a que este porcentaje confiere una especificidad al momento de la hibridación.

Los trabajos realizados por Olmos et al (2000) y Flores (2005), al igual que en este estudio, realizaron dos grupos de partidores para el género *Dunaliella*, uno de partidores específicos y otro de partidores universales, mientras que López (2017) expresa que solamente realizaron partidores específicos para microalgas. Los diseños de partidores de Flores (2005) al igual que los de este trabajo se realizaron con el alineamiento de secuencias de microalgas del género *Dunaliella* y sus regiones altamente conservadas con el objetivo de amplificar todos los genes de interés de las microalgas del género *Dunaliella*. Además, Flores (2005), manifiesta que amplificaron un producto PCR de 750 pb que corresponde al producto esperado para *Dunaliella salina* utilizando los partidores específicos y por otro lado también amplificaron un producto PCR de 2100 pb utilizando los partidores universales. Olmos et al (2000), logró amplificar un producto PCR con un tamaño de 2170 pb del gen con diferentes cepas de microalgas del género *Dunaliella*. Mientras que en este trabajo el producto amplificado para partidores específicos fue de 412 y 464 pb y los productos del PCR para partidores universales fueron 1218 y 1302 pb. Mientras que López (2017) con sus partidores específicos obtuvo un producto PCR de 1290 pb. El tamaño del gen *psy* como producto amplificado en base al estudio de Zhao et al (2011) va de 644 pb a 1 Kb para partidores específicos, lo cual indica que los partidores de este trabajo se encuentran por debajo de estos tamaños, no obstante, nuestros productos amplificados para partidores universales están dentro de lo postulado por Zhao et al (2011).

10.3. Patrones de restricción modelados *in silico*

La secuencia consenso se utiliza para estudios moleculares, principalmente para mapas de restricción debido a que esta secuencia es el resultado de un alineamiento de demás secuencias con el fin de que cuando se realizan los mapas de restricción, las enzimas dependientes de las secuencias que se usaron para el alineamiento reconozcan los sitios de restricción dentro de la secuencia consenso. Aguilar (2021) y Gavilanes (2021), dan a conocer que en sus trabajos que obtuvieron y utilizaron secuencias consenso para poder obtener una secuencia de mayor tamaño al complementar todas las secuencias en el alineamiento múltiple, sin embargo en este trabajo la secuencia consenso se obtuvo para tener una secuencia molde universal para el gen *psy* en especies del género *Dunaliella*, a partir de esta secuencia se pudo construir partidores universales y obtener dos más de restricción a partir del producto amplificado del PCR.

A partir de la secuencia consenso se obtuvieron dos mapas de restricción *in silico* por medio del software BioEdit, el mapa indicó que el gen *psy* cuenta con sitios de restricción para enzimas que hacen cortes de tipo romo y cortes de tipo cohesivo. Los sitios de restricción se corroboraron con el programa NEBcutter 2.0 donde se elaboraron los dos mapas *in silico* con las siguientes enzimas de restricción elegidas: *BceAI*, *BsgI*, *BsrI*, *HgaI*, *MboII* y *HaeIII*. Pillacela (2019) sostiene que el programa NEBcutter 2.0, es capaz de revelar los sitios de restricción y los tamaños

de los fragmentos producidos de por las enzimas de restricción escogidas para la digestión de la secuencia de interés, lo cual pudimos corroborar en este trabajo, al igual que en los trabajos de Vincze et al (2003) y Roberts et al (2010). De acuerdo a Cienfuegos et al (2008), los tipos de mapas que son revelados por el programa NEBcutter 2.0 presentan tamaños observables en el gel de agarosa además de los fragmentos que se denominan terminaciones, ya que son los extremos sobrantes dejados por el corte de las enzimas. Por último, Flores (2005) y Siqueiros (2017), argumentan que para la electroforesis *in silico* utilizaron gel de agarosa al 1.2%, mientras que en este estudio se realizó en un gel de agarosa al 1%.

10.4. Clonación *in silico*

10.4.1. Diseño del cassette de clonación

Mantilla (2010), postula que el cassette de clonación consiste en el promotor, el gen de interés y el terminador, de tal manera que este postulado nos ayudó a asegurar el diseño del cassette, ya que el cassette contiene el promotor 5' rcbL/ gen *psy* y terminador rcbL 3' y resultó en un cassette con tamaño de 2142 pb. La elección de un promotor y un terminador adecuado es fundamental para clonar y expresar los genes de interés, sin embargo los promotores y terminadores capaces de dirigir la expresión genética no están del todo bien caracterizados en algunas microalgas, por tal razón, se escogió el promotor y terminador RuBisCo ya que esta proteína permite a las microalgas adaptarse a los cambios bruscos en su ambiente por poseer sistemas

de carboxilación (Shalini et al., 2015). Además, este promotor y terminador RuBisCo contiene secuencias específicas y elementos de respuesta que funcionan como sitios de unión para el ARN polimerasa y factores de transcripción que regulan la expresión genética (Dale et al., 2002; Shalini et al., 2015).

10.4.2. Diseño del vector de clonación

Klug et al., (2016) y Pacheco (2021), expresan que la clonación se define como el proceso de producción masiva de copias idénticas de un gen de interés, para ello se utilizan vectores; también se han modificado genéticamente para contener una serie de sitios de restricción para enzimas de restricción de uso común en una región llamada sitio de clonación múltiple. Ávila (1995) menciona que una vez dentro de la célula, los plásmidos se replican rápidamente para producir múltiples copias. Todo lo mencionado se aplicó en el diseño de clonación de este trabajo, utilizando el vector comercial pCR2.1-TOPO.

Los genes *psy* y *pds* de la ruta metabólica han sido mayormente clonados y expresados en microalgas, debido a que todas estas enzimas son piezas clave en la ruta carotenogénica para la biosíntesis de beta-caroteno en respuesta a estímulos ambientales, cuya expresión ha sido estudiada en diferentes algas clorofitas como

Dunaliella salina (Abalde et al., 1999; Srinivasan y Gothadam, 2017; Galarza et al., 2018).

Los vectores comerciales más utilizados son: pUC19 (Invitrogen) que contiene un gen de resistencia a la ampicilina, los insertos clonados pueden ser expresados bajo el control del promotor Lac, además contiene el gen *Lac Z* que permitió seleccionar por color las colonias recombinantes y por último, contiene un origen de replicación para *E. coli*. pCR Blunt II TOPO (Invitrogen), permite una selección directa de las bacterias recombinantes, de tal manera que después de sembrar las bacterias transformantes en un medio selectivo solamente aparecen las colonias que contienen el inserto. pET21a (Novagen) contiene un gen de resistencia a la ampicilina que permite seleccionar las bacterias transformantes, la clonación y expresión es transcrita por ARN polimerasa. pACCRT-EBP y pACCRT-EBR permiten que las células transformadas produzcan la acumulación de productos fotosintéticos, el vector cuenta con resistencia a cloranfenicol y brinda coloración amarilla a las colonias transformantes. pET21-zdsFc, vector que contiene gen de resistencia a la ampicilina y es transcrita por el ARN polimerasa. pET21-LycB, plásmido que permite seleccionar transformantes resistentes a la ampicilina y pGAPZaA (Invitrogen), vector que contiene origen de replicación para *E. coli* con un gen de resistencia a zeocina (Araya, 2012). pCR2.1-TOPO, vector comercial utilizado por su capacidad de ligación directa entre el plásmido y los productos de

la amplificación, además contiene marcadores de resistencia a la ampicilina y kanamicina, por último, cuenta con el promotor de *Lac Z* que des reprime el análogo a la lactosa y se une a un represor inactivándolo (Yáñez, 2002; Briones, 2008). Todas estas clonaciones están relacionadas con este trabajo, debido a que todos los vectores contienen marcadores de resistencia a diferentes antibióticos, sin embargo, buscan obtener el mismo fin que es obtener la inserción de las secuencias codificantes de los genes, clonarlos y expresarlos para posteriormente realizar la transformación.

En el estudio de López (2017), el producto PCR de 1290 pb fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO, no obstante en este trabajo, el inserto fue un producto de 2142 pb en el mismo vector comercial pCR2.1-TOPO. Romero (2016) indica que en su trabajo utilizó el kit comercial “*TOPO-TA Cloning® vector pCR2.1-TOPO*” (Invitrogen) para clonar su gen de interés. Además, cabe mencionar que Ávila (1995) afirma que los vectores TOPO pueden aceptar insertos entre los 0,5 a 5 kb, lo cual coincide con lo obtenido en este estudio, ya que el inserto fue de 2.1 Kb dentro del rango descrito.

10.4.3. Transformación de bacteria

Ávila (1995), asegura que la transformación es un fenómeno por el cual las células bacterianas adquieren nuevos marcadores genéticos por la incorporación de ADN. Por otro lado Gómez et al (2018), expresa que para transformar la bacteria de *Escherichia coli* se necesita someterla a un choque térmico y así obtener varias réplicas del plásmido diseñado, lo cual coincide con lo que se realizó en este trabajo, ya que una vez listo el vector TOPO-PSY DUNALIELLA de 6.1 Kb, se procede a la transformación bacteriana (integrar el vector dentro de la bacteria). Para este proceso se puede utilizar bacterias comerciales capaces de aceptar el vector por diferentes métodos, físicos o químicos, o choque térmico que estimulen a las bacterias abrir los poros de la pared e ingresar al vector. Yoshida et al (2009) y Mantilla (2010), también manifiestan que para la transformación se necesita un método de choque térmico para introducir y clonar el vector de interés. Pacheco (2021), afirma que los plásmidos se introducen en las bacterias mediante el proceso de transformación bacteriana con la técnica principal de choque térmico. Como plantea Araya (2012), la cepa de *E. coli* fue utilizada para la transformación, en donde obtuvieron la cepa de *E. coli* con el plásmido comercial que portaba los genes de interés *psy*. Con las sugerencias anteriores, nosotros diseñamos *in silico* la transformación en la bacteria *E. coli*, con el fin de conseguir la mayor amplificación del gen *psy*.

10.4.4. Diseño de selección

En el trabajo realizado por Araya (2012), afirman que el vector pCR-TOPO, permitió una selección directa de los recombinantes de tal forma que después de sembrar las células transformantes en un medio selectivo, aparecieron solamente las colonias que contenían el inserto. Sin embargo, en el diseño que se realizó en este estudio demuestra que el medio de cultivo para la siembra de bacterias transformadas debe tener el antibiótico específico, en este caso ampicilina (AmpR), neomicina (NeoR) o la kanamicina (KanR), la siembra debe ser en placas Petri y luego de 24 h se deben observar colonias azules y/o blancas. Poco tiempo después, se deben aislar las colonias de color blanco, debido a que estas colonias contienen el vector recombinante como se explicó en el apartado anterior, por ende, solo aquellas bacterias que hayan sido transformadas son resistentes al antibiótico y podrán crecer en el medio de cultivo lo cual coincide con el trabajo de Briones (2008). Las colonias toman el color blanco debido a que las bacterias que portan el plásmido con gen recombinante no son capaces de producir la enzima beta galactosidasa porque la region que sintetiza esta enzima se rompe para dar paso a la secuencia recombinante, por lo tanto el operón lac Z se ve interrumpido y forman las colonias blancas y las bacterias que contengan el vector pero no tengan el inserto van a formar colonias azules, ya que el operon lac Z se encuentra funcional para inducir la beta galactosidasa (Maddi, 2010).

11. CONCLUSIONES

Los alineamientos doble y múltiple de las secuencias del gen *psy* de *Dunaliella* sp obtenidas desde el GenBank ayudaron a diferenciar mutaciones de tipo sustitución, inserción y delección. Así mismo, el alineamiento múltiple permitió la identificación de las regiones conservadas a partir de las cuales se diseñaron los 2 partidores específicos y 2 partidores universales.

La amplificación *in silico* del gen *psy* mediante PCR, utilizando los partidores específicos diseñados en este trabajo PSY-001F/PSY-001R generaron un producto de 464 pb, así también PSY-002F/PSY-002R un producto de 412 pb, mientras que los partidores universales PSY-003F/PSY-003R generaron un producto de 1218 pb y PSY-004F/PSY-004R y un producto de 1302 pb, los mismos que pueden ser utilizados para la identificación del gen en estudio.

Se obtuvieron *in silico* 2 patrones de digestión del gen *psy*, cada uno con 6 enzimas de restricción, siendo para el primer caso *BceAI*, *BsgI*, *BsrI*, las cuales generaron 10 fragmentos de tamaños entre 24 pb y 303 pb y para el segundo caso las enzimas *HgaI*, *MboII* y *HaeII* que también generaron 10 fragmentos de tamaños entre 12 pb y 363 pb.

Para conservar la información del gen *psy* de *Dunaliella* sp se diseñó un vector de clonación *in silico* llamado TOPO-PSY DUNALIELLA con un tamaño de 6.1 Kb y para asegurar la amplificación del vector recombinante se transformó en bacterias de *E. coli*, para las cuales posteriormente se realizó el diseño de selección.

12. RECOMENDACIONES

Los análisis *in silico* son los primeros análisis que un investigador debe realizar para predecir y comprender los posibles resultados de los análisis de las secuencias del gen *psy*, por lo que se recomienda realizar el trabajo experimental para contrastar con los resultados de este estudio.

El género *Dunaliella* tiene un elevado valor biotecnológico debido a sus características biológicas como la producción de carotenoides en gran cantidad, sin embargo, sería muy útil implementar la metodología de este trabajo con genes de interés de otras especies de microalgas presentes en la Península de Santa Elena con potencial biotecnológico.

Para posteriores estudios, sería factible que se trabaje con otro gen clave implicado en la ruta de los carotenoides, debido a su gran importancia biotecnológica, para obtener un mayor conocimiento y aportar a la investigación científica.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Orosa García, M., Torres, E., & Cid, A. (1999). La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina.
- Aguilar, D. (2021). Obtención del promotor híbrido RIA3/HSP70A/RBCS2 en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Aguilera, E. (2018). Estudio de la funcionalidad del gen DcPSY1 y su rol en la tolerancia a estrés abiótico mediante sobreexpresión en plantas de *Daucus carota*.
- Araya, G. (2012). Búsqueda, clonación y expresión de genes de carotenogénesis.
- Atawodi, S., Atawodi, J., & Dzikwi, A. (2010). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review . *Sahel Medical Journal*, 13(2), 54-63.
- Ávila Oroya, J. S. (2018). Caracterización *in silico* del gen *lip* de *Marinobacter* sp. aislado de las Salinas de Pilluana.
- Ávila, J. T., De Vera, A. M., Hernández, C., & Vasallo, P. M. (1995). Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*, 13(4), 267-279.
- Briones, M. C. (2008). Construcción de un vector para clonar productos de PCR: Master's thesis.
- Bubrick, P. (1991). *Biores. Technol.* 38: 237-239.
- Cajachagua, C. L. (2018). Elaboración de constructos genéticos para la expresión soluble de *FimH* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

- Campo, J., García, M., Guerrero, M. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1163–1174.
- Cejudo, A. G., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J. J., & Reyes, E. F. (2012). Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante.
- Cerbantez Eloel. B. V. (2014). Análisis de la expresión de los genes *zds* y *crtiso* en diferentes tejidos de *Bixa orellana* L.
- Chaney, L., Sharp, A., Evans, C. y Udall, J. (2016). Genome Mapping in Plant Comparative Genomics. *Trends in Plant Science*. 21(9), 770–780.
- Cienfuegos, A., Conn, J., Gomez, G. y Correa, M. (2008). Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev Biomed*. 19, 35–44.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L., & Varela, J. C. S. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10(5), 602-611.
- Couh Dzul, O. J. (2017). Aislamiento, clonación y expresión del gen de la *amidohidrolasa* IAR3 de *Coffea canephora*
- Couso, I., Vila, M., Rodriguez, H., Vargas, M. A., & Leon, R. (2011). Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas*

reinhardtii leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnology progress*, 27(1), 54-60.

Crespín Buestan, E. K. (2019). Aplicación de técnicas moleculares en la identificación de *Tetraselmis sp.*, utilizando el gen *18S ARNr* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2019).

Dale, P., Clarke, B., y Fontes, E. (2002). Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat Biotechnol*; 20:567–74.

Debnath, M., Prasad, S., & Bisen, P. S. (2010). Molecular Diagnostics: Promise and Possibilities. Springer Netherlands.

Escalante Pin, M, K. (2019). Efecto de la temperatura en la amplificación del Gen *18S ARNr* de dos microalgas a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2020.).

Fariz Salinas, E. A. (2019). *Identificación de bioproductos de interés comercial en microalgas floculantes nativas del estado de Nuevo León, México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Fernández Cordero, B. (2013). Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*.

Flores, R. C. (2005). Identificación molecular de cepas de *Dunaliella salina*, evaluación de la acumulación de B-caroteno y determinación de la variabilidad genética intraespecie.

- Galarza, J. I., Gimpel, J. A., Rojas, V., Arredondo-Vega, B. O., & Henríquez, V. (2018). Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. *Algal research*, 31, 291-297.
- García Baldenegro, C. V. (2011). Expresión de genes involucrados en la síntesis de carotenoides en el fruto de tomate por la aplicación de oligogalacturónidos y ethephon (Doctoral dissertation, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo).
- Gavilanes, C., Ordóñez, S., & Ríofrío, P. (2021). Aislamiento y caracterización molecular de cepas fitoplanctónicas obtenidas en Engabao, Guayas-Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 15(2).
- Gómez E, V. (2004). Parte II, Herramientas Básicas de Ingeniería. Genética Biotecnológica y Mejoramiento Vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- Gómez Luna, L. M. (1997). Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba.
- Gómez, L. Y., Gómez, S., & Núñez, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia en Desarrollo*, 9(2), 9-16.
- Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., & Camacho, J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus*

- pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24.
- González, C. D., Fernández, D. J., Castillo, C. P., & Angiolillo, G. (2015). Clonación por simulación computacional como herramienta de trabajo en biología molecular. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 46(1-2), 125-132.
- Grossman, A. R., Lohr, M., & Im, C. S. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 119-173.
- Guiry, M., & Guiry, G. (2008). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Herrera Martínez, V. (2011). Aislamiento, clonación y estudio *in silico* de los genes *accoxidasa*, *accsintasa*, *Expansina* y *Endoglucanasa* en guayaba (*Psidium guajava* L).
- Huang, D., Sherman, B. y Lempicki, R. (2008). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 37(1), 1–13.
- Jiménez, J., y Chaparro, A. (2016). *In silico* design and functional assessment of semisynthetic genes that confer tolerance to phosphinothricin. *Rev. Colomb.Biotecnol.* XVIII (2).
- Johansen, S., Emblem, A., Karlsen, O., Okkenhaug, S., Hansen, H., Moum, T., Coucheron, H., Seternes, O. (2010). Approaching marine bioprospecting in hexacorals by RNA deep sequencing. *New Biotechnol* 27:267–275.

- Junco, R., & Rodríguez, C. M. (2001). *Genética microbiana*.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2016). *Concepts of Genetics* (XIth edition). Pearson.
- Lee, H. & Hur, S. (2009). Genetic Relationships among Multiple Strains of the Genus *Tetraselmis* Based on Partial *18S rDNA* Sequences. *Algae*, 24(4), pp. 205-212.
- Lemoine Y, Schoefs B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *PsynR* 106:155–77.
- Li, X., Li, S., Lang, Z., Zhang., J., Zhu, L. y Huang, D. (2013). Chloroplast- targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports*, 32(8), 1299-1308.
- López Emparán, A. E. (2017). Estudio de la diversidad funcional de la familia fitoeno sintasa (*PSY*) en *Brassica napus L.* e ingeniería metabólica del contenido de carotenoides (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Instituto de Ciencias Biológicas).
- López, Y. K. (2008). Caracterización genética y de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de *Dunaliella salina* bajo condiciones de estrés salino. Trabajo de Grado de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica) Instituto Politécnico Nacional, Universidad de México, México.

- Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., & Welsch, R. (2009). Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One*, 4(7), e6373.
- Maddi, S. R. (2010). Cloning of a CHLAMYDOMONAS REINHARDTII Marker into a RNA Interference Construct to Test Whether the Photoreceptor Chlamyrodopsin Is Involved in Circadian Clock Resetting.
- Mantilla Pérez, J. (2010). Clonación del gen rv1411 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en *Escherichia coli* y su integración en el genoma de *Pichia methanolica*.
- Mesas, J. M., Rodríguez, M. C., & Alegre, M. T. (2006). prS4: Un vector de clonación idóneo para bacterias ácido-lácticas de uso alimentario prs4: an appropriate cloning vector for lactic-acid bacteria of food use. *cyta-journal of food*, 5(2), 118-123.
- Montoya Villa, Y. V., & Montes Correa, L. A. (2020). Estandarización de técnicas moleculares basadas en amplificación y análisis de restricción para la identificación de especies de *Aspergillus spp.*
- Moreno Beltrán, J. C. (2012). Caracterización funcional del gen *licopeno β-ciclasal (lcyb1)* de *Daucus carota* (zanahoria) mediante un aumento en sus niveles de expresión en modelos vegetales (Doctoral dissertation, Universidad de Chile).
- Morgado, F., & Vieira, L. R. (2020). Marine Bioprospecting to improve knowledge of the biological sciences and industrial processes. *Affordable and Clean Energy*, 1-14.
- NCBI. (2017). National Center for Biotechnology Information.
- Olmos, J., Paniagua, J. y Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella sp.* utilizing the *18S rDNA* gene. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 80–84.

- Pacheco Capcha, K. B. (2021). Caracterización *In silico* y clonación del gen *Aspartil Aminopeptidasa* a partir de datos NGS (next generation sequencing) del halófilo moderado *Chromohalobacter salexigens* MP25462.
- Parra, O., Gonzalez, M., Dellarossa, V., Cifuentes, A. S., & Conejeros, M. (1990). Caracterización biológica de una cepa chilena de *Dunaliella salina* potencialmente comerciable. *Arch. Biol. Med. Exp*, 23, 141-146.
- Pillacela Zhunio, B. J. (2019). Patrones de restricción *in silico* para el estudio del gen *pds* en una microalga chlorophyta (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2019.).
- Preising, H.R. (1992). Morphology and taxonomy. En: *Dunactietac: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. M., A. 8s Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 1=15.
- Ramos Pedrosa, A. (2009). Molecular basis of isoprenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* (Doctoral dissertation).
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E. S., & Varela, J. C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1), 3-20.
- Roberts, R., Vincze, T., Posfai, J. y Macelis, D. (2010). REBASE-a database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 38: D298–D299.

- Rodríguez, V., Gas, E., Rodríguez, C. (2009). Phytoene activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis seedling*. *The Plant Journal* 60: 424-435.
- Romero Carrera, N. N. (2016). Clonamiento y análisis funcional de la agmatinasa de ratón.
- Sambrook, J y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. Pag. 1.28.
- Shalini, M., Stasolla, C., Brute-Babel, A & Ayele, B. (2015). Isolation and characterization of rubisco small subunit gene promoter from common wheat (*Triticum aestivum* L.). University of Manitoba Winnipeg, Manitoba Canada ReT 2N2.
- Siqueiros Vargas, F. (2017). Caracterización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la bioacumulación de β -caroteno en *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*.
- Sperstad, S., Haug, T., Blencke, H., Styrvold, O., Li, C., Stensvåg, K. (2011). Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol Adv* 5:519–530.
- Srinivasan, R., Babu, S. Gothandam, K. (2017). Accumulation of Phytoene, a colorless carotenoid by inhibition of phytoene desaturase (PDS) gene in *Dunaliella salina* V-101. *Bioresource Technology*. 242, 311–318.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K. (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 37:133–138.
- Takaichi S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar Drugs* 9: 1101–18.

- Tomalá Tomalá, D. F. (2021). Mapeo de restricción del gen *18S-ARNr*: una alternativa rápida en la identificación molecular de *Dunaliella sp* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021).
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Dordrecht: Springer.
- Vázquez, J. E. (2016). Clonación en vectores de expresión de la proteína *histidina cinasa rHskA* de *Azospirillum brasilense Sp 245* (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Vila Spinola, M. (2010). Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas: el irna como mecanismo de silenciamiento génico.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 31(13), 3688–3691.
- Wan, C., Chen, B.-L., Zhao, X.-Q., y Bai, F.-W. (2019). Stress Response of Microalgae and Its Manipulation for Development of Robust Strains. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 95–113. doi:10.1007/978-981-13-2264-8_5
- Yáñez, R. (2011). Categorización taxonómica en base a marcadores moleculares de microalgas extremófilas nativas del Norte de Chile. Chile: FACULTAD DE CIENCIAS; INSTITUTO DE BIOLOGIA.
- Yáñez Amayo, V. O. (2002). Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote.(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).

Yoshida N and Sato M. (2009). Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol*; 791–798.

Zhao, D., Zhou, C., Sheng, Y., Liang, G., & Tao, J. (2011). Molecular cloning and expression of phytoene synthase, lycopene beta-cyclase, and beta-carotene hydroxylase genes in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2), 345-351.

		Transversión	567	A-T
		Transversión	591	A-T
		Transición	597	A-G
		Transición	603	G-A
		Transversión	612	T-G
		Transición	615	A-G
		Transición	616	A-G
		Transversión	617	G-C
		Transición	644	T-C
		Transición	651	C-T
		Transición	654	G-A
		Transición	657	G-A
		Transversión	663	A-C
		Transversión	670	A-C
		Transversión	680	T-A
		Transición	684	T-C
		Transición	691	G-A
		Transversión	693	G-C
		Transición	696	A-G
		Transición	705	A-G
		Transición	714	C-T
		Transversión	735	C-G
		Transición	744	G-A
		Transversión	745	C-A
		Transición	747	G-A
		Transición	750	T-C
		Transición	751	C-T
		Transición	759	T-C
		Transición	771	C-T
		Transición	786	T-C
		Transición	792	G-A
		Transversión	798	A-T
		Transición	804	G-A
		Transversión	813	C-A
		Transición	829	A-G
		Transición	837	C-T
		Transición	839	A-G
		Transición	840	C-T
		Transición	849	T-C
		Transversión	852	A-T
		Transición	853	A-G
		Transición	869	A-G
		Transición	873	C-T
		Transversión	876	C-G
		Transición	882	G-A
		Transversión	885	G-T
		Transversión	888	T-A
		Transición	891	G-A

			Transversión	894	A-C
			Transición	903	C-T
			Transición	912	T-C
			Transición	913	C-T
			Transición	939	A-G
			Transición	945	T-C
			Transición	951	T-C
			Transición	964	C-T
			Transversión	973	C-A
			Transición	981	G-A
			Transición	984	C-T
			Transversión	990	C-G
			Transversión	991	T-A
			Transición	993	C-T
			Transición	1005	A-G
			Transición	1008	A-G
			Transversión	1012	G-T
			Transición	1014	T-C
			Transición	1022	A-G
			Transversión	1027	T-A
			Transición	1029	G-A
			Transición	1032	A-G
			Transversión	1057	G-T
			Transición	1074	G-A
			Transición	1083	T-C
			Transición	1086	G-A
			Transversión	1089	A-C
			Transversión	1092	G-C
			Transición	1119	A-G
			Transición	1124	A-G
			Transición	1140	G-A
			Transición	1161	G-A
			Transversión	1170	T-G
			Transición	1179	A-G
			Delección	1189	G--
			Inserción	1192	--A
			Transición	1210	C-T
			Transversión	1230	A-C
			Transición	1239	T-C
			Transversión	1243	T-G
			Transición	1254	T-C
			Transición	1255	G-A
			Transición	1261	T-C
			Transversión	1285	T-A
			Transversión	1294	A-C
<i>Dunaliella salina</i>	AY601075.1	192	Transversión	243	A-C
			Transición	244	T-C
			Transversión	257	A-T

		Transición	264	A-G
		Transversión	268	C-G
		Transición	269	T-C
		Transversión	270	G-C
		Inserción	283	--G
		Inserción	284	--C
		Inserción	285	--C
		Transición	288	A-G
		Transición	294	A-G
		Transición	297	A-G
		Transversión	298	G-C
		Transversión	300	A-C
		Transversión	304	C-G
		Transversión	306	G-C
		Transversión	313	G-C
		Inserción	316	--G
		Delección	319	G--
		Transversión	327	T-A
		Transversión	329	C-G
		Transversión	330	A-C
		Transversión	338	A-C
		Transición	339	A-G
		Transversión	343	C-A
		Delección	346	T--
		Inserción	349	--C
		Transversión	350	G-C
		Transversión	353	A-C
		Transversión	363	C-G
		Transversión	364	A-T
		Transversión	369	A-C
		Transversión	370	C-G
		Transversión	372	C-G
		Transversión	375	C-G
		Transición	376	A-G
		Transición	378	T-C
		Transición	381	T-C
		Transversión	382	C-A
		Transversión	392	A-C
		Transversión	396	C-A
		Transición	397	A-G
		Delección	402	A--
		Transversión	404	C-G
		Inserción	408	--G
		Transición	409	T-C
		Transición	414	A-G
		Transición	429	A-G
		Transversión	435	G-C
		Transición	446	G-A

		Transversión	447	C-G
		Transversión	471	C-G
		Transición	474	T-C
		Transversión	477	T-G
		Transversión	489	A-C
		Transversión	492	A-C
		Transversión	495	G-C
		Transversión	501	C-A
		Transversión	502	A-C
		Transversión	504	G-C
		Transición	522	T-C
		Transversión	532	C-A
		Transversión	534	C-G
		Transición	540	A-G
		Transición	561	C-T
		Transversión	567	A-C
		Transversión	570	A-C
		Transición	579	G-A
		Transversión	582	T-A
		Transición	591	A-G
		Transversión	595	A-C
		Transición	597	A-G
		Transversión	609	C-G
		Transversión	612	T-A
		Transición	613	G-A
		Transversión	615	A-C
		Transición	616	A-G
		Transición	619	A-G
		Transversión	621	G-C
		Transición	632	A-G
		Transición	636	C-T
		Transición	639	T-C
		Transición	642	T-C
		Transición	654	G-A
		Transversión	660	C-G
		Transición	678	A-G
		Transición	696	A-G
		Transversión	699	C-A
		Transversión	703	A-C
		Transversión	705	A-T
		Transición	714	C-T
		Transversión	726	A-C
		Transversión	735	C-G
		Transición	744	G-A
		Transición	750	T-C
		Transversión	753	C-G
		Transversión	756	C-G
		Transición	762	T-C

			Transición	771	C-T
			Transversión	786	T-G
			Transición	789	G-A
			Transversión	792	G-C
			Transversión	795	C-G
			Transversión	798	A-T
			Transversión	804	G-C
			Transición	814	A-G
			Transversión	819	A-T
			Transversión	822	G-C
			Transversión	828	G-C
			Transición	831	T-C
			Transición	834	T-C
			Transición	849	T-C
			Transversión	852	A-T
			Transversión	853	A-T
			Transversión	855	T-G
			Transversión	864	C-G
			Transversión	868	A-C
			Transición	869	A-G
			Transición	873	C-T
			Transversión	876	C-G
			Transición	879	T-C
			Transición	888	T-C
			Transversión	891	G-C
			Transversión	894	A-C
			Transversión	903	C-G
			Transversión	906	C-A
			Transversión	916	C-A
			Transición	921	T-C
			Transición	924	G-A
			Transición	936	C-T
			Transversión	937	A-C
			Transición	939	A-G
			Transición	942	G-A
			Transversión	945	T-G
			Transición	951	T-C
			Transición	958	T-C
			Transición	964	C-T
			Transversión	975	C-A
			Transversión	976	A-C
			Transición	977	A-G
			Transversión	979	C-G
			Transición	984	C-T
			Transversión	993	C-G
			Transversión	999	G-T
			Transición	1005	A-G
			Transversión	1006	A-C

			Transición	1007	A-G
			Transición	1008	A-G
			Transición	1014	T-C
			Transversión	1026	A-C
			Transición	1029	G-A
			Transversión	1041	G-C
			Transición	1044	T-C
			Transversión	1056	A-C
			Transición	1057	G-A
			Transición	1058	C-T
			Transversión	1077	C-A
			Transversión	1078	A-C
			Transversión	1083	T-G
			Transición	1089	A-G
			Transición	1104	A-G
			Transversión	1107	A-T
			Transversión	1116	G-T
			Transición	1119	A-G
			Transversión	1149	A-T
			Transversión	1158	A-T
			Transversión	1164	G-C
			Transición	1168	C-T
			Transversión	1170	T-G
			Transición	1179	A-G
			Transición	1183	T-C
			Transversión	1185	G-T
			Transición	1203	T-C
			Transición	1227	C-T
			Transición	1230	A-G
			Transición	1233	C-T
			Transición	1237	C-T
			Transición	1239	T-C
			Transversión	1245	C-A
			Transición	1252	T-C
			Transversión	1254	T-G
			Transversión	1257	A-C
			Transversión	1260	G-C
			Transición	1261	T-C
			Transversión	1266	G-C
			Transversión	1267	A-C
			Transición	1276	T-C
			Transversión	1278	C-G
			Transversión	1281	G-T
			Transversión	1285	T-A
			Transición	1288	G-A