

Transformación genética de *Chlorella sorokiniana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of *Chlorella sorokiniana*

Olman Gómez-Espinoza¹, Giovanni Garro-Monge², Johnny Peraza³, Kattia Núñez-Montero⁴, Karla Meneses-Montero⁴, Maritza Guerrero-Barrantes⁶

Fecha de recepción: 31 de marzo de 2017

Fecha de aprobación: 18 de junio de 2017

Gómez-Espinoza, O; Garro-Monge, G; Peraza, J; Núñez-Montero, K; Meneses-Montero, K; Guerrero-Barrantes, M. Transformación genética de *Chlorella sorokiniana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-1. Enero-Marzo 2018. Pág 160-166.

DOI: 10.18845/tm.v31i1.3505

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: oespinoza@itcr.ac.cr
- 2 Biólogo. Máster en Genética. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ggarro@itcr.ac.cr
- 3 Biólogo. Máster en Bioquímica. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jperaza@itcr.ac.cr
- 4 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: knunez@itcr.ac.cr
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kmeneses@itcr.ac.cr
- 6 Bióloga. Máster en Ecología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr



Palabras clave

Acetosiringona; ceftriaxona; microalga; higromicina; pCAMBIA.

Resumen

Las microalgas se han convertido en una plataforma viable para numerosas aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles, vitaminas, carotenoides, enzimas, farmacéuticos y proteínas recombinantes. Dentro de este grupo, *Chlorella sorokiniana* tiene los requerimientos para convertirse en un microorganismo industrial, gracias a su habilidad de soportar considerables fluctuaciones de temperatura, pH y salinidad. En el presente estudio, *C. sorokiniana* fue utilizada para determinar las condiciones óptimas de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se determinó que una densidad bacteriana de $OD_{600} = 1.5$, 3 días de co-cultivo a 24°C en un pH de 5.6, 150 mM de acetosiringona y dos días de recuperación post co-cultivo son las condiciones óptimas para la transformación de *C. sorokiniana*.

Keywords

Acetosyringone; ceftriaxone; hygromycin; microalgae; pCAMBIA.

Abstract

Microalgae have become a viable platform for several biotechnological applications such as the production of biofuel, vitamins, carotenoids, enzymes, pharmaceuticals and recombinant proteins. Within this group, *Chlorella sorokiniana* have the requirements to become an industrial microorganism due to its ability to supports considerable fluctuations in temperature, pH and salinity. In this work, *C. sorokiniana* was used to determine optimum transformation conditions using *Agrobacterium tumefaciens*. It has been determined that bacterial density of $OD_{600} = 1.5$, 3 days of co-cultivation at 24°C in pH 5.6, 150 mM acetosyringone and two days post co-cultivation recovery period are the optimum conditions for *C. sorokiniana* transformation.

Introducción

En los años recientes, las microalgas se han convertido en una plataforma viable para numerosas aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles, vitaminas, carotenoides, enzimas, farmacéuticos y proteínas recombinantes [1]. Su habilidad adaptativa para crecer en fotobiorreactores o estanques abiertos, produciendo altos rendimientos de biomasa utilizable para aplicaciones industriales han llamado la atención del sector de la investigación y desarrollo (I+D) [2, 3].

Para mejorar estas potencialidades, el desarrollo de la ingeniería genética de microalgas ha sido mostrado como la clave para convertir las en microorganismos industriales [4]. Actualmente, se han identificado alrededor de 30000 especies de microalgas, pero solo se ha descrito la transformación genética de poco menos de 20 especies, muchas de ellas sin las características necesarias para ser microorganismos industriales [5].

Aunque las aplicaciones de ingeniería genética para mejorar las características de producción en microalgas se encuentran en las primeras etapas de desarrollo, se han logrado avances significativos en las herramientas de manipulación genética utilizando sistemas de microalgas modelo [6]. Se espera que estas aplicaciones puedan extenderse desde los sistemas modelo hasta microalgas de valor comercial [3].

La transformación genética de microalgas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ofrece varias ventajas incluyendo alta eficiencia, aplicación simple e integración preferencial en regiones transcripcionalmente activas [7, 8]. La transformación genética estable utilizando *A. tumefaciens*

ha sido reportada en pocas microalgas, tan solo 6 especies han sido modificadas mediante esta técnica [5].

La microalga *Chlorella sorokiniana* es una alga verde de agua dulce (*Chlorophyta*), aislada de la región norte de Costa Rica. Se ha encontrado que esta microalga soporta considerables fluctuaciones de temperatura, pH, salinidad y ha sido cultivada de manera estable en fotobiorreactores de 700 L y estanques abiertos tipo raceway de 30000 L, localizados en diferentes regiones de Costa Rica. En consecuencia, se ha visto que cumple con los requisitos para convertirse en un microorganismo industrial [9]. En el presente estudio, se presenta el primer sistema de transformación exitoso mediado por *A. tumefaciens* en la microalga *Chlorella sorokiniana*, identificada como una especie de microalga con potencial para procesos industriales.

Materiales y Métodos

Cepa de microalga y condiciones de cultivo

La microalga costarricense *Chlorella sorokiniana* fue obtenida de la colección de microalgas de Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). El cultivo fue realizado en medio BG-11. El pH fue ajustado a 6,8 y se añadió agar al 1,5 % en caso de necesitar crecimiento celular en medio semi-sólido. Los cultivos fueron mantenidos a 23 ± 1 °C, bajo luz fluorescente blanca constante ($200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) con una agitación orbital media (120 rpm).

Plásmido y cepa bacteriana

El vector binario pCAMBIA 1303 (CAMBIA, Australia) conteniendo el gen *hptII* (higromicina fosfotransferasa) como gen marcador antibiótico, conducido por el promotor CaMV 35S, fue utilizado en este estudio. Para la transformación de *C. sorokiniana* se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, la cual fue mantenida en el medio Luria Broth (LB), suplementado con 50 mg L⁻¹ de rifampicina, estreptomycin, kanamicina y espectinomycin.

Prueba de sensibilidad antibiótica

La sensibilidad de *A. tumefaciens* LBA 4404 ante el antibiótico ceftriaxona fue evaluada mediante la inoculación de 200 μL de cultivo de *Agrobacterium* ($\text{OD}_{600} = 2,0$) en 5 mL de caldo LB suplementado con concentraciones variables de ceftriaxona (0, 50, 100, 200, 500, 600, 700 y 1000 mg L⁻¹). El crecimiento de *A. tumefaciens* en cada concentración fue determinado a OD_{600} después de dos días.

Con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria de higromicina B en la microalga, se sembraron 10^7 células de *C. sorokiniana* sobre medio BG-11 semi-sólido suplementado con diferentes concentraciones de higromicina B (0, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 125 mg L⁻¹). Los cultivos en platos de agar fueron incubados por 2 días en oscuridad a 25°C antes de ser expuestos a la luz, y el número de colonias sobrevivientes fue evaluado después de 8 días.

El efecto del antibiótico ceftriaxona en la viabilidad de *C. sorokiniana* fue también determinado mediante la siembra de 10^7 células en medio BG-11 suplementado con diferentes concentraciones de ceftriaxona (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 mg l⁻¹). Los cultivos fueron incubados por 2 días en oscuridad a 25°C antes de ser expuestos a la luz y el número de colonias sobrevivientes se evaluó después de 8 días.

Procedimiento de transformación

La transformación de *C. sorokiniana* fue realizada mediante un co-cultivo de la microalga con la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404 [7]. La bacteria *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido

pCAMBIA 1303 fue inoculada a partir de un stock criopreservado en 10 mL de medio LB suplementado con los respectivos antibióticos. El cultivo fue crecido durante toda la noche en un agitador orbital a 27 °C y 200 rpm, en oscuridad. Cinco mililitros de ese cultivo fueron utilizados para inocular 45 mL del mismo medio, los cuales fueron crecidos durante toda la noche a 27 °C y 200 rpm.

El cultivo bacteriano fue cosechado mediante centrifugación a 4000 rpm por 5 min y fue lavado una vez con el medio de inducción (BG-11, 150 mM acetosiringona, pH 5,6). Una vez que el pellet bacteriano fue lavado, se resuspendió en el medio de inducción y fue diluido hasta una $OD_{600} = 1,5$. El cultivo bacteriano fue incubado a 25 °C durante 4 horas a 100 rpm para la activar los genes *vir*.

Paralelamente, 10^7 células de *C. sorokiniana* fueron sembradas por extensión sobre placas de agar BG-11 (pH 5,5) 2 días antes de la transformación. Los cultivos fueron incubados a 25 °C, bajo luz fluorescente constante.

El día de la transformación, las placas con el cultivo de microalgas fueron cosechadas con 1 mL del medio de inducción. La suspensión de microalgas fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue descartado. El pellet de microalgas fue resuspendido en 200 μ L de cultivo de *Agrobacterium*. La suspensión fue incubada a 25 °C durante 30 min con agitación media.

Después del tiempo de incubación, 200 μ L de la suspensión fueron sembrados por extensión sobre placas de agar con medio de inducción. El co-cultivo se extendió por 3 días a 24 °C en oscuridad. Al finalizar el periodo de co-cultivo, las células se cosecharon con 5 mL de medio BG-11 suplementado con 700 mg L⁻¹ de ceftriaxona y fueron incubadas en oscuridad a 25 °C y 120 rpm por 2 días con el objetivo de eliminar las células de *Agrobacterium*.

Al término del periodo post co-cultivo, 100 μ L de la suspensión fue sembrada en el medio selectivo que contenía BG-11 (pH 5,5) suplementado con 700 mg L⁻¹ de ceftriaxona y 125 mg L⁻¹ de higromicina B. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 25 °C por 2 días antes de ser expuestos a la luz. El crecimiento microalgal fue analizado después de 15 días.

Análisis de las colonias transformadas mediante PCR

Se aplicó la reacción de PCR para confirmar la transformación de las colonias de *Chlorella*, utilizando los imprimadores específicos para el gen de resistencia a la higromicina; *htp* (HF-5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3'; y HR-5'-GTGTACGTTGCAAGACCTG3').

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 20 μ L que contenían 2 μ L Buffer Dream Taq 10X, 1 μ L dNTPs (2mM), 0,5 μ L de cada imprimador (10 μ M), 0,1 μ L de DreamTaq DNA Polymerase (5U mL⁻¹) y 15,9 μ L de agua libre de nucleasas con una colonia de *Chlorella* como ADN molde en un termociclador (Applied Biosystems® Veriti®). Se utilizó el siguiente perfil térmico para todas las reacciones: 10 min de desnaturalización a 94°C para degradar la pared celular e inactivar las nucleasas, seguido de 36 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con una extensión final por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Resultados y discusión

Se determinó que la concentración más baja de higromicina B que inhibe completamente el crecimiento de 10^7 células de *C. sorokiniana* es de 100 mg L⁻¹ (cuadro 1). La concentración obtenida es cinco veces mayor a la reportada por Jungmoo *et al.* [10] y Cha *et al* [7]; la cual fue de 20 mg L⁻¹ de higromicina para la selección de líneas transgénicas de *Chlorella vulgaris*

en medio BG-11 y medio FCM respectivamente. Sin embargo, Sanitha *et al.* [1] informó que la cepa de *C. sorokiniana* SRM06 fue la única microalga, de entre nueve, que fue resistente a una concentración de higromicina de 25 mg L⁻¹. Estos resultados suponen que *C. sorokiniana* tiene una alta tolerancia a los antibióticos aminoglucósidos como la higromicina, lo cual es respaldado por Yi-yun y Chang-hai [11], quienes señalan que *Chlorella sp.* es relativamente sensible a la higromicina.

Cuadro 1. Sensibilidad de *C. sorokiniana* y *A. tumefaciens* ante la higromicina B y la ceftriaxona.

Cepas usadas en este estudio	Higromicina 0 -90 mg L ⁻¹	Higromicina 100 -125 mg L ⁻¹	Ceftriaxona 0 -600 mg L ⁻¹	Ceftriaxona 600-1000 mg L ⁻¹
<i>C. sorokiniana</i>	Resistente	Sensitivo	Resistente	Resistente
<i>A. tumefaciens</i>	-	-	Resistente	Sensitivo

-Concentración no probada.

El crecimiento de *A. tumefaciens* LBA 4404 fue suprimido a una concentración de ceftriaxona de 700 mg L⁻¹. Proporciones similares de este antibiótico fueron necesitadas por Yarizade *et al.* [12] y Aram *et al.* [13] para inhibir el crecimiento de la misma cepa después de procesos de transformación en tejidos vegetales de tomate, trigo y la lechuga. No existen reportes sobre el uso de la ceftriaxona posterior al co-cultivo de *A. tumefaciens* y microalgas. Nuestro trabajo evidencia por primera vez el uso de este antibiótico como un agente eficaz para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens* LBA 4404 en co-cultivo con microalgas utilizando medio BG-11. Esto representa una mejora para los procesos de transformación de microalgas, demostrando que la ceftriaxona es una alternativa a antibióticos de mayor costo antes reportados como la cefotaxima [7].

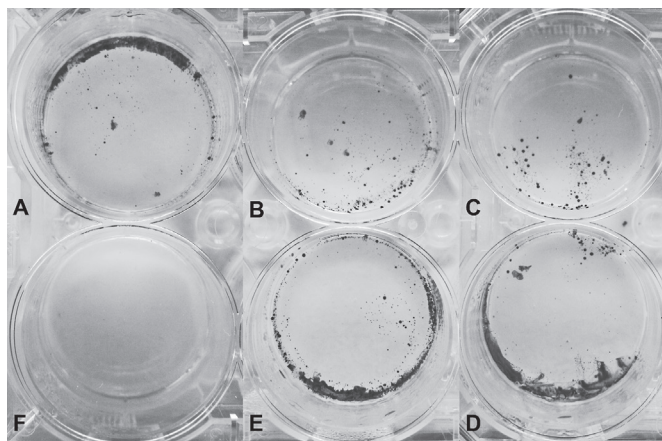


Figura 1. Crecimiento de colonias de *C. sorokiniana* transformadas en medio selectivo. A-D. Microalgas transformadas. F. Control negativo.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las altas concentraciones de ceftriaxona (1000 mg L⁻¹) no afectan ni inhiben el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*. No existen reportes a cerca del efecto de la ceftriaxona sobre la fisiología o crecimiento de las microalgas, sin embargo, no ha demostrado toxicidad en tejidos vegetales [14, 15].

La figura 1 muestra las colonias transgénicas de *C. sorokiniana* obtenidas mediante el proceso de transformación por co-cultivo con *A. tumefaciens*. El presente trabajo reporta el primer evento de transformación de una *C. sorokiniana* nativa utilizando esta técnica. Un factor de

éxito clave en este estudio fue la adición de un tiempo de recuperación post co-cultivo, que resultó ser beneficioso para el proceso de transformación, ya que condujo a un aumento en el crecimiento de colonias resistentes a la higromicina en el medio selectivo.

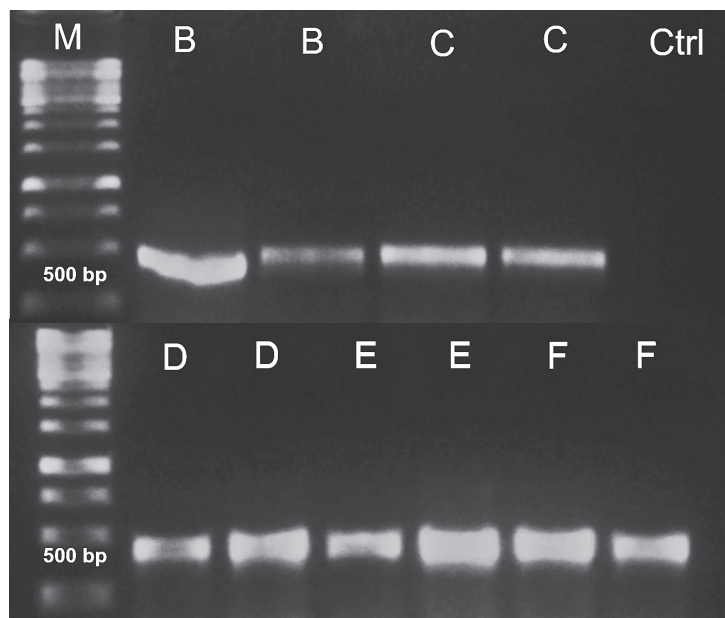


Figura 2. Productos de PCR de colonias de *C. sorokiniana* transformadas. M. GeneRuler 1 kb DNA Ladder. B-F. Colonias transformadas elegidas al azar que muestran el amplicón del gen *hptII* (400 pb). Ctrl. Control negativo.

La microalga *C. sorokiniana* transgénica mostró crecimiento tal como el control positivo sembrado en medio sin higromicina, mientras que el control negativo (microalgas sin exposición a las bacterias) no mostró crecimiento alguno. Otros autores utilizaron un tiempo de recuperación posterior al co-cultivo en la transformación de *Tetraselmis chuii* y *Chlorella vulgaris*, para obtener mayores tasas de transformación [5], [7]. Por lo tanto, añadir un período post co-cultivo (> 2 días) demuestra ser adecuado para recuperar la integridad de las células de microalgas y lograr una eliminación total de bacterias.

Otros factores determinantes como la densidad celular bacteriana, la concentración de microalgas, el pH del medio de inducción, la temperatura del co-cultivo, así como el uso y concentración de acetosiringona no habían sido optimizados para la transformación de *C. sorokiniana*. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que una densidad bacteriana de $OD_{600} = 1.5$, 3 días de co-cultivo a 24°C en medio BG-11 (pH 5.6), 150 mM de acetosiringona y dos días de recuperación post co-cultivo son las condiciones óptimas para la transformación de *C. sorokiniana*.

La figura 2 muestra el resultado de una PCR directa realizada a colonias transgénicas de *C. sorokiniana* con el fin de identificar el gen *hpt*. Los productos de PCR positivos confirman la transformación, debido a que se identifica claramente un fragmento de 400 pb. De esta manera, se confirma molecularmente la integración de los genes del pCAMBIA 1303 en el ADN nuclear de *Chlorella sorokiniana*.

Conclusiones

En la presente investigación, la expresión del gen de resistencia a la higromicina bajo el control del promotor CaMV35S permitió optimizar la transformación genética de la microalga *C. sorokiniana*, lo que mejorará el rendimiento de la transformación y expresión de genes



heterólogos en esta microalga. La transformación estable de las microalgas se encuentra aún en sus primeras etapas de desarrollo y tiene un largo camino por recorrer. Muchas barreras como la inestabilidad de la expresión de los transgénos o el silenciamiento genético deben continuar investigándose con el objetivo de desarrollar una microalga con el potencial de convertirse en un microorganismo industrial.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el apoyo financiero, y al Dr. Andrés Gatica Arias por la donación de la cepa de *A. tumefaciens*.

Referencias

- [1] M. Sanitha, S. Radha, A.A. Fatima, S.G. Devi and M. Ramya, "Agrobacterium-mediated transformation of three freshwater microalgal strains," *Pol J Microbiol*, vol. 63, no. 4, pp. 387-382, 2014.
- [2] M. Sacristán-de Alva, V. Luna-Pabello, E. Cadena-Martínez and A. Alva-Martínez, "Biodiesel production from microalgae and a cyanobacteria grown in different qualities of water," *Agrociencia*, vol. 48, no. 3, pp. 271-284, 2014.
- [3] R. Raja, H. Shanmugam, V. Ganesan and I. Carvalho, "Biomass from Microalgae: An Overview," *Oceanography*, vol. 2, no. 1., 2104.
- [4] F. García-Maroto, P. Úbeda Mínguez, A. Mañas Fernández, T. Chileh and Y. Dautor, "Microalgas para biodiesel: desarrollo de un método de transformación genética para *Scenedesmus almeriensis*, una especie con potencial industrial," *Chronica naturae*, no. 3, pp. 11-18, 2013.
- [5] P. Úbeda-Mínguez, T. Chileh, Y. Dautor, F. García-Maroto and D.L. Alonso, "Tools for microalgal biotechnology: development of an optimized transformation method for an industrially promising microalga—*Tetraselmis chuii*," *J Appl Phycol*, vol. 27, no. 1, pp. 223-232, 2015.
- [6] R. Radakovits, R. E. Jinkerson, Al. Darzins and M. C. Posewitz, "Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production," *Eukaryotic Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 486-501, 2010.
- [7] T. Cha, W. Yee and A. Aziz, "Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 28, no. 4, pp. 1771-1779, 2012.
- [8] P. Pratheesh, M. Vineetha and G. Kurup, "An Efficient Protocol for the *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Mol Biotechnol*, vol. 56, no. 6, pp. 507-515, 2014.
- [9] M. Guerrero-Barrantes, "Desarrollan sistema integrado para la producción de microalgas acoplado a un biodigestor y a un emisor de CO₂," *InvestigaTEC*, vol. 19, pp. 21-22, 2014.
- [10] J. Koo, D. Park and H. Kim, "Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*," *ALGAE*, vol. 28, no. 4, pp. 379-387, 2013.
- [11] W. Yi-yun and W. Chang-hai, "Study of selectable markers in genetic engineering of *Chlorella vulgaris*," *J. Dalian Univ. Tech.*, vol. 4, no. 4, pp. 30-37, 2007.
- [12] A. Farzaneh, A. Yarizade, A. Niazi and G. Younes, "Determine Effective Concentrations of β -lactam Antibiotics Against three Strains of *Agrobacterium tumefaciens* and Phytotoxicity on Tomato and Tobacco," *Intl J Agron Plant Prod.*, vol. 4, no. 11, pp. 2919-2925, 2013.
- [13] A. Yarizade, F. Aram, A. Niazi and Y. Ghasemi, "Evaluation of Effect of β -Lactam Antibiotics on Suppression of Different Strains of *Agrobacterium tumefaciens* and on Wheat Mature Embryo Culture," *IJPR*, vol. 8, no. 4, pp. 267-276, 2012.
- [14] M. Fallah-Ziarani, R. Haddad, G. Garossi and M. Jalali, "Agrobacterium-mediated transformation of cotyledonary leaf of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the GCHI gene," *IJGPB*, vol. 2, no. 2, pp. 47-55, 2013.
- [15] H.Y. Duan, X.S. Ding, J.Y. Song, Y.L. He and Y.Q. Zhou, "Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Achyranthes bidentata* using cotton EREBP gene," *Braz. arch. biol. technol*, vol. 56, no. 3, pp. 349-356, 2013.