



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta*
regulado por el promotor inducible a estrógenos
OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

MARIA MAGDALENA URZUA ABAD

DIRECTORA: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE



Cuernavaca, Morelos

2019

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en colaboración con la Unidad de Transformación Genética y Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) bajo la dirección del M. en C. Carlos Alberto González Chávez y con el Departamento de Biotecnología Vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección del Dr. José Manuel Colmenero Flores.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento otorgado durante los dos años de la maestría.

Al CEIB-UAEM por la estancia otorgada al IRNAS, financiada a través del Programa de Fortalecimiento a la calidad Educativa (PFCE) 2017.

A la Dra. Maria del Rayo Sánchez Carbente por el apoyo durante los dos años de la maestría.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por el apoyo durante estos dos años de la maestría.

Al Dr. José Manuel Colmeneros por el apoyo brindado durante la estancia en su laboratorio.

Al comité tutorial por las observaciones realizadas: Dr. Ramón Suarez, Dra. Verónica Lira, Dr. Ramón Batista y Dra. Lidia González.

A mis compañeros del laboratorio LBMH por la ayuda brindada: Roció, Adriana, Irán, Ricardo, Eya, Liliana, Giovanni, Martin, Laura, Daniel, Marisol.

A mis compañeros de la maestria por hacer más amena mi estancia: Angélica, Luis, Roció, Nicolás, Adriana.

Y en especial quiero agradecer a mi familia por todo su apoyo. A mis padres, en especial a mi madre que siempre ha estado ahí para mí. Mis hermanos y a mi hermana que me aguantan durante estos dos años y a Alex que me ha brindado todo su apoyo y ayuda incondicional.

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iii
RESUMEN	iv
1. Introducción	1
1.1 Biocombustibles	1
a) Bioetanol de primera generación.....	2
b) Bioetanol de segunda generación.....	2
1.2 Composición de la pared celular vegetal	4
a) Celulosa	4
b) Hemicelulosa.....	4
c) Lignina	5
1.3 Enzimas que degradan lignocelulosa.....	5
a) Enzimas que degradan la lignina	6
b) Enzimas que degradan la hemicelulosa	6
c) Enzimas que degradan la celulosa	7
d) Enzimas accesorias.....	7
1.4 Proteínas amorfogénicas.....	8
a) Expansinas	8
a) Swolleninas	10
b) Looseninas	11
1.5 Pretratamiento de la biomasa vegetal.....	11
1.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	14
2. Antecedentes	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general.	18
5.2 Objetivos particulares.	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Material biológico	19
6.2 Elaboración de construcciones	20

6.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> XL1-BLUE y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	20
6.2.2 Clonación del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y PsCR-LOOS1 en el pENTER-D-TOPO	21
6.2.3 Verificación de la clonación de los genes GFP y PsCR-LOOS1 en el pENTER-D-TOPO.....	23
6.2.4 Clonación del gen de GFP o PsCR-LOOS1 en el vector pMDC7 Gateway.....	24
6.3 Transformación genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 por “inmersión floral”	26
6.3.1 Selección de líneas homocigas	27
6.3.2 Extracción de DNA genómico para determinar la inserción del transgen	27
6.4 Estandarización de la concentración de β -estradiol para inducir la expresión de los transgenes.....	28
6.4.1 Extracción de RNA total a partir de plántulas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inducida con β -estradiol.....	29
6.4.2 Síntesis de cDNA.....	30
7. Resultados	32
7.1 Clonación de la Loosenina en el vector pMCD7 Gateway	32
7.2 Clonación del gen de la GFP en el vector pMDC7 Gateway	34
7.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 con el plásmido pMCD7::psCR-LOOS1 y pMDC7::GFP.....	38
7.4 Verificación de la transformación de <i>A. tumefaciens</i> C58 con los plásmidos pMDC7::psCR-LOOS1 o pMDC7::GFP.....	39
7.2 7.5 Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante inmersión floral.....	40
7.6 Verificación de la integración del TDNA del plásmido en el genoma de <i>A. thaliana</i>	
41	
7.7 Estandarización de la concentración de β -estradiol para inducir la expresión de los transgenes.....	43
8. Discusión	46
9. Conclusiones	51
10. Perspectivas	51
11. Anexo	52
12. Bibliografía	54

Índice de figuras

Figura 1. Organización de la lignocelulosa y estructura de la celulosa, hemicelulosa y lignina	3
Figura 2. Modelo propuesto del aflojamiento de la pared celular por expansinas	9
Figura 3. Estructura de las expansinas.....	10
Figura 4. Representación esquemática generalizada de la bioconversión de materiales lignocelulósicos en etanol.	12
Figura 5. Mapa del vector de clonación pENTER-D-TOPO	22
Figura 6.A) Mapa de pENTER-D-TOPO::PsCR-LOOS1.....	23
Figura 7. Mapa del plásmido de expresión pMDC7::gfp.	25
Figura 9. Patrón de restricción enzimática de pENTER-D-TOPO::psCR-LOOS1	33
Figura 10. Patrón de restricción enzimática de pMDC7::psCR-LOOS1	34
Figura 11. Patrón de restricción enzimática de pENTER-D-TOPO::GFP de las clonas seleccionadas 1, 2, 4 y 5.....	35
Figura 12. Patrón de restricción enzimática de pMDC7::GFP, de las clonas 4, 5, 7 y 9....	37
Figura 13. Amplificación de genes mediante PCR en colonia a partir de <i>A. tumefaciens</i> . 38	
Figura 14. Patrón de restricción enzimática de los plásmidos extraídos de <i>E. coli</i> transformada con plásmidos provenientes de <i>A. tumefaciens</i>	40
Figura 15. Determinación de la presencia del transgen.....	42
Figura 16. Inducción de expresión de GFP. Raíz de <i>A. thaliana</i> transformada con el gen gfp; inducida con 250 μ M β -estradiol	43
Figura 17. Raíz de <i>A. thaliana</i> transformada con el gen de gfp, inducida con 100 μ M de β -estradiol.....	44
Figura 18. RNA total de <i>A. thaliana</i> inducida con β -estradiol..	45

Índice de tablas

Tabla 1: Oligonucleótidos.....	19
Tabla 2: Concentraciones utilizadas para la inducción del promotor	29

RESUMEN

El aumento en el uso de combustibles fósiles ha generado situaciones a nivel mundial tales como el agotamiento de sus reservas, un aumento en las emisiones de gases con efecto invernadero, provocando un impacto en el cambio climático lo que genera una preocupación. Es por ello que se buscan alternativas para reemplazarlos como la producción de biocombustibles y uno de ellos es el bioetanol; una fuente de materia prima muy prometedora para su producción es la biomasa lignocelulósica, pero se necesita realizar un pretratamiento para desorganizarla y tener acceso a los azúcares fermentables. Existen diferentes métodos entre ellos están los biológicos los cuales son amigables con el medio ambiente. Se han investigado el uso de proteínas amorfogénicas las cuales desorganizan la celulosa cristalina, una de estas proteínas es la Loosenina la cual se aisló del hongo *Bjerkandera adusta* y se demostró que es una proteína amorfogénica y aumenta la liberación de azúcares reductores en sinergia con las endoglucanasas sin presencia de actividad hidrolítica utilizando celulosa cristalina. En este trabajo se pretende por lo tanto investigar el pretratamiento *in planta* bajo condiciones controladas y utilizando un sistema inducible para llevar a cabo la sacarificación. Para lograr esto, se realizaron dos construcciones utilizando la tecnología Gateway con el vector de expresión pMDC7 el cual presenta un promotor inducible por estrógenos. Como un control tenemos al plásmido pMDC7::*GFP* y como gen de interés pMDC7::*PsCR-LOOS1*, con estas dos construcciones se llevó a cabo la transformación de *Arabidopsis thaliana* Col-0 con el método de inmersión floral mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Posterior a esto se comprobó la presencia del transgen mediante PCR utilizando oligos específicos para cada gen. Una vez obtenida la generación F2 de las plantas se procedió a realizar la estandarización de la concentración a la cual se induce la expresión de los transgenes, se observó que a la concentración de 250 μM y 100 μM se observa fluorescencia en las raíces de plántulas transformadas con el gen de GFP.

1. Introducción

En los últimos años se ha considerado que la biomasa vegetal es una fuente renovable y sustentable de materias primas, por lo que surge como un recurso prometedor para reemplazar a los recursos fósiles que no son renovables y cuyo uso produce contaminación (Capolupo & Faraco, 2016; Jambo *et al.*, 2016; Anwar *et al.*, 2014), además del agotamiento de la existencia del combustible fósil y su creciente demanda (Lee & Lavoie, 2013). El componente principal de la biomasa vegetal es la lignocelulosa la cual se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas, azúcares solubles, almidón y compuestos minerales. Estos componentes varían de acuerdo con el tipo de planta, el estadio de desarrollo, e inclusive con el tipo de tejido (Moraïs *et al.*, 2012).

Las grandes cantidades de desechos forestales, agrícolas y agroindustriales son una fuente de lignocelulosa que representa una fuente potencial para la producción de biocombustibles por la cantidad de celulosa que se puede obtener, además de que no tiene uso alguno (Saladi *et al.*, 2016; Dutta *et al.*, 2014; Carere, 2008). Actualmente, debido a los desafíos técnicos la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica no es rentable por los altos costos de producción y esto se ve reflejado en un aumento del precio del biocombustible (Timilsina, 2014), ya que, el costo de los biocombustibles aún es superior al de los combustibles fósiles (Lennartsson *et al.*, 2014). Es por este motivo que se requieren alternativas que disminuyan el costo de producción, inclusive de aquellos biocombustibles producidos a partir de alimentos como maíz, caña de azúcar, trigo entre otros (Tan *et al.*, 2008). Esto podría lograrse mejorando los pretratamientos para desorganizar la lignocelulosa (Capolupo & Faraco, 2016; Van Eijk *et al.*, 2014).

1.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son aquellos materiales que pueden ser utilizados como fuente de energía y que se obtienen a partir de biomasa, nombre dado a cualquier materia

orgánica de origen reciente que haya derivado de vegetales como resultado de un proceso de conversión fotosintético (Chauvet & González 2008).

En las últimas décadas, los biocombustibles se han propuesto como una fuente alternativa de energía sustentable (Li *et al.*, 2014) para evitar el uso del petróleo; sin embargo, aún existe una alta demanda de este, del que se predice se agotarán en un mediano plazo. Por otro lado, el uso de combustibles fósiles contribuye al calentamiento global por las emisiones de gases con efecto invernadero (Ramos & Duque, 2019; Balat, 2008). En los últimos años, la producción y el uso global de biocombustibles como el bioetanol ha aumentado, siendo Estados Unidos y Brasil los principales países productores (Raman *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015). Existen diferentes tipos de generación de bioetanol, dependiendo de la materia prima que se utilice para producirlos.

a) Bioetanol de primera generación

El bioetanol conocido como de “primera generación” es aquel que se obtiene directamente por la acción de levaduras que fermentan los azúcares derivados del jugo de caña (en Brasil), melaza (en la India) y maíz (en Estados Unidos) (Raman *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015). Esto representa un problema ético, ya que estas materias provienen de cultivos comestibles, lo que conlleva a un encarecimiento de los alimentos, porque se crea un efecto de competencia entre la producción de comida y la de biocombustible. Además, al utilizar una mayor superficie de suelo para la producción de cultivos destinados al bioetanol, se utilizan áreas protegidas que conlleva a una deforestación y por ende atenta contra la biodiversidad presente al eliminar su hábitat (Timilsina, 2014).

b) Bioetanol de segunda generación

Debido al problema ético que representa la producción de biocombustibles de primera generación, en las últimas décadas se ha buscado desarrollar bioetanol de

“segunda generación” a partir del material lignocelulósico como los residuos agroindustriales disponibles como restos de maíz y paja, residuos de procesamiento de madera, desechos de papel, desechos de jardín, etc. (Abo *et al.*, 2019; Peña-Castro *et al.*, 2017; Sigoillot & Faulds, 2016; Furtado *et al.*, 2014; Caquirry *et al.*, 2011). En 2010, en México se produjeron 75.7 millones de toneladas de biomasa seca de 20 cultivos diferentes. Las principales fuentes de residuos de cultivos fueron el rastrojo de sorgo, residuos de maíz (rastrojo y mazorcas de maíz), paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de agave y pulpa de café (Ruiz *et al.*, 2016). Sin embargo, el material de estos desechos es resistente a la degradación y aún se requiere generar tecnologías de bajo costo para eliminar esa resistencia a la degradación de la biomasa lignocelulósica y acceder a los azúcares fermentables y generar un producto competitivo (Tan *et al.*, 2016).

El principal componente de la lignocelulosa que se utiliza para la fermentación y obtención de bioetanol es la celulosa, la cual se encuentra interconectada con la hemicelulosa y ambas embebidas en una matriz de lignina, por lo que su accesibilidad es un problema en la producción de bioetanol (Guo *et al.*, 2017; Raman *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015; Wi *et al.*, 2013). En la figura 1 se pueden observar los tres componentes principales de la lignocelulosa.

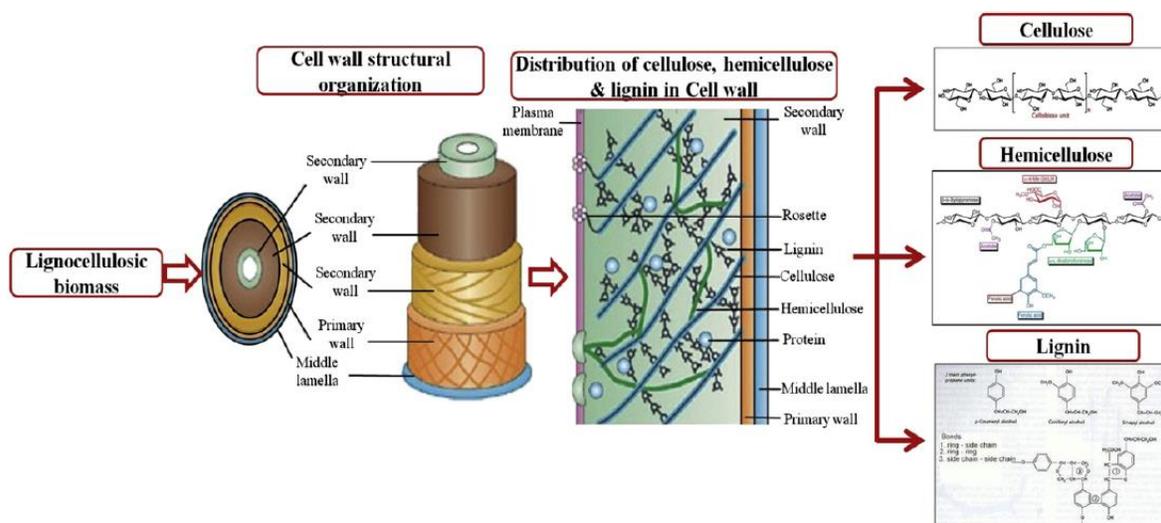


Figura 1. Organización de la lignocelulosa y estructura de la celulosa, hemicelulosa y lignina. Tomado de Menon & Rao, 2012.

1.2 Composición de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal se encuentra formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y el polímero fenólico lignina, este último difícil de degradar (Quiroz & Folch, 2011). Mientras que la celulosa es un componente uniforme en la mayoría de los tipos de biomasa celulósica, la porción y la composición de hemicelulosa y lignina difieren entre especies, incluso variando en un mismo tipo de planta en dependencia del tejido y de su etapa de desarrollo (Jönsson & Martín, 2016; Furtado *et al.*, 2014).

a) Celulosa

La celulosa es la base estructural de las paredes celulares vegetales, es altamente estable e insoluble en agua (Karimi & Taherzadeh, 2016). Es un homopolisacárido compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos, con la celobiosa (dos unidades de glucosa unidas por enlace β -1,4) como unidad repetitiva, la configuración del enlace β -glucosídico facilita que la celulosa forme cadenas largas lineales unidas entre sí. Su grado de polimerización permite generar fibrillas de hasta 15,000 moléculas de glucosa por fibrilla, las fibrillas vecinas interactúan a través de puentes de hidrógeno para formar una macromolécula altamente cristalina y difícil de hidrolizar (Cosgrove, 2005). Existen dentro de estas estructuras cristalinas algunas regiones amorfas, las cuales son susceptibles a hidrólisis (Jönsson & Martín, 2016; Quiroz & Folch, 2011).

b) Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido que a menudo se encuentra ramificado, posee bajo grado de polimerización y es fácil de hidrolizar. Se encuentra formado por pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), y ácidos (4-O-metilglucurónico, D-galacturónico, D-glucurónico) unidos mediante enlaces β -1,4 y ocasionalmente β -1,3 (Smith & Belton, 2012). La hidrólisis de la

hemicelulosa libera pentosas, hexosas y ácidos urónicos. La hidrólisis de grupos acetilo da como resultado ácido acético, y también de la liberación de ácidos ferúlicos (Sindhu *et al.*, 2016). La función de la hemicelulosa es que actúa como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, dando mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina (Kim, 2018; Jönsson & Martín, 2016; Quiroz & Folch, 2011; Keegstra, 2010).

c) Lignina

La lignina es un polímero complejo compuesto de alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano. La lignina de la madera suave está compuesta principalmente por alcohol coniferílico, mientras que la lignina de madera dura está compuesta principalmente por alcohol coumarílico y alcohol sinapílico. Las unidades fenilpropanoides están unidas a través de una red compleja de enlaces éter y enlaces carbono-carbono. La lignina une los componentes de la pared celular, dando a la biomasa lignocelulósica su integridad estructural; es el componente más difícil de degradar del material lignocelulósico, limitando su uso y la hidrólisis de los polisacáridos que envuelve (Bomble *et al.*, 2017; Jönsson & Martín, 2016; Ivacov & Persson, 2012; Quiroz & Folch, 2011).

1.3 Enzimas que degradan lignocelulosa

La cristalinidad de la celulosa, la hidrofobicidad de la lignina y la encapsulación de la celulosa por la lignina-hemicelulosa son factores que contribuyen a la resistencia a la degradación observada en la lignocelulosa (Moraïs *et al.*, 2012). A pesar de ello, hay microorganismos que degradan la lignocelulosa y cuentan con enzimas especializadas que reciben el nombre genérico de enzimas lignocelulolíticas (Duwe *et al.*, 2017). Estas tienen un enorme potencial para usarse en la producción de biocombustibles y otros productos de valor agregado.

a) Enzimas que degradan la lignina

Los hongos, principalmente los de la pudrición blanca, producen enzimas oxidativas extracelulares para atacar y degradar a la lignina ya sea individualmente o como un consorcio (Gupta *et al.*, 2016), a estas se les denominan enzimas ligninolíticas. Entre estas se encuentran las fenol oxidasas (lacasas) y las peroxidasas.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son oxidasas multi-cobre, capaces de oxidar compuestos orgánicos utilizando un grupo de cuatro iones de cobre. A diferencia de la mayoría de óxido-reductasas las lacasas no requieren la adición de cofactores y sí requieren peróxido de hidrógeno. Por otro lado, las peroxidasas, comprenden a las lignino peroxidasas (EC1.11.1.14), a las manganeso peroxidasas (E.C. 1.11.1.13) y las peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16), todas ellas dependen del peróxido de hidrógeno para oxidar a la lignina (Gonzalo *et al.*, 2016; Pollegioni *et al.*, 2015; Dashtban *et al.*, 2010; Cuervo *et al.*, 2009).

b) Enzimas que degradan la hemicelulosa

Existen varias enzimas que hidrolizan a la hemicelulosa según el tipo de hemicelulosa presente en la planta. El nombre de la hemicelulosa está dado por el azúcar que compone la cadena principal. Por ejemplo, las xiloglucanasas (entre las que se encuentran las β -1,4-endoglucanasas y β -1,4-glucosidasas) actúan sobre los xiloglucanos compuestos de xilasas y glucosas; β -1,4-xilanasas hidrolizan al xilano compuesto de xilasas; las β -1,4-endomananasas y las β -1,4-manosidasas, hidrolizan por tanto a los mananos (polímero de manosas); mientras que las arabinofuronidasas intervienen en la remoción de residuos α -arabinofuranosilo no reductores de varios homopolisacáridos (arabinanos) y heteropolisacáridos (arabinogalactanos, arabinoxilanos, arabinoxiloglucanos, glucuronoarabinoxilanos, etc.) (Saini *et al.*, 2015; Cuervo *et al.*, 2009).

c) Enzimas que degradan la celulosa

La celulosa se degrada a glucosa por la acción sinérgica de un grupo de enzimas conocidas como celulasas, las que comprenden a las endoglucanasas, las exoglucanasas y las β -glucosidasas (Tan *et al.*, 2016).

Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas) cortan azarosamente en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, esto disminuye el largo de las cadenas e incrementa el número de los azúcares reductores.

Las exoglucanasas (EC 3.2.1.74; 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas y EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasas) actúan sobre el extremo reductor y el no reductor de las cadenas de celulosa y libera glucosa o celobiosa.

Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa. Finalmente la glucosa liberada puede fermentarse para producir etanol (Saini *et al.*, 2015; Cuervo *et al.*, 2009).

d) Enzimas accesorias

Existen enzimas accesorias a las lignocelulolíticas que aumentan la degradación de la lignocelulosa. Entre estas se encuentran un gran número de esterasas, las cuales catalizan el rompimiento de los enlaces éster de grupos asociados a las cadenas de la hemicelulosa como los grupos acetilo y ferúlico (Sindhu *et al.*, 2016).

Además se incluyen a las oxidasas que generan al peróxido de hidrógeno, que es utilizado por las peroxidasas y las deshidrogenasas para reducir los compuestos derivados de la lignina. Entre estas se encuentran la aril-alcohol-oxidasa, la glioxal oxidasa y la aril-alcohol deshidrogenasa. La celobiosa deshidrogenasa, que producen diferentes hongos cuando se encuentran creciendo en celulosa, también se encuentra involucrada en la degradación de la lignocelulosa en presencia de peróxido de hidrógeno (Dashtban *et al.*, 2010).

Otro tipo de proteínas accesorias son las proteínas amorfogénicas, las cuales no tienen actividad enzimática pero pueden aflojar las paredes celulares al romper las interacciones débiles que estabilizan a las fibras de celulosa para formar fibrillas y así como con la hemicelulosa y la lignina, entre las que se encuentran las expansinas, swolleninas y loosenas (Duwe *et al.*, 2017).

1.4 Proteínas amorfogénicas

a) Expansinas

Las expansinas se identificaron como proteínas de la pared celular vegetal que promueven la elongación de tejidos *in vitro* (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Distintas investigaciones han mostrado que las expansinas están involucradas en muchos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas debido a que aflojan la pared celular (Goh *et al.*, 2012). La función de las expansinas requiere de un pH ácido y no tienen actividad hidrolítica (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Sampedro y Cosgrove (2005), postularon un modelo no enzimático donde las expansinas debilitan los enlaces no covalentes entre los polímeros de la matriz de la pared celular para promover el deslizamiento de las microfibrillas de celulosa, lo que induce la relajación de la pared y permite el crecimiento celular (Figura 2).

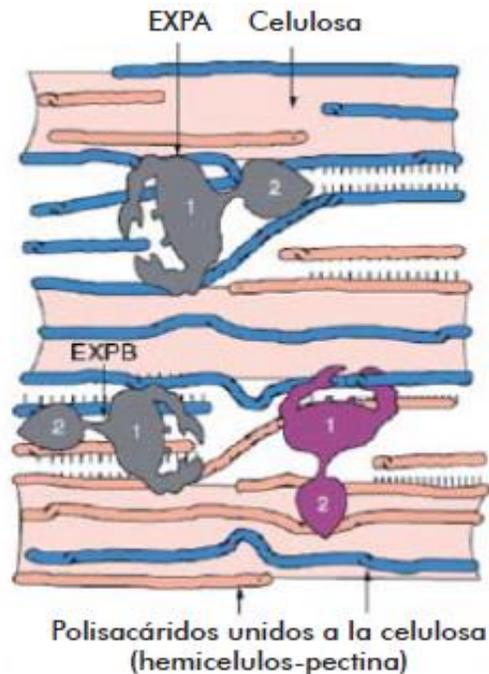


Figura 2. Modelo propuesto del aflojamiento de la pared celular por expansinas. Las expansinas rompen los puentes de hidrógeno que unen entre sí las microfibrillas de celulosa. Las expansinas están compuestas de un péptido señal y los dominios 1 y 2. Es una familia multigénica de cuatro grupos: EXPA (α -expansinas), EXPB (β -expansinas), EXLA (expansinas tipo A) y EXLB (expansinas tipo B). Tomada de Sampedro y Cosgrove, 2005.

Las expansinas de las plantas constituyen una superfamilia conformada por cuatro familias: EXPA (α -expansinas) identificadas como mediadoras de aflojamiento de la pared celular inducido por ácido; EXPB (β -expansinas) estas incluyen un subconjunto de proteínas conocidas como Grupo 1 de alérgenos de polen; EXLA (expansinas tipo A) y EXLB (expansinas tipo B).

Las expansinas EXLB, de acuerdo a análisis filogenéticos constituyen un grupo separado de EXPA y EXPB y sus funciones biológicas son inciertas (Sampedro & Cosgrove, 2005). Existen expansinas en otros organismos como hongos, bacterias y nematodos las cuales se denominaron EXLX (por sus siglas en inglés: expansin-like) ya que presentan homología distante a los dominios 1 y 2 de las expansinas de plantas.

Las expansinas son una familia de genes que codifica para proteínas con aproximadamente 225-300 aminoácidos (Georgelis *et al.*, 2015). Estas tienen dos

dominios y comparten varios motivos conservados (Sampedro & Cosgrove, 2005). El dominio 1 localizado en el extremo amino terminal, tiene una estructura de doble-psi-beta-barril de seis hebras (DPBB), similar a la familia 45 de las glucósido hidrolasas (GH45). El dominio DPBB forma un surco para la unión al sustrato. El dominio 2, localizado en el extremo carboxilo terminal, es homólogo distante de los alérgenos del polen de pastos del grupo 2; tiene un plegamiento de β -sandwich semejante al de los módulos de unión a carbohidratos, el cual está clasificado como el módulo de unión de carbohidratos de la familia 63 (CBM63). Abarcando a ambos dominios se encuentra un surco poco profundo, adecuada para la unión de polisacáridos (Cosgrove, 2015).

Se han identificado otras proteínas con actividad de expansina, las cuales han sido denominadas swolleninas y looseninas (Figura 3).



Figura 3. Estructura de las expansinas. Las expansinas presentan dominio I y dominio II en su estructura. Otras proteínas amorfogénicas como la loosenina solo presenta dominio I con su péptido señal y swolleninas que presentan el dominio II con un módulo de unión a carbohidratos. Tomada de Sampedro y Cosgrove, 2005.

Las swolleninas (SWO) se han identificado en hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Aspergillus* y podrían favorecer la degradación de la celulosa al generar regiones amorfas dentro de la estructura cristalina. Las swolleninas presentan un dominio C-terminal homólogo al dominio 2 de las expansinas de plantas (dominio de alérgeno al polen), y a diferencia de las expansinas vegetales, tienen un CBM en el extremo N-terminal (Cosgrove, 2015). En el reporte de Saloheimo y cols. (2002) describen una swollenina (SWO1) aislada de *Trichoderma reesei*, la cual modifica la estructura de la celulosa de las fibras de

algodón sin producción detectable de azúcares reductores (Saloheimo *et al.*, 2002), lo que sugería su función amorfogénica no hidrolítica.

b) Looseninas

Quiroz y cols. (2011) clonaron la secuencia codificante de LOOS1 de una biblioteca de cDNA del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta*. Esta secuencia codifica para una proteína llamada loosenina (LOOS1), la cual presenta homología al dominio DPBB de las expansinas de plantas y además presenta actividad amorfogénica sobre la celulosa (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha descrito la expresión de 12 proteínas tipo Looseninas (LOOLs) en el hongo *Phanerochaete carnosa* donde un análisis filogenético reveló la presencia de secuencias que presentan homología con la Loosenina de *B. adusta* y cuyo papel podría ser el de permitir la degradación del material lignocelulósico (Suzuki *et al.*, 2014). Sin embargo, se requiere de estudios posteriores que evalúen su posible aplicación para la desorganización de la lignocelulosa.

Se ha propuesto a la actividad de las proteínas amorfogénicas en el aflojamiento de las fibras de celulosa como un pretratamiento, ya que esto facilitaría la degradación de la biomasa celulósica para la producción de biocombustibles, debido a que permitiría la desorganización de la lignocelulosa y por ende la hidrólisis enzimática.

1.5 Pretratamiento de la biomasa vegetal

El esquema general para la conversión de lignocelulosa en biocombustible implica las siguientes etapas (Mossier *et al.*, 2005):

1. El pretratamiento, permite desensamblar las paredes celulares vegetales en sus componentes, mejorando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa; donde se debe seleccionar el método más adecuado para evitar la formación de compuestos inhibidores de las etapas subsiguientes y de la pérdida de azúcares (Robak & Balcerek, 2018; Anwar *et al.*, 2014; Jonsson, 2013).

2. La hidrólisis enzimática, en la que se requiere el uso de celulasas y ocasionalmente de hemicelulasas.
3. Fermentación de los monosacáridos derivados de la hidrólisis enzimática, utilizando levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Separación de residuos y finalmente purificación de los productos (Capolupo & Faraco 2016; Asgher *et al.*, 2014). Esto se puede ver ilustrado en la Figura 4.

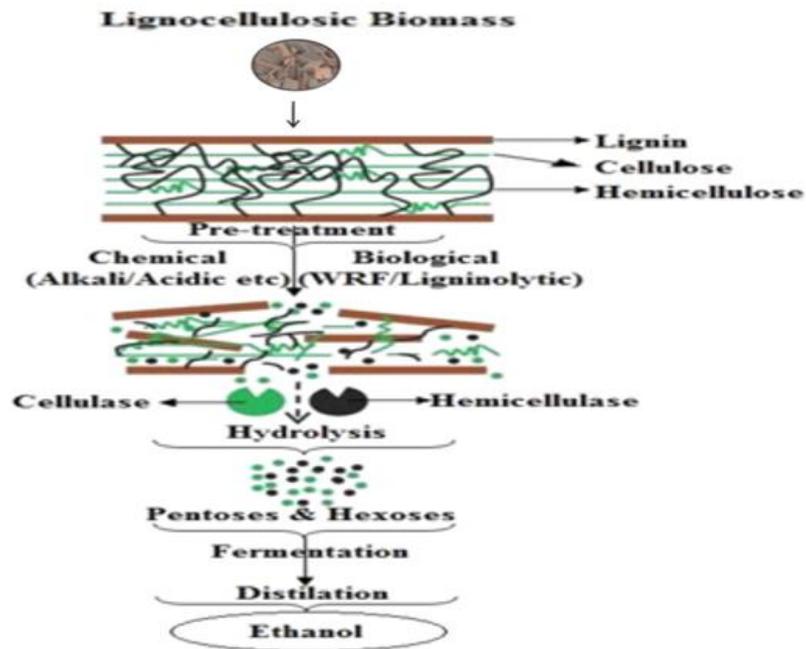


Figura 4. Representación esquemática generalizada de la bioconversión de materiales lignocelulósicos en etanol. Modificado de Asgher *et al.*, 2014.

El principal reto en la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica es su pretratamiento. Durante el pretratamiento, la unión de la lignina con la hemicelulosa debe romperse para posteriormente reducir la cristalización de la celulosa y aumentar la fracción de celulosa amorfa, la forma más accesible al ataque enzimático. Para el pretratamiento de la lignocelulosa se utilizan estrategias físicas, físico-químicas, químicas y biológicas (Kim, 2018; Capolupo & Faraco, 2016; Sun *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2015). A continuación se describen brevemente:

- I) Pretratamientos físicos: la biomasa lignocelulósica puede ser pulverizada por astillado, molienda y triturado lo que reduce el tamaño de la partícula y aumenta el área superficial, facilitando el acceso de las celulasas a la superficie. Otros métodos incluyen pirólisis, radiación gamma, microondas, infrarrojo o sonicación (Capolupo & Faraco, 2016; Saini *et al.*, 2015; Saritha *et al.*, 2012).
- II) Pretratamiento físico-químicos: son considerablemente más efectivos que los métodos físicos. Se incluyen varios métodos como explosión de la fibra de amoníaco, explosión de vapor (autohidrólisis), y explosión de vapor de SO₂ entre otros (Rabemanolontsoa & Saka, 2016; Saini *et al.*, 2015; Saritha *et al.*, 2012).
- III) Pretratamientos químicos: se incluyen varios métodos de pretratamiento con álcalis, pretratamiento con ácidos o con organosolventes (Saritha *et al.*, 2012).
- IV) Pretratamientos biológicos: los procesos biológicos de pretratamiento incluyen el uso de microorganismos o de sus productos para disminuir la recalcitrancia de la lignocelulosa, siendo una estrategia amigable para el ambiente. Entre los organismos utilizados se encuentran los hongos y las bacterias. El pretratamiento biológico es una alternativa prometedora, porque no se consumen grandes cantidades de energía, es amigable con el ambiente puesto que no se liberan residuos tóxicos, no hay que reciclarlos y se produce una baja formación de inhibidores (Guo *et al.*, 2017; Sindhu *et al.*, 2016; Sarita *et al.*, 2012).

Una propuesta poco explorada, es que el costo de conversión de biomasa lignocelulósica a biocombustible se podría reducir mediante la expresión de genes clave que codifiquen para proteínas que permitan el auto-pretratamiento de la planta. La expresión directa en la planta puede actuar alterando la composición de las paredes celulares durante la cosecha y/o durante el procesamiento de la biomasa, esto requiere una compartimentación cuidadosa a una ubicación

subcelular específica, o bien la activación o la inducción de expresión tardía en el desarrollo de la planta o inclusive post-cosecha (Furtado *et al.*, 2014).

Baker y cols. (2000), utilizaron β -expansina-D como aditivo en la sacarificación de la biomasa, en donde usaron como sustrato aserrín amarillo de álamo pretratado con ácido diluido y evaluaron el rendimiento de la sacarificación enzimática por la digestión de una mezcla de celulasas de *Trichoderma reesei*, en sinergia con expansina. Demostraron que la expansina parece mejorar la tasa de sacarificación en un rango de 55-80%.

Yoon y cols. (2010), realizaron la expresión del gen de la expansina de pepino (Cs-EXPA1) en granos de maíz para desensamblar a la celulosa. La expansina de maíz recombinante mostró actividad mediante un ensayo de expansina de alto rendimiento al llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa mediante la adición de celulasa fúngica comercial y extracto crudo de grano de maíz transgénico para luego determinar la glucosa liberada. En el maíz pretratado y tallos de tabaco, el incremento fue aproximadamente de 2.5 veces usando semilla de maíz recombinante. Además no hubo efectos negativos sobre el crecimiento del maíz y la generación de semillas.

1.6 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Dentro de los organismos modelo de planta más utilizados se encuentra *Arabidopsis thaliana*, esta crece en una amplia variedad de climas, tiene un ciclo de vida relativamente corto (seis a ocho semanas), su tamaño es pequeño (cerca de 30 cm) y produce un gran número de semillas (Meinke *et al.*, 1998). Su genoma es de 125 Mb, está totalmente secuenciado y se encuentra disponible (Arabidopsis Genoma Initiative, 2000). Además, los métodos de manipulación genética han sido ampliamente desarrollados en esta planta; por ejemplo, el uso de su transformación utilizando *Agrobacterium tumefaciens* para insertar genes propios o de otros organismos (Boron *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006; Ziemienowicz, 2014). Por lo que

el uso de este modelo, sería útil para iniciar con la exploración de pretratamientos biológicos para optimizar la obtención de bioetanol de segunda generación.

2. Antecedentes

En el laboratorio de Biología Molecular de Hongos se aisló y caracterizó a partir del hongo *Bjerkandera adusta* una proteína denominada Loosenina que contiene el dominio 1 DPBB de las expansinas de plantas y que presenta actividad amorfogénica en fibras de algodón. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró que presenta los residuos de aminoácidos T31 y D105 equivalentes a los residuos T12 y D82 en EXLX1, y se sabe que estos residuos de aminoácidos forman un enlace de hidrógeno conservado entre el grupo OH de la Thr y el grupo carboxilo del Asp. A través de ensayos de liberación de azúcares reductores, usando fibras de *Agave tequilana* como sustrato, se determinó que había una sinergia entre esta proteína y las celulasas; donde se liberaban hasta 7.5 veces más azúcares en comparación con el tratamiento sólo con celulasas. Estos ensayos se realizaron con la Loosenina purificada a partir de su expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, esta estrategia de expresión no fue eficiente ya que los rendimientos de purificación de la proteína eran bajos (150 µg de proteína por litro de cultivo) (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011). Por lo anterior, Tapia en el 2014 expresó al gen de la Loosenina de *B. adusta* en *A. thaliana* utilizando un promotor inducible por estrés (promotor RD29A; el cual responde a: sequía, bajas temperaturas, altas concentraciones de sales, etc.), con el objetivo de hacer un pretratamiento de la planta induciendo la expresión de la Loosenina cuando la biomasa se sometiera a secado. Sin embargo, los experimentos mostraron que hubo un efecto negativo de la Loosenina en las plantas ya que en cada generación, la viabilidad de las semillas disminuía. Las observaciones en el microscopio de las semillas sobre-expresantes de la Loosenina respecto a las silvestres era de semillas defectuosas: aspecto rugoso, tricomas desarreglados o ausentes, variación en el tamaño, cambio en la coloración y emisión de la radícula adelantada que indicaba una germinación precoz. El estudio concluyó que aunque el promotor fue eficiente en inducir la

expresión de la Loosenina, la expresión no controlada de LOOS1 tuvo un efecto negativo en la planta. Sin embargo, se requiere explorar otros a promotores inducibles que puedan ser controlados de acuerdo al requerimiento experimental. Por lo que la pregunta de si se puede expresar la Loosenina para que desorganice la pared celular y que se lleve a cabo un auto-pretratamiento en las plantas para posteriormente ser tratadas con enzimas hidrolíticas y permitir el acceso a las moléculas de glucosa contenidas en la celulosa, aún sigue abierta. Recientemente Santos y cols. (2017) expresaron una swollenina (Thsw) de *Thichoderma harzianum* en *Escherichia coli* y demostraron que la proteína presentaba actividad amorfogénica sobre las fibras de celulosa cristalina (Avicel) y que había un efecto sinérgico con las xilanasas, lo que aumentó la liberación de azúcares reductores. Estos resultados sugieren que el uso de proteínas amorfogénicas, tales como la Loosenina, podrían ser una alternativa viable para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

3. Justificación

La lignocelulosa es el polímero más abundante de la biomasa vegetal, de la cual se pueden obtener azúcares para la producción de biocombustibles de segunda generación. Sin embargo, debido a la resistencia a la degradación que presenta la lignocelulosa se requiere de pretratamientos para obtener azúcares fermentables. Los métodos biológicos de pre-tratamiento presentan ventajas respecto a otros métodos, porque son amigables con el ambiente. En los últimos años se ha considerado que las proteínas amorfogénicas (expansinas, swolleninas y looseninas) podrían utilizarse para disminuir la cristalinidad. En la mayoría de los estudios, los pretratamientos se han realizado con proteínas amorfogénicas purificadas. En nuestro laboratorio se demostró que la Loosenina de *Bjerkandera adusta* actúa de manera sinérgica con celulasas para desorganizar la celulosa cristalina y liberar azúcares reductores. Una alternativa más eficiente sería el pretratamiento *in situ* de la planta, mediante la expresión de una proteína amorfogénica controlada por un promotor inducible. Para lograrlo, en este proyecto se propuso expresar a la Loosenina1 de *B. adusta* en *Arabidopsis thaliana* usando el promotor inducible por estrógenos OlexA-46, con el fin de auto-pretratar la lignocelulosa de la planta en el momento en el que se añadan estrógenos sin afectar el crecimiento.

4. Hipótesis

La expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado bajo el promotor inducible por estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana* favorecerá la sacarificación de la biomasa.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general.

Generar plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresen al gen de la Loosenina de *Bjerkandera adusta* bajo un promotor inducible por estrógenos.

5.2 Objetivos particulares.

- 1.- Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* con el TDNA de los plásmidos pMDC7::PsCR-*LOOS1* y pMDC7::GFP mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
- 2.- Obtener líneas transgénicas homocigas para PsCR-*LOOS1* y *GFP* en *Arabidopsis thaliana*.
- 3.- Determinar la concentración a la cual se induce la expresión de la construcción control GFP.

6. Materiales y métodos

6.1 Material biológico

Cepa de *Escherichia coli* XL1-BLUE: se utiliza para el mantenimiento, propagación y amplificación de los plásmidos de interés.

Cepa de *Escherichia coli* ONE SHOT TOP10: se utiliza para el mantenimiento y propagación después de la reacción de clonación del vector pENTER-D-TOPO con el gen de interés (gen gfp o gen psCr-loos1) y para el mantenimiento y propagación después de la reacción de recombinación del pENTER-D-TOPO con el vector pMDC7.

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58: utilizada para la transformación de *Arabidopsis thaliana* Col-0, con las construcciones de interés. Presenta resistencia a rifampicina.

A. thaliana Col-0: modelo de investigación utilizado para la expresión de los genes de interés. Debido a que la eficiencia de transformación es alta.

Tabla 1: Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Condiciones para el PCR	Mezcla de PCR (20 µl)
GFP-Fw- CACC GFP-Rv	5' <u>CACCATGGCTAGCAAAGGAGAAGA</u>ACT3' 5' TTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATG3' Amplifican el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) de reconocimiento directo y reverso. Subrayado: secuencia CACC para facilitar la clonación en el pENTER	94 °C 5 min-1 ciclo; 94 °C 45 s; 65 °C 45 s; 72 °C 2 min-30 ciclos; 72 °C-10 min; 4 °C ∞. Pfu polimerasa y Taq polimerasa de Thermo scientific	DNA: 20 ng dNTPs: 2 mM Oligo Fw: 10 pmoles/µl Oligo Rv: 10 pmoles/µl Buffer 1X MgCl ₂ : 2mM
Loos-Fw- CACC Loos-Rv	5' <u>CACCATGGCTACTCAACGAAGG</u>3' 5' CTAATCCAGGGTCCAGGTGATC3' Amplifican el cDNA de la Lloosenina con el péptido señal de la calreticulina, de reconocimiento directo e inverso. Subrayado: secuencia CACC para facilitar la clonación en el pENTER	94 °C 5 min-1 ciclo; 94 °C 45 s; 58 °C 45 s; 72 °C 1min-30 ciclos; 72 °C-10 min; 4 °C ∞. Pfu polimerasa de Thermo scientific.	
M13-Fw	5'GTAAAACGACGGCCAGT3'	94 °C, 5 min-1 ciclo;	

M13-Rv	5'CAGGAAACAGCTATGAC3' Amplifican a partir del plásmido pENTER, se encuentra flanqueando la secuencia att. De reconocimiento directo y reverso. Usados para secuenciar el producto de clonación.	94 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C, 1.30 min - 25 ciclos; 72 °C-10 min; 4 °C-∞. Taq polimerasa de Thermo scientific.
GAPDHF w GADPHR v	5'GCCGGGACTGGATTGTTTGCTGAG3' 5'TTCGCCAGTTCATCACCGCGTA3' Amplifican el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de <i>Arabidopsis</i> .	95 °C, 5 min-1 ciclo; 95 °C, 45 s, 60 °, 45 s, 72 °C 30 s- 30 ciclos; 72 °C 5 min- 1 ciclo. 4 °C-∞. Taq polimerasa de Thermo scientific.

6.2 Elaboración de construcciones

6.2.1 Transformación de *E. coli* XL1-BLUE y *Agrobacterium tumefaciens* C58

Con la finalidad de tener un control de transformación se decidió clonar al gen de GFP en el vector de expresión pMDC7. Para tal objetivo se utilizó al plásmido pGLO (BioRad), el cual en su secuencia contenía al gen de GFP.

Las células de *E. coli* XL1-BLUE se transformaron con el plásmido pGLO (20ng) por electroporación a 1800 V, posterior a esto se adicionó 1 ml de medio LB y las células fueron incubadas a 37 °C por 45 min a 200 rpm, se seleccionaron en medio LB sólido con ampicilina (100 µg/ml). Después de 24 h de incubación a 37 °C se tomó una colonia y se creció un inculo de 4 ml en medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C por 16 h a 200 rpm. Estos cultivos se utilizaron para hacer la extracción del plásmido con el kit GeneJET Plasmid miniprep de Thermo scientific.

Células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58 se transformaron con los plásmidos pMCD7::PsCR-LOOS1 o pMDC7::GFP (100 µg) por electroporación a 1800 V, seleccionando en medio LB sólido con espectinomicina (100 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml). Después de 48 h a 28 °C se seleccionaron colonias de cada evento de transformación y fueron nuevamente crecidas en medio

LB sólido con espectinomicina (100 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml) a 28 °C por 48 h, con la finalidad de tener colonias aisladas. De estas colonias aisladas para cada evento de transformación, se hicieron PCRs en colonia para verificar que las células de *A. tumefaciens* si se habían transformado y portaban el plásmido de interés, para eso se utilizaron oligos específicos, para el gen PsCR-LOOS1 Loos-Fw-CACC y Loos-Rv y para el gen de GFP GFP-Fw-CACC y GFP-Rv (ver Tabla 1).

Para asegurar que la transformación de *A. tumefaciens* con los plásmidos pMDC7::PsCR-LOOS1 o pMDC7::GFP había sido exitosa y que tenían la construcción adecuada, se decidió hacer la extracción de los plásmidos de *A. tumefaciens* con el kit de miniprep de Thermo scientific, como los rendimientos no fueron los esperados (5 ng/µl), con estos plásmidos se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* XL1-BLUE como se mencionó anteriormente y se hizo la extracción de los plásmidos provenientes de estos eventos de transformación con el kit de miniprep de Thermo scientific. Ya con estos plásmidos se hizo el análisis por restricción enzimática. Para pMDC7::PsCR-LOOS1 se utilizó SmaI (Thermo scientific) y para pMDC7::GFP se hizo una digestión con XhoI y una con SmaI. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio a 100 V por 40 min. El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.2.2 Clonación del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y PsCR-LOOS1 en el pENTER-D-TOPO

Se realizó una amplificación por PCR de la secuencia codificante de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) que se encuentra clonada en el plásmido pGLO (BioRad) y para la secuencia de PsCR-LOOS1 que codifica para la Loosenina de *Bjerkandera adusta* fusionada en el N-terminal al péptido señal de la calreticulina de *Nicotiana glauca*, que se encuentra clonada en el plásmido pJET, utilizando los oligonucleótidos específicos GFP-Fw-CACC, GFP-Rv y Loos-Fw-CACC y Loos-Rv respectivamente con las condiciones mencionadas (ver Tabla 1), en el que al oligo forward se le añadió la secuencia CACC en el extremo 5'. El producto de PCR se purificó utilizando el kit GeneJET PCR Thermo scientific como lo marca el

fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de clonación con el vector de entrada (kit pENTR Directional TOPO Cloning de ThermoFisherScientific K2400-20) (ver Figura 5) siguiendo las instrucciones del proveedor y como se describe brevemente. La mezcla de reacción contenía lo siguiente. Producto de PCR purificado (10 ng/μl), solución salina (1.2 mM), vector pENTER (20 ng/ μl), agua y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Células quimiocompetentes de *E. coli* ONE SHOT TOP10, se transformaron por choque térmico con la mezcla de reacción y se seleccionó en medio LB sólido con kanamicina (50 μg/ml). Después de 24 h de incubación a 37 °C se tomaron colonias de cada evento de transformación y se hicieron cultivos en medio LB líquido con kanamicina (50 μg/ml) y se incubó a 37 °C por 16 h. De estos cultivos se hizo la extracción del plásmido utilizando el kit GeneJET Plasmid miniprep de Thermo scientific. Para verificar su integridad se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, a 100 V por 40 min. El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

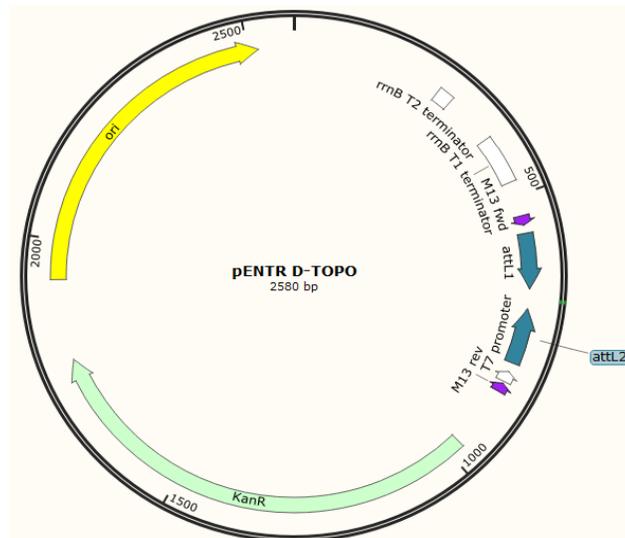


Figura 5. Mapa del vector de clonación pENTER-D-TOPO. Las secuencias attL flaquean al gen de interés, además presenta un gen de resistencia a kanamicina.

6.2.3 Verificación de la clonación de los genes GFP y PsCR-LOOS1 en el pENTER-D-TOPO

Con la finalidad de verificar que los genes PsCR-LOOS1 y GFP se habían clonado correctamente en el pENTER, hicimos un análisis de restricción enzimática (Figura 6). Para el caso de GFP se hizo una reacción de digestión con la enzima *PvuII* y una reacción con *HindIII*, (Thermo scientific) y para PsCR-LOOS1 se hizo una doble digestión con *NotI* y *HindIII* (Thermo scientific) como lo marca el fabricante. Una vez terminado el tiempo de digestión se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 %teñido con bromuro de etidio. El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

La clonas que dieron el patrón de restricción esperado se secuenciaron en la Unidad de síntesis y secuenciación del IBT-UNAM utilizando los oligos M13-Fw y M13-Rv, los cuales se encuentran flanqueando las zonas att en el pENTER y a su vez flanquean el gen de interés.

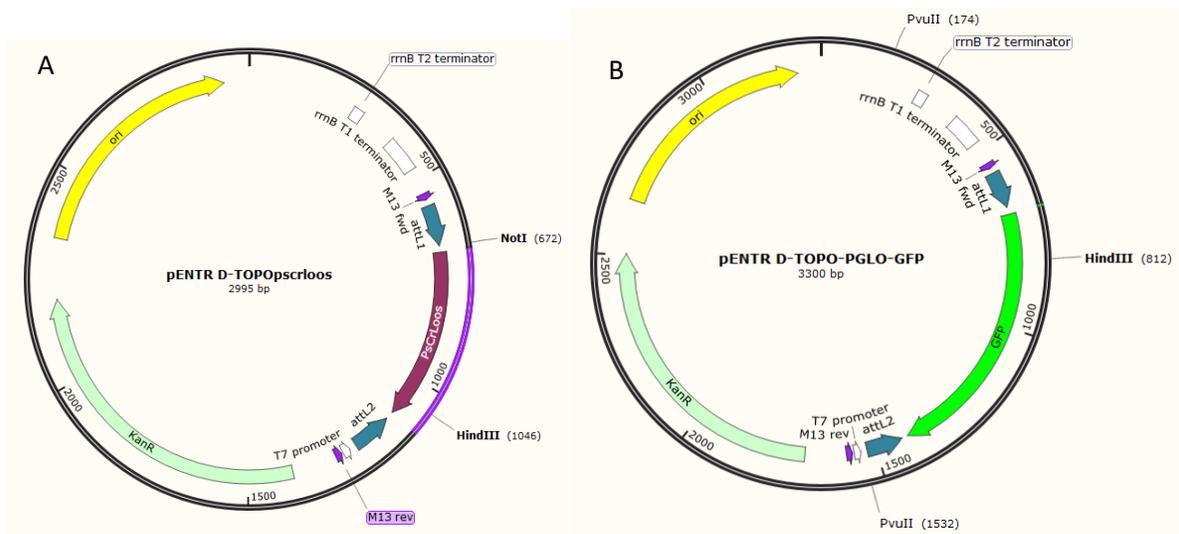


Figura 6.A) Mapa de pENTER-D-TOPO::PsCR-LOOS1. *NotI* corta en la posición 672 y *HindIII* corta en la posición 1046. B) Mapa del plásmido pENTER-D-TOPO::GFP. El gen de GFP o PsCR-LOOS1 se encuentra flanqueado por las secuencias attL1 y attL2. *PvuII* hace dos cortes en la posición 174 pb y 1532 pb presentes en el vector y *HindIII* hace un corte en la posición 812 pb dentro del gen de GFP.

6.2.4 Clonación del gen de GFP o PsCR-LOOS1 en el vector pMDC7 Gateway

Una vez que se verificó que las secuencias de PsCR-LOOS1 o GFP estaban clonadas con la secuencia deseada en pENTER-D-TOPO se llevó a cabo la reacción de recombinación con el vector pMDC7 utilizando el kit de ThermoFisherScientific, Gateway Cloning Protocols, como lo marca el fabricante.

Para la mezcla de reacción utilizamos las siguientes cantidades: 100 ng del vector pMDC7, 100 ng del plásmido pENTER-D-TOPO::*GFP* o pENTER-D-TOPO::*PsCR-LOOS1*, buffer TE y LR clonasa; los reactivos fueron añadidos en ese orden. Se incubó en baño María a 22 °C y después de dos horas de incubación se adicionó proteinasa K para inactivar la reacción y se a incubó ahora a 37 °C por 15 minutos, terminado el tiempo, la mezcla de reacción se colocó en hielo. La reacción de clonación con el vector de expresión se mezcló con las células quimiocompetentes de *E. coli* ONE SHOT TOP10 y se incubó durante 30 minutos y después se transformó por choque térmico a 42 °C por 45 s, se añadió con 1 ml de LB y se incubó a 37 °C por 45 min. Se plaqueó el 10 y el 90 % de las células transformadas en medio LB sólido con espectinomicina (100 µl/ml) como antibiótico de selección de la bacteria. Después de 24 h de incubación a 37 °C se seleccionaron colonias y se puso un cultivo en 4 ml de medio LB líquido con espectinomicina (100 µl/ml) a los cuales les hizo la extracción de plásmido con el kit GeneJET Plasmid miniprep de Thermo scientific cuando tenían 16 h de incubación a 37 °C. A estos plásmidos se les hizo un análisis de restricción enzimática. Para la construcción pMDC7::*GFP* se usó *NdeI* (Thermo scientific) y para pMDC7::*psCR-LOOS1* se hizo una doble digestión *XhoI* y *PvuII* (Thermo scientific) como lo marca el fabricante. Para verificar el patrón de digestión, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio a 100 V durante 40 min. El gel se observó en un traniluminador de luz UV. Las clonas que dieron el patrón de restricción se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM utilizando los oligos GFP-Fw-CACC y GFP-Rv para pMDC7::*GFP* y Loos-Fw-CACC y Loos-Rv para pMDC7::*psCR-LOOS1*.

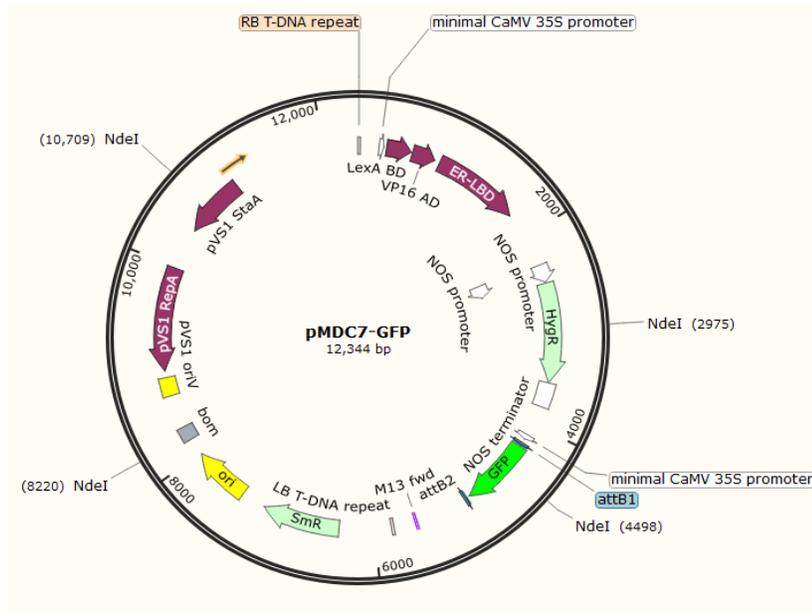


Figura 7. Mapa del plásmido de expresión pMDC7::gfp. La enzima *NdeI* hace cuatro cortes, tres de ellos son en el vector y un corte en el gen de GFP.

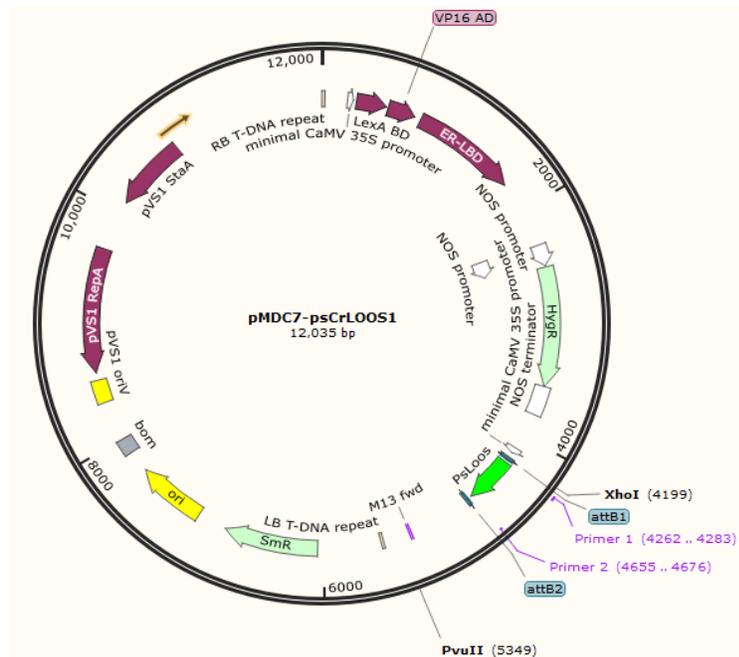


Figura 8. Plásmido pMDC7::psCr-loos1. *XhoI* hace un corte en la posición 4199 y *PvuII* hace un corte en la posición 5349.

6.3 Transformación genética de *Arabidopsis thaliana* Col-0 por “inmersión floral”

Para llevar a cabo la transformación genética de *A. thaliana* utilizamos semillas del ecotipo Columbia 0.

Se adicionó a las semillas alcohol al 70%, se agitó durante 2 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min; se eliminó el sobrenadante y se agregó solución de hipoclorito de sodio al 40%/tritón 0.02%/H₂O Milli-Q, se agitó durante 10 minutos; después se centrifugó a 13000 rpm por 1 min y por último se eliminó el sobrenadante; finalmente se hicieron 6 lavados con agua Milli-Q estéril. Las semillas se colocaron en macetas que contenían sustrato Metromix 550 (Clough & Bent, 1998).

A un tubo con 5 ml de medio LB líquido con rifampicina (50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml), se inoculó con *A. tumefaciens* C58 y se incubó por 24 h a 150 rpm a 28 °C. De los 5 ml de precultivo se tomaron 2.5 ml para inocular un matraz con 500 ml de LB con rifampicina (50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) y se incubó a 28 °C a 150 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0.8; se centrifugó a 5000 rpm por 12 min y se desechó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 400 ml de solución de sacarosa 5 %/silwet 0.005 %/H₂O Milli-Q. Esto fue tanto para el cultivo de pMDC7::PsCR-LOOS1 o pMDC7::GFP. Los botones florales fueron sumergidos en la solución de infiltración que contenía los cultivos de *A. tumefaciens* C58 transformadas con pMDC7::PsCR-LOOS1 o pMDC7::GFP, tratando de introducir todos los botones florales durante 20 segundos. Se eliminó el exceso de solución de los botones y las plantas se colocaron en posición horizontal en una charola negra, las charolas fueron selladas con plástico adherente y las plantas se cubrieron con otra charola negra para que quedaran en oscuridad. Las plantas se incubaron en una cámara de cultivo a 23 °C.

Al día siguiente, a primera hora de la mañana, el plástico adherente se perforó con la finalidad de comenzar a aclimatar las plantas, pero se dejó la bandeja que las cubría para que siguieran en oscuridad. Al medio día, las plantas se acomodaron en posición vertical y se regaron si así lo requerían. Las plantas se dejaron en la

misma cámara de cultivo a 23 °C, 60 % humedad con un foto periodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad. (Clough & Bent, 1998).

6.3.1 Selección de líneas homocigas

Dos o tres semanas después de la transformación, las plantas formaron frutos maduros (silicuas) y comenzaron a secarse, además se dejaron de regar.

Se retiraron las silicuas y se mantuvieron en un desecador a temperatura ambiente por una semana para eliminar por completo el agua presente. Una vez secas las semillas se desinfectaron como ya se describió anteriormente. Se germinaron en medio MS 1/2 (Sigma) adicionado con higromicina (15 µg/µl) el cual es el antibiótico de selección (gen de resistencia a higromicina presente en el TDNA del plásmido pMCD7). Las semillas que lograron germinar (semillas transformadas T1) se pasaron a una maceta con Metromix (planta transformante T1) aproximadamente de 15 días de edad y se crecieron a 23 °C, 16 h luz, 8 h de oscuridad. Una vez obtenidas las semillas (semillas transformantes T2) se secaron, desinfectaron y germinaron en medio MS 1/2 adicionado con higromicina (15 µg/µl) (Harrison *et al.*, 2006).

6.3.2 Extracción de DNA genómico para determinar la inserción del transgen

Para verificar la presencia del gen de la loosenina y del gen de GFP en el DNA genómico de *A. thaliana* de las plantas transgénicas T1 y T2 que presentaban resistencia a higromicina se purificó el DNA de las hojas de la manera siguiente.

Las hojas se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se colocó en un microtubo estéril de 1.5 ml. Se adicionó 500 µl de buffer de extracción (200mM de Tris/HCl pH=8.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) y se mezcló con vortex por 3 min y se agregó 2 µl de RNAsa Thermo scientific (2mg/ml) y se incubó 1 h a 37 °C; se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se recuperó

el sobrenadante en un microtubo nuevo. Se adicionó 500 μ l fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) al tubo y se agitó suavemente durante 3 min; se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se separó la fase acuosa colocándola en un microtubo nuevo. A este tubo se le añadió 500 μ l de cloroformo y se mezcló con vortex por 3 min y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min; a continuación se separó la fase acuosa a un microtubo nuevo. Se adicionó 500 μ l de isopropanol (1 volumen), se mezcló por inversión e incubó 1 h a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se lavó 2 veces con 500 μ l de etanol al 70 %. La pastilla se dejó secar y fue resuspendida en 50 μ l de agua Milli-Q (Guillemaut, *et al.*, 1992).

Usando como molde el DNA genómico de las plantas T1 y T2 se prepararon reacciones de PCR con los oligos específicos para amplificar el gen de GFP y el gen de la loosenina (GFP-Fw-CACC, GFP-Rv; Loos-Fw-CACC, Loos-Rv) con las condiciones antes mencionadas (ver Tabla 1). Para verificar la presencia del amplicón se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. El corrimiento fue a 100 V durante 40 min. El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.4 Estandarización de la concentración de β -estradiol para inducir la expresión de los transgenes

Una vez verificado que los genes de GFP y Loosenina estuvieran insertados en el genoma de *A. thaliana*, se determinó la concentración de β -estradiol (Sigma) a la cual se induce la expresión de GFP (gen control de inducción y por tanto de expresión, para poder facilitar el seguimiento de la inducción de la LOOS1).

Las semillas T2 se desinfectaron como ya se describió y germinaron en medio MS 1/2 con higromicina (15 μ g/ μ L), se dejó crecer hasta que presentaron las primeras hojas verdaderas (aproximadamente 15 días de edad).

Se preparó una solución stock de β -estradiol 10 mM disuelto en DMSO concentrado. Posteriormente, se prepararon alícuotas a 1 μ M, 25 μ M, 100 μ M y 250 μ M diluidas con agua Milli-Q estéril, además se prepararon alícuotas de DMSO (0.1 %, 0.25 %, 0.5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 %, 100 %).

1 % y 2.5 %, ver Tabla 2) sin el β -estradiol como un control negativo de inducción respectivamente. De las alícuotas preparadas de β -estradiol y DMSO se tomaron 100 μ l y la solución fue colocada sobre la plántula.

Las plántulas se dejaron en el cuarto de cultivo a 23 °C 16 h luz, 8 h de oscuridad y se observaron a las 24 y 48 h en el microscopio de epifluorescencia, ya que ante la presencia del inductor habrá expresión y síntesis de la proteína GFP. Cabe mencionar que a las plántulas se les cambio la solución con el β -estradiol y solo DMSO cada 24 h. (Borgi, 2010; Zuo *et al.*, 2000).

Tabla 2: Concentraciones utilizadas para la inducción del promotor

INDUCIDAS	NO INDUCIDAS
<i>A. thaliana</i> transformada con pMDC7::PsCR- <i>LOOS1</i> o pMDC7::GFP	<i>A. thaliana</i> transformada con pMDC7::PsCR- <i>LOOS1</i> o pMDC7::GFP
β -estradiol	DMSO
1 μ M	0.1 %
25 μ M	0.25 %
100 μ M	1 %
250 μ M	2.5%

6.4.1 Extracción de RNA total a partir de plántulas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* inducida con β -estradiol

Para verificar la expresión del transgen hicimos la extracción de RNA total de las plantas transformantes T2.

El procedimiento se realizó en hielo con material estéril y las soluciones frías.

Las plántulas fueron maceradas con nitrógeno líquido y aproximadamente se colocaron 400 mg de muestra en un microtubo de 1.5 ml, a este se le adicionó 1ml

de TRIzol Reagent (Sigma) y se puso 15 s en vortex, posteriormente fue incubado en hielo por 5 min y pasado el tiempo se centrifugó 5 min a 13500 rpm de 2-8 °C. De la muestra se tomó únicamente el sobrenadante y se colocó en un microtubo nuevo. Al sobrenadante se le añadieron 200 µl de cloroformo frío y se agitó en vortex por unos segundos e inmediatamente fue regresado al hielo y se centrifugó a 13500 por 10 min a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada y transferida a un microtubo nuevo, a esta se le añadieron 500µl isopropanol y se agitó con la mano. Posteriormente se incubó 10 min en hielo y de ahí 1 h a - 80 °C. Pasado el tiempo se centrifugó a 13500 rpm por 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75 % con H₂O DEPC. La pastilla fue resuspendida y centrifugada a 13500 rpm por 7 min a 4 °C. El lavado se repitió ahora con 500 µl de etanol al 75 % y se centrifugó 13500 rpm por 7 min 4°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado se dejó secar por 5 min, al precipitado se le añadió 30 µl de agua DEPC y fue resuspendido. El RNA total se guardó a -80 °C.

Para verificar la calidad del RNA, hicimos una electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando 1 µg de RNA, teñido con bromuro de etidio, el corrimiento se hizo a 90 V durante 1h. El gel se observó en un transiluminador de luz UV.

6.4.2 Síntesis de cDNA

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA primeramente se hizo un tratamiento del RNA total con DNasa de Thermo scientific como lo marca el fabricante.

Se usó 1 µg de RNA al que se le añadió 1 µl de buffer 10X/ MgCl₂, 1 µl de DNasa y se ajustó con H₂O, después se incubó a 37 °C por 30 min. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 2 µl de EDTA 25 mM y se incubó a 65 °C.

500 µg de RNA se utilizaron para una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y verificar la calidad de este después del tratamiento. Los 500 µg de RNA restantes se utilizaron para la reacción de cDNA utilizando el kit FastGene Scriptase Basic como lo marca el fabricante, a continuación se describe brevemente.

A los 500 µg de RNA se les añadió 1 µl de oligo dT y se incubó a 42 °C por 5 min. Se colocó en hielo y se añadió lo siguiente: 2 µl de buffer 10X Fast Gene, 1 µl de Scriptase Basic, 2 µl de dNTP, 0.5 µl de RNase Inhibitor, ajustado con H₂O libre de RNasas. La mezcla se incubó a 42 °C por 1 h y después a 90 °C por 5 min. Posteriormente se hizo un RT-PCR utilizando unos oligos como control para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Arabidopsis* GAPDHFw y GADPHRv. Además se hizo un RT-PCR con los oligos específicos de GFP (GFP-Fw-CACC GFP-Rv) con las condiciones descritas en la tabla 1. Para verificar la presencia del amplicón se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio a 100 V durante 40 minutos. El gel se observó en un transiluminador de luz UV.

7. Resultados

7.1 Clonación de la Loosenina en el vector pMCD7 Gateway

Se construyó el vector de expresión pMDC7::PsCR-LOOS1 como ya se ha mencionado. La finalidad de tener este vector con la secuencia codificante de la Loosenina es tener bajo condiciones controladas la expresión de LOOS1 porque este vector de expresión presenta el promotor inducible por estrógenos OlexA-46. Siendo que la Loosenina es una proteína amorfogénica.

Para confirmar la clonación del fragmento de PCR psCR-LOOS1 en el vector pENTER-D-TOPO se hizo una doble digestión enzimática utilizando las enzimas *NotI* y *HindIII* las cuales sólo hacen un corte en el plásmido. En el caso de *NotI*, la secuencia donde corta se encuentra en el vector, cerca del sitio de clonación del gen de interés, mientras que *HindIII* hace un corte dentro de la secuencia de la Loosenina (ver Figura 9B). De manera que se esperaban dos bandas de 2671 y 374 pb. Como se muestra en la figura 9A, solamente la clona 2 presenta el patrón de digestión esperado, al analizar los patrones de restricción en un gel de agarosa se observó una banda de entre 250 pb y 500 pb y una banda de entre 2500 pb y 3000 pb. Por lo que los resultados del análisis indican que la clonación en el pENTER fue exitosa para la clona 2. Mientras que en los carriles 3 y 4 no se observaron las bandas predichas.

Posteriormente se subclonó el fragmento de psCR-LOOS1 a partir del pENTER con el uso de la tecnología Gateway al vector de expresión pMCD7, el cual contiene al promotor inducible por estrógenos.

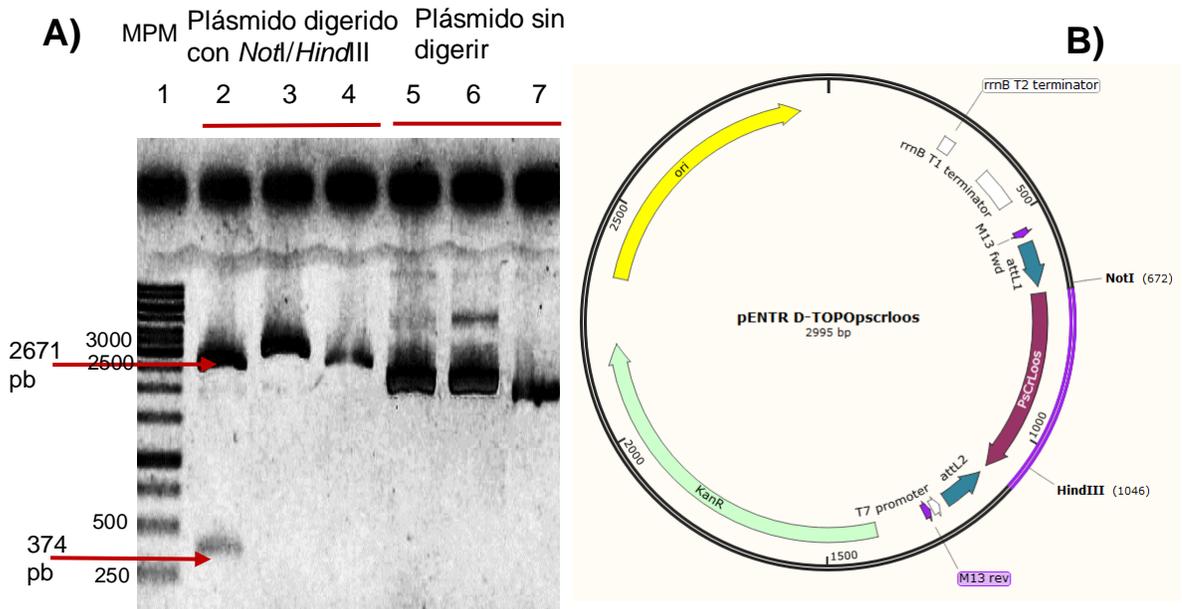


Figura 9. Patrón de restricción enzimática de pENTR-D-TOPO::psCR-LOOS1. **A)** Digestión enzimática de pENTR::psCR-LOOS1 con *NotI* y *HindIII*. Carril 1: MPM, carril 2: clona 2 digerida, carril 3: clona 3 digerida, carril 4: clona 4 digerida, carril 5: clona 2, carril 6: clona 3, carril 7: clona 4. Bandas esperadas de 374 pb y 2671 pb son indicadas por flechas rojas. **B)** Mapa del plásmido pENTR::psCR-LOOS1. *NotI* hace un corte en la posición 672 y *HindIII* hace un corte en la posición 1046. Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

Al analizar el patrón de restricción de dos clonas (1 y 2) que se obtiene con *XhoI* y *PvuII*, se observó una banda de entre 1000 pb y 1500 pb y la banda esperada era de 1150 pb y además una banda de 10885 pb, la cual al observar el gel de agarosa esta se mantiene cercana al pozo donde se colocó la muestra. Como se puede ver en la figura 10 el patrón de restricción indica que la reacción de recombinación entre el pENTR-D-TOPO::PsCR-LOOS1 y el pMCD7 fue adecuada y de estas clonas se seleccionó la número 2 para su secuenciación. El análisis de la secuencia reveló que el fragmento no presenta cambios en la secuencia de nucleótidos, respecto al molde original.

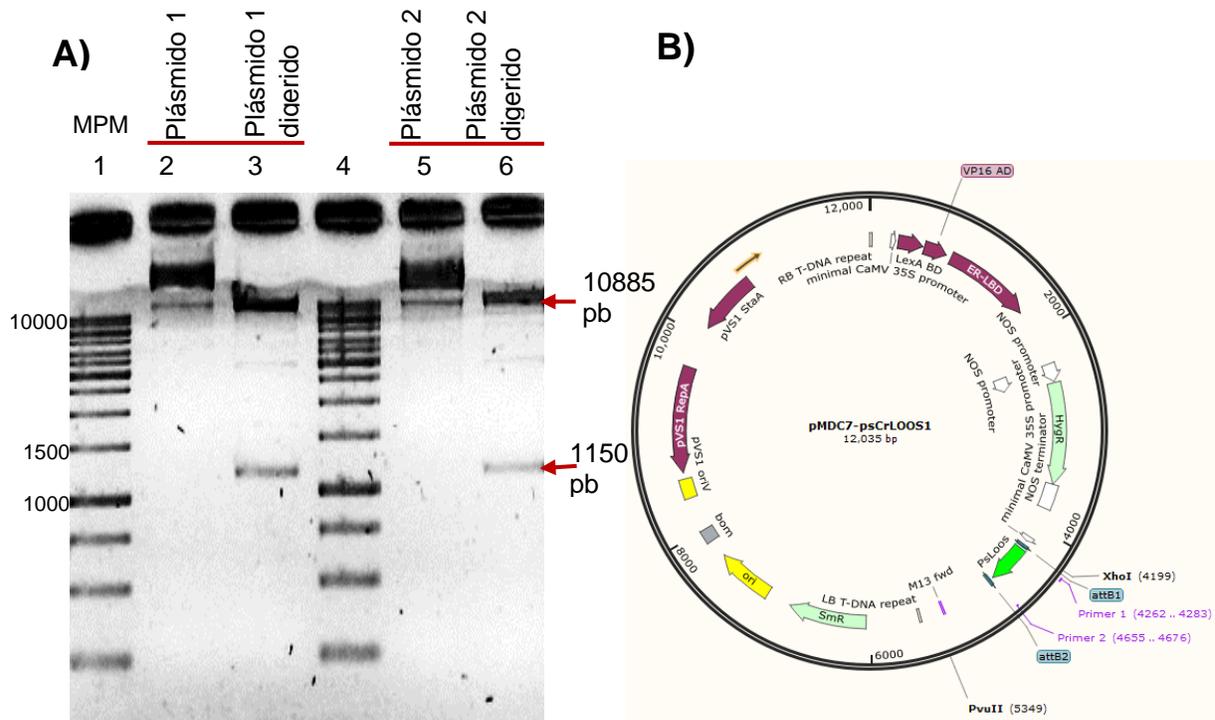


Figura 10. Patrón de restricción enzimática de pMDC7::psCR-LOOS1. **A)** Digestión enzimática del pMDC7::psCR-LOOS1 con *XhoI* y *PvuII* carril 1: MPM, carril 2: clona 1, carril 3: clona 1 digerida, carril 4: MPM, carril 5: clona 2, carril 6: clona 2 digerida. Las bandas esperadas son 1150 pb y 10885 pb indicadas por flechas rojas. **B)** Mapa del plásmido pMDC7::psCR-LOOS1. *XhoI* hace un corte en la posición 4199 y *PvuII* hace un corte en 5349. Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

7.2 Clonación del gen de la GFP en el vector pMDC7 Gateway

Con el objetivo de tener un control de transformación y de inducción, realizamos la clonación del gen de GFP en el pMCD7 también a través de la tecnología Gateway. De igual manera que con el fragmento psCR-LOOS1, amplificamos la secuencia que codifica para el gen de GFP a partir del plásmido pGLO con oligos específicos (Tabla 1), en el que al primer-sentido se añadió la secuencia CACC en el extremo 5', para hacerlo compatible con el vector de entrada pENTER-D-TOPO y darle la direccionalidad.

Se obtuvieron colonias transformantes de la construcción pENTER-D-TOPO::GFP, por lo que se prosiguió a hacer la extracción del plásmido y realizar el análisis del patrón de digestión con *PvuII*, esta enzima hace dos cortes en el plásmido pENTER-

D-TOPO; se esperaban dos bandas una de 1358 pb, en esta banda se encuentra la secuencia del gen de GFP y otra de 1942 pb, en esta banda la secuencia del vector. Seleccionamos otra enzima *HindIII*, la cual hace un corte únicamente en el gen de GFP por lo cual la construcción quedaría lineal lo que permitiría saber el peso molecular de la construcción cuyo tamaño predicho es de 3300 pb, además de que efectivamente se tenía clonado el gen de interés (Figura 11).

Lo siguiente fue seleccionar dos clonas y mandar a secuenciar, utilizando los oligos para el pENTER-D-TOPO, M13Fw y M13Rv que flanquean las secuencias att, estas secuencias att recombinan con las secuencias att presentes en el vector pMDC7 y a su vez dentro de estas secuencias att está el gen de GFP. Todo esto se verificó para posteriormente proceder con la reacción de recombinación con el plásmido pMDC7, la secuencia de la clona que alineó con la secuencia del gen de GFP presente en pGLO fue la clona 1, entonces este plásmido fue usado para los siguientes experimentos.

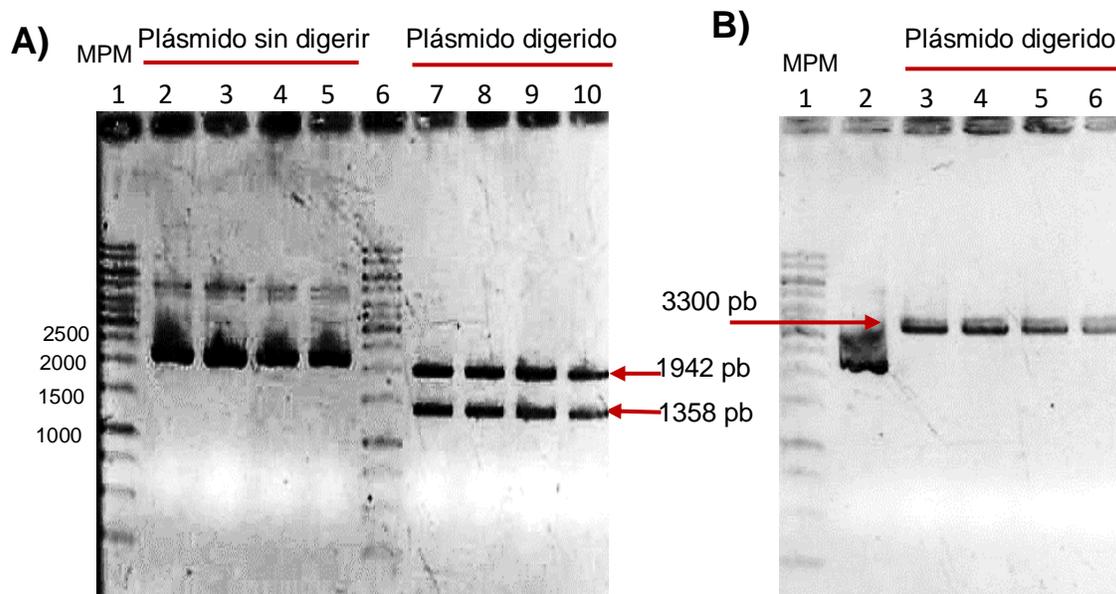


Figura 11. Patrón de restricción enzimática de pENTER-D-TOPO::GFP de las clonas seleccionadas 1, 2, 4 y 5. **A)** Digestión del plásmido pENTER::GFP con *PvuII*. Carril 1: MPM, carril 2: clona 1, carril 3: clona 2, carril 4: clona 5, carril 6: MPM, carril 7: clona 1, carril 8: clona 2, carril 9: clona 4, carril 10: clona 5. Las bandas esperadas son 1942 pb y 1358 pb señaladas con flechas rojas. **B)** Digestión del pENTER::GFP con *HindIII*. Carril 1: MPM, carril 2: plásmido sin digerir, carril 3: clona 1, carril 4: clona 2, carril 5: clona 4, carril 6: clona 5. Banda esperada de 3300 pb señalada con la flecha roja. Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

Para verificar que la reacción de recombinación fue la adecuada, se hizo la extracción del plásmido y posteriormente el análisis de restricción enzimática del plásmido pMDC7::*GFP*. Para esto se usó la enzima *NdeI*, la cual hace cuatro cortes en la construcción y uno de ellos se encuentra dentro del gen de GFP; una forma de saber si se encontraba el gen de interés fue cortándolo y asegurando el peso molecular del plásmido ya con el inserto, las bandas predichas coinciden con las obtenidas. Los pesos moleculares predichos son los siguientes: 1523 pb, 2489 pb, 3722 pb, 4610 pb (Figura 12).

Se seleccionaron dos clonas (4 y 5) y se mandó a secuenciar utilizando los oligos GFP-Fw y GFP-Rv, la secuencia de la clona 4 alinea con la secuencia reportada en el plásmido pGLO y no presenta ningún cambio de bases.

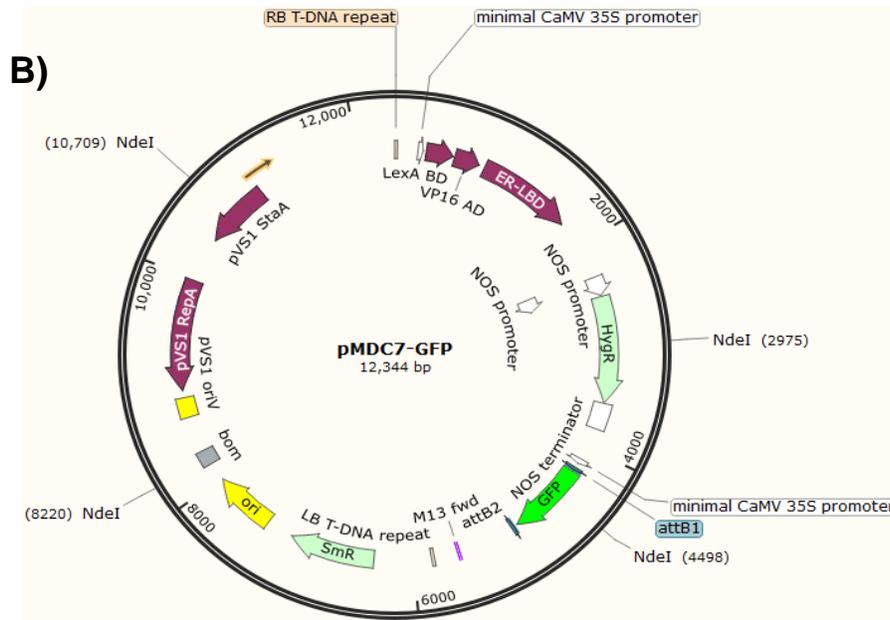
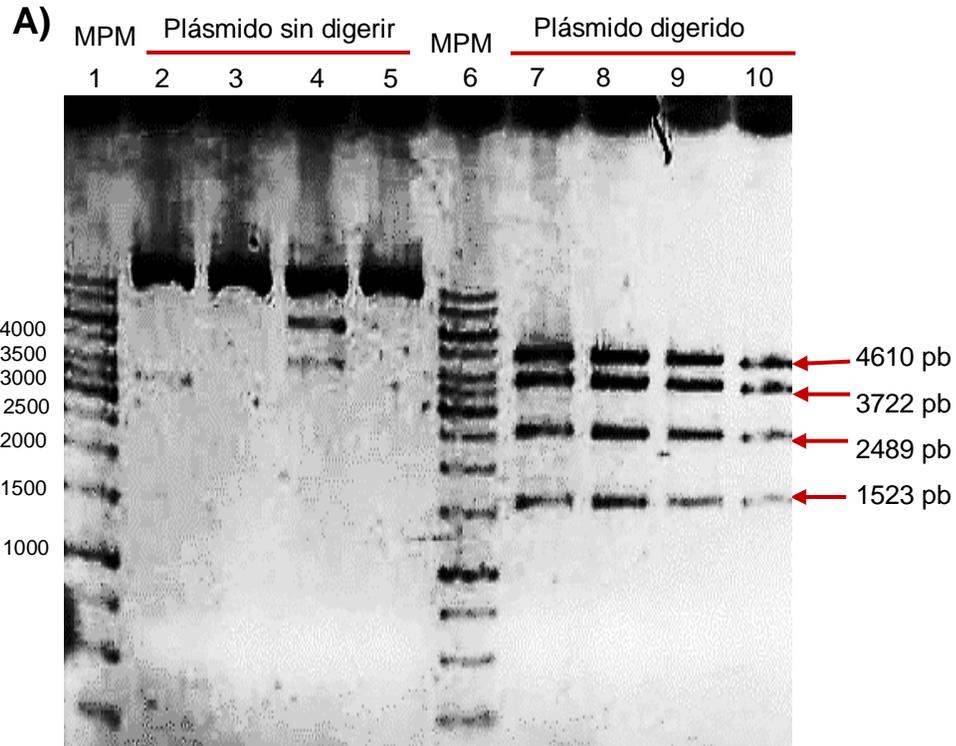


Figura 12. Patrón de restricción enzimática de pMDC7::GFP, de las clonas 4, 5, 7 y 9. **A)** Digestión del plásmido pMDC7::GFP con la enzima *NdeI*. carril 1: MPM, carril 2, 3, 4, 5: clonas 4, 5, 7 y 9 respectivamente sin digerir; carril 6: MPM, carril 7, 8, 9 y 10: clona 4, 5, 7 y 9 respectivamente digeridas. bandas esperadas 4610 pb, 3722 pb, 2489 pb, y 1523 pb señaladas con las flechas rojas. **B)** Mapa del plásmido pMDC7::GFP. *NdeI* hace cortes en la posición 2975, 4498, 8220 y 10,709. Marcador de peso molecular 1 kb de Fermentas.

7.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* C58 con el plásmido pMCD7::psCR-LOOS1 y pMDC7::GFP

Una vez que se verificaron las construcciones por secuenciación, se procedió a transformar a *tumefaciens* C58.

La selección primaria que se hizo, fue tomar aquellas colonias que habían crecido en los medios con los antibióticos de selección (espectinomicina y rifampicina). Para verificar la presencia del gen de interés, se realizó un PCR en colonia para amplificar con oligos específicos al gen psCR-LOOS1 y al gen de GFP del que se esperaba un producto de 411 pb y de 720 pb respectivamente. Como se puede observar en la figura 13; respecto al control positivo (los plásmidos con las construcciones), los amplicones que se obtuvieron coinciden con el peso molecular de nuestro control positivo y la ausencia de amplificación en nuestro control negativo nos indica que no hay inespecificidad en la reacción, ni contaminación.

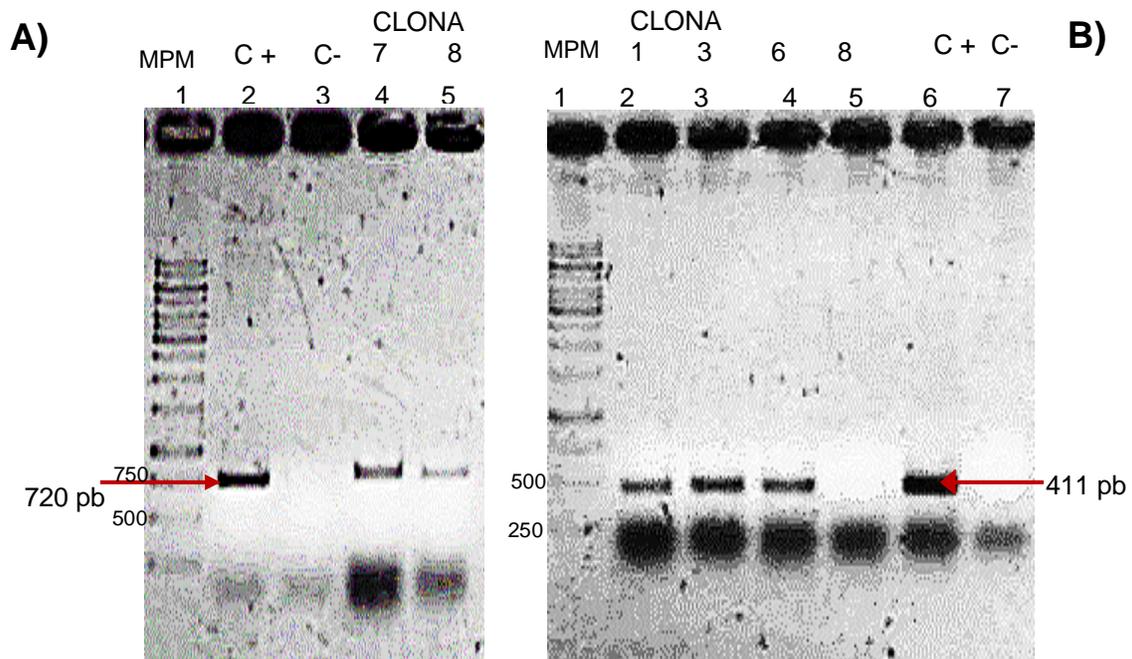


Figura 13. Amplificación de genes mediante PCR en colonia a partir de *A. tumefaciens*. **A)** Amplificación del gen de la GFP. Carril 1: MPM, carril 2: control (+), carril 3: control (-), carril 4: clona 7, carril 5: clona 8. **B)** Amplificación del gen psCR-LOOS1. Carril 1: MPM, carril 2: clona 1, carril 3: clona 3, carril 4: clona 6, carril 5: clona 8, carril 6: control (+), carril 7: control (-) Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

7.4 Verificación de la transformación de *A. tumefaciens* C58 con los plásmidos pMDC7::psCR-LOOS1 o pMDC7::GFP

Con la finalidad de verificar que la transformación de *A. tumefaciens* C58 con pMDC7::psCR-LOOS1 y pMDC7::GFP fue exitosa, se decidió hacer la extracción de estos plásmidos.

A partir de esta extracción obtuvimos una concentración mínima (5 ng/μl) para el caso de los dos plásmidos, por lo que se decidió transformar *E. coli* XL1-BLUE con los plásmidos obtenidos y así se verificó que *A. tumefaciens* C58 está transformado y además que el gen de interés está presente en la construcción. Entonces al hacer la extracción de los plásmidos, a partir de *E. coli*, con la concentración obtenida 200 ng/μl para pMDC7::psCR-LOOS1 y 230 ng/μl para pMDC7::GFP se pudo hacer el análisis de restricción enzimática. Se decidió probar *SacI* para los dos plásmidos, para el caso de pMDC7::GFP presenta 4 sitios de corte y uno de ellos se encuentra en la secuencia de GFP por lo tanto se obtuvieron 4 bandas con los siguientes pesos moleculares 7202, 3228, 1155 y 759 pb esto se puede observar en la figura 14B, además se realizó una segunda digestión de esta construcción con *XhoI* porque la secuencia del gen de GFP presenta un sitio de corte para esta enzima y el vector presenta otro sitio de corte por lo tanto se pretendía liberar un fragmento del gen de GFP en la banda de 489 pb y además se esperaba otra banda correspondiente al vector de 11854 pb.

Para el caso de pMDC7::psCR-LOOS1 presenta 3 sitios de corte en el vector, pero la secuencia del gen de la Loosenina no presenta sitios para *SacI*. Pero, se eligió porque al utilizar la misma enzima en las dos construcciones se genera un patrón de restricción diferente. Y por lo tanto se esperaba obtener las siguientes bandas 1155 pb, 3678 pb, 7202 pb, y en la banda de 3678 pb es donde se encontraría el gen psCR-LOOS1, en la figura 14A se puede observar.

Se corroboró que *A. tumefaciens* si esta transformado con las construcciones de interés y que los plásmidos se encuentran íntegros, ya que las bandas obtenidas de los plásmidos de *E. coli* migran igual que las bandas de los plásmidos digeridos que

utilizamos como nuestro control positivo, que en este caso fueron los plásmidos con los que se transformó *A. tumefaciens*, mismos que han sido secuenciados.

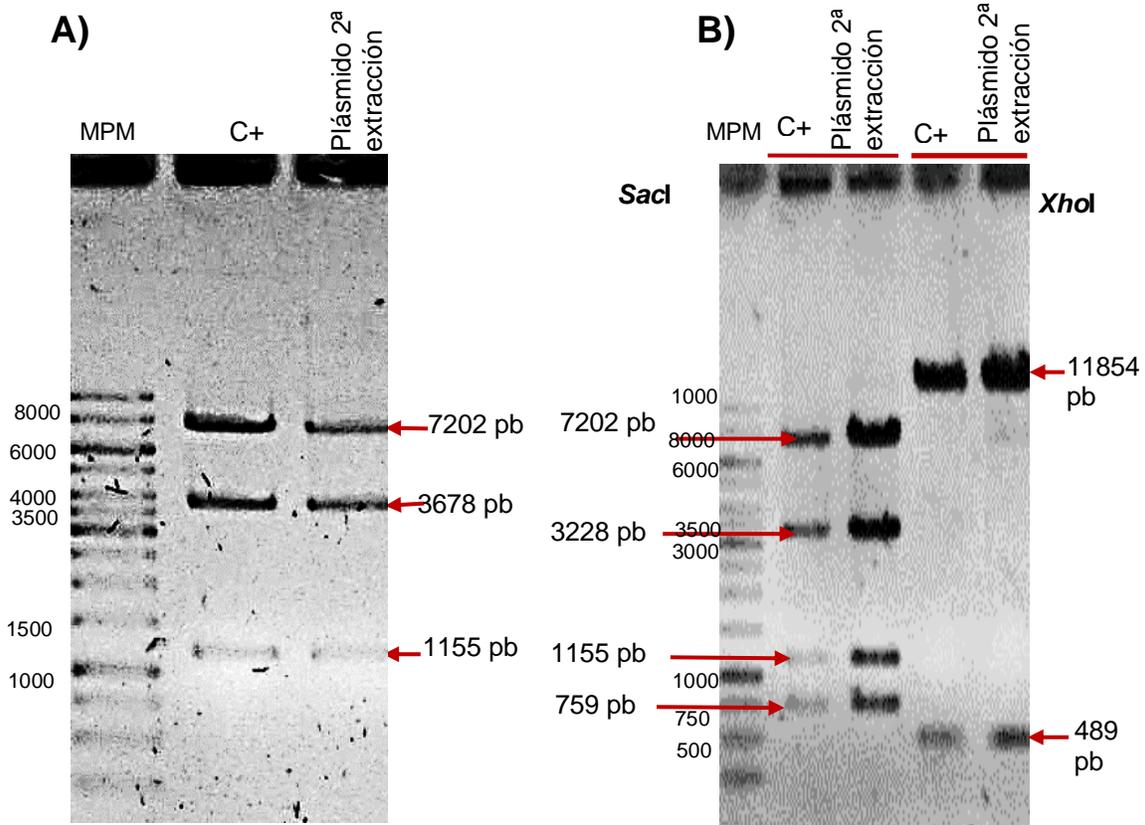


Figura 14. Patrón de restricción enzimática de los plásmidos extraídos de *E. coli* transformada con plásmidos provenientes de *A. tumefaciens*. **A)** Digestión enzimática de pMDC7::psCR-LOOS1 con *SacI*. **B)** Digestión enzimática de pMDC7::GFP con *SacI* y *XhoI*. Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

7.27.5 Transformación de *A. thaliana* mediante inmersión floral

Una vez confirmado que los plásmidos presentes en *A. tumefaciens* C58, tienen integrado el gen de interés, se procedió a transformar a *A. thaliana* utilizando el método de inmersión floral.

Para llevar a cabo una selección primaria de las semillas T1, se observaron los cambios fenotípicos, ya que se esperaba que; las plantas transgénicas fueran aquellas donde la coloración verde sea más fuerte y más grandes en talla en

comparación con las no transgénicas, debido a su resistencia a higromicina. Todas las semillas germinaron en el medio MS con higromicina pero no todas presentaron estas características (coloración más fuerte, mayor talla) y después de aproximadamente 20 días de crecidas, las plántulas no transgénicas empezaron a morir. En la figura 15A se observan las líneas transgénicas obtenidas en la T1 de pMDC7::psCR-LOOS1 y pMD7::GFP. En las cuales no se aprecia si presentan diferente fenotipo.

7.6 Verificación de la integración del TDNA del plásmido en el genoma de *A. thaliana*

Para asegurarnos de que *A. thaliana* tenía integrado en su genoma el TDNA con los genes de interés se realizó la extracción de DNA y se comprobó la presencia de los genes amplificando psCR-LOOS1 mediante PCR con los oligos Loos-Fw y Loos-Rv, donde el producto esperado es de 411 pb y para GFP con los oligos pGLOGFP-Fw y pGLOGFP-Rv en donde se esperaba un producto de 720 pb. Con esto se confirmó que las plantas transgénicas tanto en la T1 como en la T2 tenían el transgen (Figura 15).

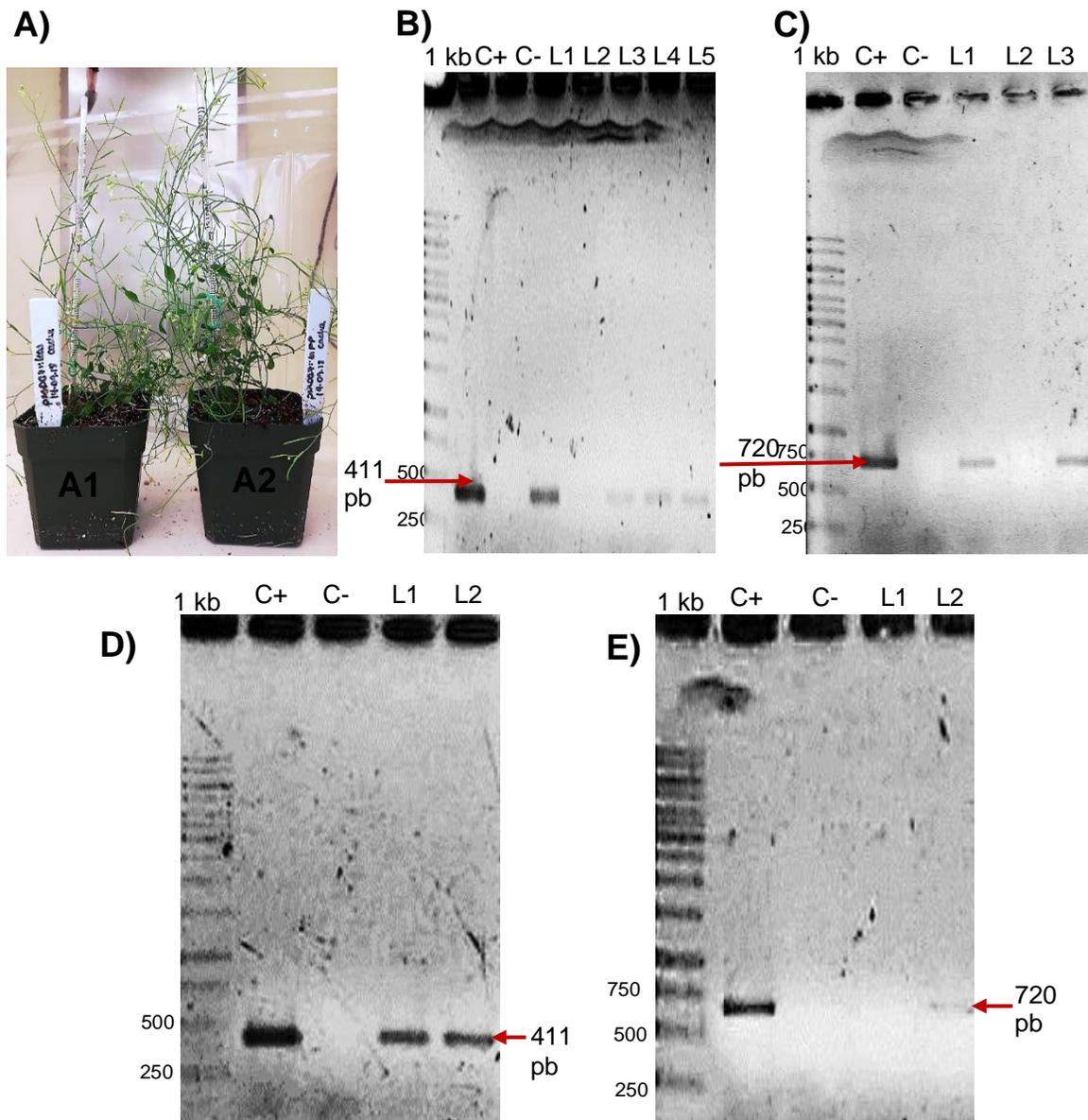


Figura 15. Determinación de la presencia del transgen. **A1)** Plantas transgénicas T1 transformadas con el plásmido pMDC7::psCr-loos1 y **A2)** con el plásmido pMDC7::gfp. **B)** Amplificación del gen psCr-loos1 a partir de DNA genómico de *A. thaliana*. **C)** Amplificación del gen de GFP a partir de DNA genómico de plantas T1. **D)** Amplificación de psCr-loos1 a partir de DNA genómico de *A. thaliana* T2. **E)** Amplificación del gen de GFP a partir de DNA genómico de *A. thaliana* T2. Marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas.

7.7 Estandarización de la concentración de β -estradiol para inducir la expresión de los transgenes

Para estandarizar la concentración, las plántulas utilizadas a la cual hay inducción del promotor fueron las T2 transformadas con el gen de GFP o psCR-LOOS1, estas tenían aproximadamente 15 días de edad.

La inducción se hizo por goteo a distintas concentraciones de soluciones con β -estradiol (1 μ M, 25 μ M, 100 μ M y 250 μ M) y soluciones solo con DMSO como el control negativo. La raíz de las plántulas fue observada a las 24 h y 48 h de inducción en el microscopio de epifluorescencia y además se añadió solución nueva a las plántulas a las 24 h.

El análisis de las raíces en el microscopio, muestra que hay fluorescencia en la concentración de 250 μ M; en la raíces de plántulas no inducidas hay auto fluorescencia, pero la señal es mínima respecto a las plántulas inducidas (Figura 17). Además, se logró observar fluorescencia en las raíces de plántulas inducidas con 100 μ M, que aunque es poca, es mayor con respecto al auto fluorescencia presente en las raíces de plántulas no inducidas, lo que nos indica que esto se debe a la expresión de GFP por la presencia del inductor (Figura 18).

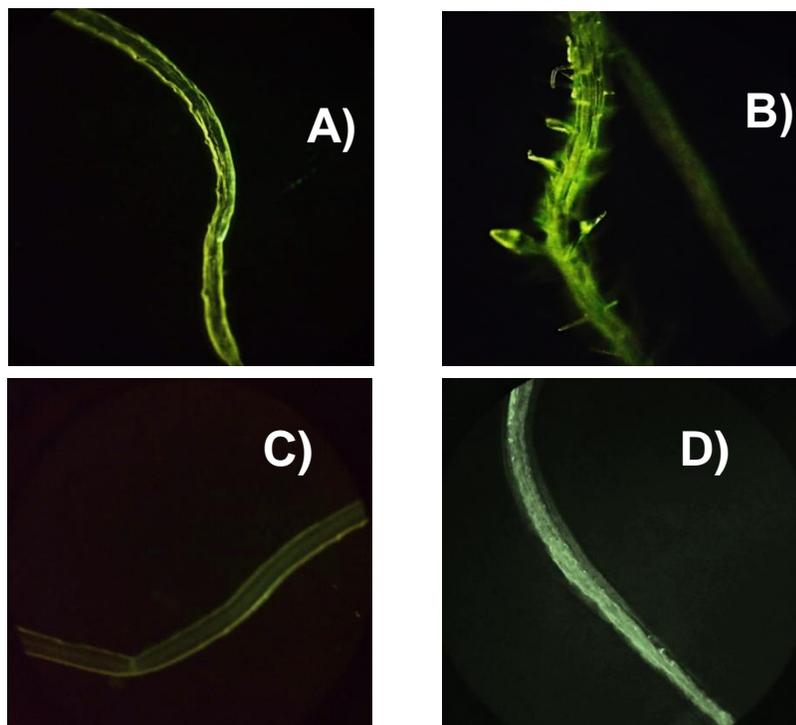


Figura 16. Inducción de expresión de GFP. Raíz de *A. thaliana* transformada con el gen *gfp*; inducida con 250 μ M β -estradiol y no inducidas. Observada bajo el microscopio de epifluorescencia. **A)** 24 h después de la inducción con β -estradiol. **B)** 48 h después de la inducción con β -estradiol. **C)** 24 h después, no inducidas. **D)** 48 h después, no inducidas.

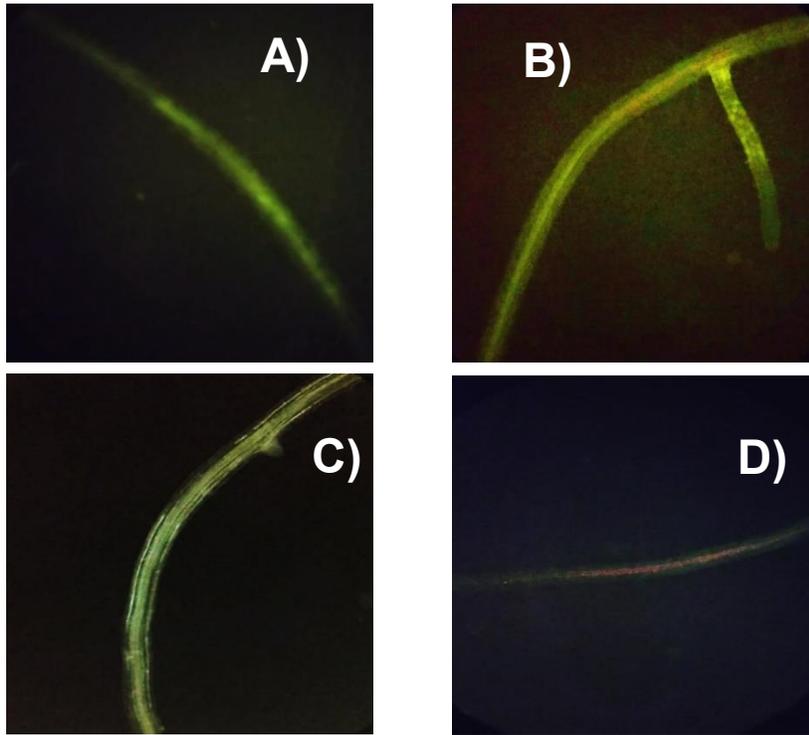


Figura 17. Raíz de *A. thaliana* transformada con el gen de gfp, inducida con 100 μ M de β -estradiol. Observada bajo el microscopio de epifluorescencia. **A)** 24 h después de la inducción con β -estradiol. **B)** 48 h después de la inducción con β -estradiol. **C)** 24 h después, no inducidas. **D)** 48 h después, no inducidas.

Para detectar expresión del transcrito de GFP en las plantas inducidas con β -estradiol con de la línea pMCD7::GFP, se realizó extracción de RNA total y síntesis de cDNA. Se realizaron RT-PCRs para la GFP y para un gen control (GAPDH), pero no hubo amplificación. Esto se debió a que posiblemente la DNAsa está contaminada y hay degradación del RNA. Es por eso que no logramos hacer la amplificación de ninguno de estos dos genes.

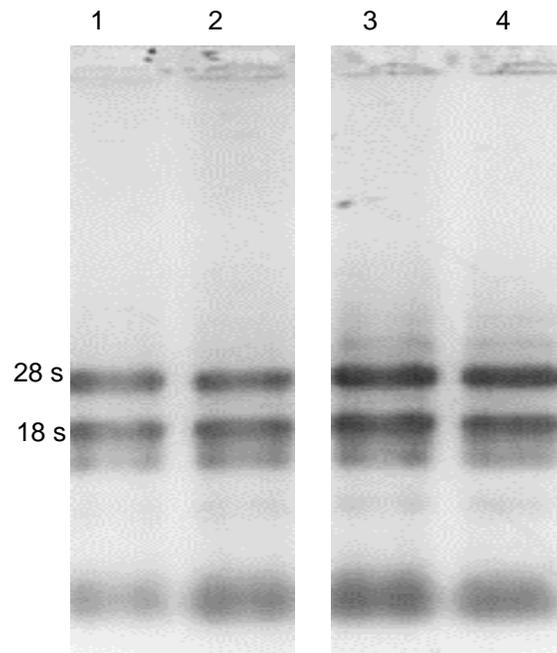


Figura 18. RNA total de *A. thaliana* inducida con β -estradiol. 1) inducida con 250 μ M de β -estradiol, 24 h después de inducción. 2) inducida con 250 μ M de β -estradiol, 48 después de la inducción. 3) inducida con 100 μ M de β -estradiol, 24 h después de inducción. 4) inducida con 100 μ M de β -estradiol, 24 h después de inducción.

8. Discusión

La clonación de los genes *psCR-LOOS1* y *GFP* se realizó por la tecnología Gateway la cual ofrece la ventaja de que elimina la clonación convencional mediada por DNA ligasa (Sasaki *et al.*, 2004; Parr & Ball, 2003; Walhout *et al.*, 2000). Es por ello que se diseñó un oligo directo en donde al extremo 5' se le añadió una secuencia CACC, esta secuencia es reconocida por la recombinasa y permite fácilmente la clonación en un vector de entrada pENTER-D-TOPO. El plásmido recombinante resultante tiene las secuencias de DNA diana flanqueadas por secuencias de recombinación attL. (Earley *et al.*, 2006). Para obtener un clon de expresión, la recombinasa utiliza los sitios generados attL1 y attL2 en el pENTER-D-TOPO::*psCR-LOOS1* y pENTER-D-TOPO::*GFP* con los sitios attR1 y attR2 del vector de entrada (pMDC7) y con ello se generan los sitios attB1 y attB2. El vector de entrada utiliza como marcador de selección al gen de resistencia a kanamicina diferente al marcador de selección presente en el vector de expresión (pMDC7) y esto facilita la selección de transformantes; el pMDC7 presentan dos marcadores de selección uno es a un antibiótico (espectinomicina) y otro es por la presencia del gen *ccdb*, cuyo producto es tóxico para la girasa de *E. coli*. Esto es una doble selección de clonas transformantes (Xu & Li, 2008). En el laboratorio se intentó clonar el gen *GUS* (1809 pb) pero cada que se hacia la clonación en el pENTER-D-TOPO se integraba un fragmento del gen (solo 1500 pb), el cual quedaba trunco en el extremo 5' aquí se sugiere que posiblemente con la tecnología Gateway es difícil clonar genes grandes.

El hecho de utilizar este vector, pMDC7, nos ayudaría a controlar las condiciones de expresión de nuestro gen de interés (el gen de la Loosenina). Curtis & Grossniklaus (2003), Zuo y cols. (2000), mencionan que presenta una inducción fuerte y no tiene un efecto tóxico en las plantas transgénicas y esto se debe a que el promotor *OlexA-46* es estrechamente regulable, altamente inducible y sin toxicidad detectable, usando este promotor hay un alto nivel de expresión del transgen. Este promotor presenta varias ventajas y esto se atribuye a los componentes de todo el sistema presentes en el TDNA del plásmido pMDC7.

Primero, debido a que el receptor de estrógenos se une al estradiol con una afinidad muy alta (0.5nM) y el transactivador quimérico (XVE) pueda activarse a concentraciones muy bajas de inductor y además que solo responde a estrógenos humanos permite que sea altamente estable. El dominio de unión a DNA (DBD) de LexA presente en pMDC7 no se asemeja estructuralmente a los factores eucarióticos conocidos, lo que reduce las posibilidades de que XVE pueda unirse a elementos cis endógenos de la planta.

Entonces bajo condiciones controladas lograríamos la inducción del gen de la Loosenina, pues el uso de este promotor da la ventaja de regular la expresión por la concentración utilizada del inductor. Como no fue así con Tapia (2014) en donde con el uso del promotor RD29A hubo expresión de la Loosenina sin llevar a cabo la inducción del promotor, y por lo tanto se observaron fenotipos raros tanto en semillas como en plantas esto porque el promotor responde a estrés por desecación y la semilla en el proceso de maduración lleva a cabo un proceso de desecación.

Ahora bien, teniendo las plantas adultas transgénicas T1 no se observaron diferencias fenotípicas entre las de Loosenina y GFP esto sin llevar a cabo la inducción, por lo tanto se sugiere que no hay expresión de escape.

De acuerdo con Zuo y cols. (2000), la inducción del promotor OlexA-46 se inició utilizando las concentraciones de 1 y 25 μM de β -estradiol en plántulas, ellos reportan que con 25 μM del inductor se llega a saturar la expresión y esta disminuye en 48 h, pero en nuestro caso no se logró observar a las 24 h ni a las 48 h utilizando estas concentraciones. Otros autores como Schlücking y cols. (2013) reportan que lograron ver fluorescencia utilizando concentraciones de 50 y 100 μM y por ello se decidió utilizar 100 μM y aumentar la concentración del inductor (β -estradiol) por arriba de 100 μM . Sin embargo utilizando 100 μM si se logró ver fluorescencia, poca pero más que las plántulas no inducidas a las 24 h y 48 h, mientras que para 250 μM se observó fluorescencia a las 24 h y 48 h, mayor que en la concentración de 100 μM . Por ello se logra estandarizar la concentración de β -estradiol, el cual era el

propósito de utilizar GFP como el control de expresión de este promotor, saber a qué concentración responde el promotor y que no haya una expresión basal. En el periodo en que se llevó a cabo la inducción de GFP y Loosenina en plántulas transgénicas T2 tampoco se observaron diferencias fenotípicas entre estas y las WT, aquí se sugiere que se debió a que se utilizaron plántulas pequeñas de edad las cuales apenas empezaban a presentar sus primeras hojas verdaderas, entonces no se logra percibir algún cambio en el fenotipo que haya ocurrido por expresión de la Loosenina. Por cuestiones de tiempo no se logró llegar a la verificación de la expresión del transcrito y de la síntesis de la proteína tanto para GFP como para la Loosenina.

A pesar de que no se llegó a observar si la Loosenina está desorganizando la pared celular, es importante destacar la implementación de un pretratamiento biológico y específicamente un auto-pretratamiento expresando proteínas amorfogénicas. Este estudio es un primer acercamiento a una planta modelo y el auto-pretratamiento de la biomasa, sin embargo esta tecnología podrá ser útil para generar un producto de valor agregado en cultivos donde se desechan residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar o el rastrojo de maíz.

Estudios han demostrado que estas proteínas aumentan la actividad de las celulasas a través de un efecto sinérgico y mejoran la hidrólisis enzimática y la sacarificación.

Kim y cols. (2009), clonaron el gen de BsEXLX1 una expansina microbiana, y lo expresaron en *E. coli* y demostraron que cuando se incubaba el papel filtro (celulosa cristalina) como material a desorganizar con BsEXLX1 en sinergia con celulasas muestra un sinergismo significativo en la evaluación de la hidrólisis enzimática con respecto a la hidrólisis enzimática en donde solo se incubaba el papel filtro (celulosa cristalina) y celulasas, la actividad sinérgica era tan alta como de 240 %, esto es 5.7 veces mayor que la actividad de la celulasa solo con papel filtro. Y en 2013 Kim y cols., utilizaron *Miscanthus* pretratado y demostraron que BsEXLX1 se unía preferentemente a sustratos ricos en lignina, en cantidades mucho más altas que

en sustratos ricos en celulosa. Además de que podría usarse como un bloqueador de la lignina en la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa y así se minimizaría la pérdida de celulosa debido a las uniones no productivas, además que también podría usarse durante la hidrólisis de la lignocelulosa.

Seki y cols. (2015), expresaron 5 expansinas de *Oriza sativa* en *E. coli* y observaron que las expansinas mostraban actividad sinérgica significativa con las celulasas.

Al Rocha y cols. (2015) expresaron de manera heteróloga la Swollenina de *Trichoderma harzianum* en *Aspegillus niger* y observaron que hay una sacarificación mejorada cuando se adiciona la swollenina a un coctel de celulasa. Aumento en dos veces la eficiencia de hidrolisis de las celulasas.

Con el uso de proteínas amorfogénicas se puede disminuir la barrera de despolimerización de la producción de biocombustibles a través de la actividad sinérgica con las celulasas, el inconveniente que presenta es la elección de un buen modelo biológico en donde se logre expresarlas y las dificultades para llevar a cabo su purificación; ya que es difícil obtener suficiente proteína para realizar ensayos in vitro, además, cualquier intento de estudiar o explotar su actividad sinérgica con celulasas en aplicaciones a escala comercial requerirá obtener proteína suficiente de un sistema heterólogo recombinante. Es por ello la ventaja del auto-pretratamiento, así tener una planta lista para la hidrolisis enzimática y sacarificación.

Yactayo-Chang y cols. (2016) pretendían desarrollar un sistema que expresara en exceso una expansina, de modo que pudieran producirse grandes cantidades de proteína para su utilización en la fabricación de productos de base biológica. Ellos expresaron una expansina de pepino en tabaco, utilizando el promotor 35s y concluyeron que la expresión constitutiva de la expansina en las hojas no era estable; por lo que decidieron expresar el gen de la expansina de pepino en semillas de *A. thaliana*, donde no lograron recuperar plantas transgénicas. A lo que sugieren

que la expansina puede ser potencialmente letal para este sistema de expresión en semilla. Además que, la proteína en sí, está teniendo un efecto negativo en el tejido de elección.

Las plantas transgénicas que expresen proteínas recombinantes que promueven la modificación o desorganización de la pared celular podrían facilitar la digestión de la lignocelulosa y las enzimas que facilitan la degradación de los polisacáridos en particular podrían mejorar la producción industrial de fibras, textiles, pulpa, papel, productos químicos y combustibles.

9. Conclusiones

- Clonamos el gen de la loosenina psCR-LOOS1 y el gen de GFP en el vector de expresión pMDC7, el cual tiene el promotor inducible por estrógenos.
- Transformamos *A. tumefaciens* C58 con los plásmidos pMDC7::psCR-LOOS1 y pMDC7::GFP.
- Logramos llevar a cabo la infección de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*, utilizando el método de inmersión floral.
- Comprobamos la presencia de los genes psCR-LOOS1 y GFP en líneas transgénicas de *A. thaliana* T1 y T2.
- Logramos estandarizar la concentración de estradiol necesaria para inducir la síntesis de GFP.

10. Perspectivas

- Determinar la expresión del transcrito y de la proteína de la loosenina en las líneas transgénicas de *A. thaliana*.
- Caracterizar el fenotipo de líneas transgénicas después de la inducción de la síntesis de la Loosenina.
- Evaluar la sacarificación de la biomasa de las líneas transgénicas.

11. Anexo

Alineamiento de secuencia

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	AAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACT	477
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	-----	0
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	AAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCATGGCTAGCAAAGGAGAAG-ACTTTTCACCT	317
pGLO-GFP	-----ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACT	30
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	AAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACT	149
pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC	537
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	-CTGARCTGTCCAATTCTTGTGATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC	59
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC	377
pGLO-GFP	GGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC	90
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTC	209
	* * * * *	
pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACT	597
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	AGKGGAGAGGGGGARGGKATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACT	119
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACT	437
pGLO-GFP	AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACT	150
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	AGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACT	269
	** * * * * ** * * *	
pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	ACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA	657
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	ACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAMCACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA	179
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	ACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA	497
pGLO-GFP	ACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA	210
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	ACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA	329

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	TGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC	717
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	TGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC	239
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	TGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC	557
pGLO-GFP	TGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC	270
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	TGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCC	389

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGT	777
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	GAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGT	299
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGT	617
pGLO-GFP	GAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGT	330
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GAAGGTTATGTACAGGAACGCACATATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGT	449

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGAT	837
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	GCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGAT	359
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGAT	677
pGLO-GFP	GCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGAT	390
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGAT	509

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	TTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAAT	897
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	TTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAAT	419
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	TTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAAT	737
pGLO-GFP	TTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAAT	450
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	TTTAAAGAAGATGGA AACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATAACTCACACAAT	569

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GTATACATCACGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCAC	957
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	GTATACATCACGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCAC	479
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GTATACATCACGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCAC	797
pGLO-GFP	GTATACATCACGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCAC	510
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GTATACATCACGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCAC	629

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	AACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC	1017
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	AACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC	539
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	AACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC	857
pGLO-GFP	AACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC	570
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	AACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGC	689

pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GAGGCC-CTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTC-GCACAACTGCGCCTTTCGAAA	1075
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	GATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAA	599
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAA	917
pGLO-GFP	GATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAA	630
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAA	749
	** * * *****	
pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	GATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTGTAAGTGTCTGCTGGTTAC-	1134
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	GATCCCAACG-AAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTGTAAGTGTCTGCTGGGATT	659
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	GATCCCAACG-AAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTGTAAGTGTCTGCTGGGATT	976
pGLO-GFP	GATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTGTAAGTGTCTGCTGGGATT	690
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	GATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTGTAAGTGTCTGCTGGGATT	809
	***** * * *	
pMDC7-GFP-Clona-4-Rv	-----	1134
pMDC7-GFP-Clona-4-Fw	ACACATGGCATGGATGAGCTCTACAATAAAAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTG	719
pENTER-D-TOPO-GFP-Clona-1-Rv	ACACATGGCATGGATGAGCTCTACAATAAAAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTG	1036
pGLO-GFP	ACACATGGCATGGATGAGCTCTACAATA-A-----	720
pENTER-D-TOPO-GFP-clona-1-Fw	ACACATGGCATGGATGAGCTCTACAATAA-AAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTG	868

Alineamiento de la secuencia del gen de GFP obtenida a partir de pGLO con las secuencias obtenidas a partir de la clona 1 de la construcción de pENTER-D-TOPO::GFP utilizando los oligos M1Fw y M13Rv, y las secuencias de la clona 4 de la construcción pMDC7:GFP utilizando los oligos GFPfWcACC y GFPPrv.

12. Bibliografía

1. Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on environmental health*.
2. AL Rocha, V., N. Maeda, R., Pereira Jr, N., F. Kern, M., Elias, L., Simister, R., ... & McQueen-Mason, S. J. (2016). Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnology progress*, 32(2), 327-336.
3. Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S., & Iqbal, H. M. N. (2014). Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 56-66.
4. Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, 408(6814), 796.
5. Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173.
6. Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in energy and combustion science*, 34(5), 551-573
7. Baker, J. O., King, M. R., Adney, W. S., Decker, S. R., Vinzant, T. B., Lantz, S. E., ... & Himmel, M. E. (2000). Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 217-223). Humana Press, Totowa, NJ.
8. Bomble, Y. J., Lin, C. Y., Amore, A., Wei, H., Holwerda, E. K., Ciesielski, P. N.,... & Himmel, M. E. (2017). Lignocellulose deconstruction in the biosphere. *Current opinion in chemical biology*, 41, 61-70.
9. Borghi, L. (2010). Inducible gene expression systems for plants. In *Plant Developmental Biology* (pp. 65-75). Humana Press, Totowa, NJ.

10. Boron, A. K., Van Loock, B., Suslov, D., Markakis, M. N., Verbelen, J. P., & Vissenberg, K. (2014). Over-expression of AtEXLA2 alters etiolated arabidopsis hypocotyl growth. *Annals of botany*, 115(1), 67-80.
11. Carere, C. R., Sparling, R., Cicek, N., & Levin, D. B. (2008). Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International journal of molecular sciences*, 9(7), 1342-1360.
12. Capolupo, L., & Faraco, V. (2016). Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(22), 9451-9467.
13. Carriquiry, M. A., Du, X., & Timilsina, G. R. (2011). Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy*, 39(7), 4222-4234.
14. Chauvet, M., & González, R. L. (2008). Biocombustibles y cultivos biofarmacéuticos: ¿oportunidades o amenazas?. *El Cotidiano*, 23(147).
15. Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 16(6), 735-743.
16. Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current opinion in plant biology*, 25, 162-172.
17. Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321.
18. Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
19. Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology*, 133(2), 462–469. doi:10.1104/pp.103.027979
20. Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 1(1), 36.
21. de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H., & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of biotechnology*, 236, 110-119.

22. Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J. G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable energy*, *69*, 114-122.
23. Duwe, A., Tippkötter, N., & Ulber, R. (2017). Lignocellulose-Biorefinery: Ethanol-Focused.
24. Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, *45*(4), 616-629.
25. Furtado, A., Lupoi, J. S., Hoang, N. V., Healey, A., Singh, S., Simmons, B. A., & Henry, R. J. (2014). Modifying plants for biofuel and biomaterial production. *Plant biotechnology journal*, *12*(9), 1246-1258.
26. Georgelis, N., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2015). Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(9), 3807-3823.
27. Goh, H.H., Sloan, J., Dorca-Fornell, C., Fleming, A. (2012) Inducible repression of multiple expansin genes leads to growth suppression during leaf development. *Plant Physiol.* *159*, 1759–177.
28. Guillemaut, P., & Maréchal-Drouard, L. (1992). Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant molecular biology reporter*, *10*(1), 60-65.
29. Guo, H., Chang, Y., & Lee, D. J. (2017). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. *Bioresource technology*.
30. Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., ... & Ezeji, T. (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends in biochemical sciences*, *41*(7), 633-645.
31. Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods*, *2*(1), 19.
32. Ivakov, A., & Persson, S. (2012). Plant cell walls. *eLS*.
33. Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, *65*, 756-769.

34. Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, *199*, 103-112.
35. Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for biofuels*, *6*(1), 16.
36. Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2016). A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource technology*, *200*, 1008-1018.
37. Kim, D. (2018). Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules*, *23*(2), 309.
38. Kim, I. J., Ko, H. J., Kim, T. W., Nam, K. H., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2013). Binding characteristics of a bacterial expansin (BsEXLX1) for various types of pretreated lignocellulose. *Applied microbiology and biotechnology*, *97*(12), 5381-5388.
39. Kim, E. S., Lee, H. J., Bang, W. G., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2009). Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, *102*(5), 1342-1353.
40. Lee, R. A., & Lavoie, J. M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, *3*(2), 6-11.
41. Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology*, *165*, 3-8.
42. Li, Q., Song, J., Peng, S., Wang, J. P., Qu, G. Z., Sederoff, R. R., & Chiang, V. L. (2014). Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. *Plant biotechnology journal*, *12*(9), 1174-1192.
43. McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, *4*(11), 1425-1433.

44. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
45. Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550.
46. Moraïs, S., Morag, E., Barak, Y., Goldman, D., Hadar, Y., Lamed, R., ... & Bayer, E. A. (2012). Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. *MBio*, 3(6), e00508-12.
47. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686
48. Parr, R. D., & Ball, J. M. (2003). New donor vector for generation of histidine-tagged fusion proteins using the Gateway Cloning System. *Plasmid*, 49(2), 179-183.
49. Peña-Castro, J. M., del Moral, S., Núñez-López, L., Barrera-Figueroa, B. E., & Amaya-Delgado, L. (2017). Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. *BioMed Research International*, 2017, 7824076.
50. Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal*, 282(7), 1190-1213.
51. Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología aplicada*, 28(4), 205-215.
52. Quiroz-Castañeda, R. E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L. I., Segovia, L., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial cell factories*, 10(1), 8.
53. Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*, 199, 83-91.

54. Raman, S., Mohr, A., Helliwell, R., Ribeiro, B., Shortall, O., Smith, R., & Millar, K. (2015). Integrating social and value dimensions into sustainability assessment of lignocellulosic biofuels. *biomass and bioenergy*, 82, 49-62.
55. Ramos, J. L., & Duque, E. (2019). Twenty-first-century chemical odyssey: fuels versus commodities and cell factories versus chemical plants. *Microbial biotechnology*.
56. Robak, K., & Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 174.
57. Ruiz, H. A., Martínez, A., & Vermerris, W. (2016). Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in Mexico. *BioEnergy Research*, 9(4), 981-984.
58. Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353.
59. Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N., & Bastianoni, S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 221-227.
60. Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyysönen, E., ... & Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *The FEBS Journal*, 269(17), 4202-4211.
61. Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, 6(12), 242.
62. Santos, C. A., Ferreira-Filho, J. A., O'Donovan, A., Gupta, V. K., Tuohy, M. G., & Souza, A. P. (2017). Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. *Microbial cell factories*, 16(1), 83.
63. Saritha, M., & Arora, A. (2012). Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. *Indian journal of microbiology*, 52(2), 122-130.

64. Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J. D., ... & Imamoto, F. (2004). Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *Journal of biotechnology*, 107(3), 233-243.
65. Schlücking, K., Edel, K. H., Köster, P., Drerup, M. M., Eckert, C., Steinhorst, L., ... & Kudla, J. (2013). A new β -estradiol-inducible vector set that facilitates easy construction and efficient expression of transgenes reveals CBL3-dependent cytoplasm to tonoplast translocation of CIPK5. *Molecular plant*, 6(6), 1814-1829.
66. Seki, Y., Kikuchi, Y., Yoshimoto, R., Aburai, K., Kanai, Y., Ruike, T., ... & Sakaguchi, K. (2015). Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. *Planta*, 241(1), 83-93.
67. Sigoillot JC., Faulds C. (2016) Second Generation Bioethanol. In: Soccol C., Brar S., Faulds C., Ramos L. (eds) Green Fuels Technology. Green Energy and Technology. Springer, Cham
68. Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource technology*, 199, 76-82.
69. Smith, B. G., & Melton, L. D. (2012). Plant cell wall polysaccharides. *Food Carbohydrate Chemistry*, 135-146.
70. Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 199, 49-58.
71. Suzuki, H., Vuong, T. V., Gong, Y., Chan, K., Ho, C. Y., Master, E. R., & Kondo, A. (2014). Sequence diversity and gene expression analyses of expansin-related proteins in the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete carnosae*. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 115-123.
72. Tan, H.-T., Corbin, K. R., & Fincher, G. B. (2016). Emerging Technologies for the Production of Renewable Liquid Transport Fuels from Biomass Sources Enriched in Plant Cell Walls. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1854.

73. Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2008). Role of energy policy in renewable energy accomplishment: the case of second-generation bioethanol. *Energy policy*, 36(9), 3360-3365.
74. Timilsina, G. R. (2014). Biofuels in the long-run global energy supply mix for transportation. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 372(2006), 20120323.
75. van Eijck, J., Batidzirai, B., & Faaij, A. (2014). Current and future economic performance of first and second generation biofuels in developing countries. *Applied Energy*, 135, 115-141.
76. Wi, S. G., Choi, I. S., Kim, K. H., Kim, H. M., & Bae, H. J. (2013). Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 166.
77. Walhout, A. J., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S., & Vidal, M. (2000). [34] GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. In *Methods in enzymology* (Vol. 328, pp. 575-IN7). Academic Press.
78. Xu, R., & Li, Q. Q. (2008). Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway(R) TOPO vector system. *Plant methods*, 4, 4.
79. Yactayo-Chang, J. P., Yoon, S., Teoh, K. T., Hood, N. C., Lorence, A., & Hood, E. E. (2016). Failure to over-express expansin in multiple heterologous systems. *New Negatives in Plant Science*, 3, 10-18.
80. Yoon, S., Devaiah, S. P., Choi, S. E., Bray, J., Love, R., Lane, J., ... & Hood, E. E. (2016). Over-expression of the cucumber expansin gene (Cs-EXPA1) in transgenic maize seed for cellulose deconstruction. *Transgenic research*, 25(2), 173-186.
81. Ziemienowicz, A. (2014). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95-102.

82. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641.
83. Zuo, J., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, 24(2), 265-273.
84. Tapia I. (2014). Expresión de la proteína LOOS1 del hongo *Bjerkandera adusta* en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría. CEIB-UAEM. Morelos, México.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 Mayo 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor principal)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Lidia González Morales
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Ramón Alberto Batista García

Tesis: "**Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado por el promotor inducible a estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana***"

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA MAGDALENA URZUA ABAD**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 29-Mayo-2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor principal)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Lidia González Morales
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Ramón Alberto Batista García

Tesis: **"Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado por el promotor inducible a estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana*"**

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA MAGDALENA URZUA ABAD**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 24 - Mayo - 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor principal)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Lidia González Morales
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Ramón Alberto Batista García

Tesis: "**Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado por el promotor inducible a estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana***"

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA MAGDALENA URZUA ABAD**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. VERONICA LIRA RUAN



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 29 de mayo de 2019.

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor principal)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Lidia González Morales
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Ramón Alberto Batista García

Tesis: **"Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado por el promotor inducible a estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana*"**

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA MAGDALENA URZUA ABAD**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. LIDIA GONZALEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21 Mayo 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor principal)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Lidia González Morales
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Ramón Alberto Batista García

Tesis: **"Expresión del gen *LOOS1* de *Bjerkandera adusta* regulado por el promotor inducible a estrógenos OlexA-46 en *Arabidopsis thaliana*"**

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA MAGDALENA URZUA ABAD**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA