

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Caracterización de los genes que codifican para las enzimas
involucradas en la bioacumulación de β – caroteno en
Dunaliella salina y *Dunaliella bardawil*.**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Fabián Siqueiros Vargas

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por

Fabián Siqueiros Vargas

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto

Director de tesis

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Dr. Israel Marck Martínez Pérez



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Fabián Siqueiros Vargas © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Fabián Siqueiros Vargas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Caracterización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la bioacumulación de β – caroteno en *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina*.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

Las microalgas halotolerantes *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina*, son capaces de bioacumular alrededor del 10% en peso seco de β -caroteno, con respecto a su volumen celular. El β -caroteno, es un pigmento altamente demandado en el área alimenticia y aún más en el sector farmacéutico, donde ha surgido un gran interés por las propiedades anticancerígenas del β -caroteno natural. El control de su producción es por tanto, muy importante. El β -caroteno presenta múltiples estereoisómeros, siendo de especial interés, 9-*cis*. Mientras que la síntesis orgánica es capaz de producir únicamente el isómero, "all"-*trans*, el isómero 9-*cis*, solo puede obtenerse mediante biosíntesis. Sin embargo, en el sector terapéutico, proporciones de ambas especies resultan indispensables. Debido a la alta demanda de carotenoides de origen natural en el mercado internacional, actualmente existe una atención muy pronunciada hacia la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la carotenogénesis de *Dunaliella*, con el fin de incrementar la producción masiva de β -caroteno. Aunque hay muchos estudios concernientes a la bioacumulación de β -caroteno, los conocimientos sobre los genes involucrados en la biosíntesis de esta molécula y su regulación en *Dunaliella*, son mínimos. En este estudio, se realizó un análisis de los genes *fitoeno sintasa (psy)*, *fitoeno desaturasa (pds)*, *zeta caroteno desaturasa (zds)* y *β -licopeno ciclasa (lcy- β)* para las microalgas certificadas *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*. Así, como la caracterización parcial de la región promotora del gen *psy*, en *D. salina*.

Palabras clave: β -caroteno, *Dunaliella*, *fitoeno*, *licopeno- β -ciclasa*

Abstract of the thesis presented by **Fabian Siqueiros Vargas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life's Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Characterization of the enzymes coding genes involved in β -carotene bioaccumulation on *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil*

Abstract approved by:

Doc. Jorge Olmos Soto
Thesis Director

Dunaliella bardawil and *Dunaliella salina*, are halotolerant microalgae with the capacity of bioaccumulate up to 10% dry weight of β -carotene in regards to its cellular volume. β -carotene is a highly demanded pigment at food area and even more valued in the pharmaceutical sector, where big interest has emerged because of the natural β -carotene and his anticarcinogenic properties. Thus, the control of its production is very important. β -carotene presents multiple stereoisomers being of special interest 9-*cis*. Meanwhile organic synthesis is only capable of produce an all-*trans* isomer, 9-*cis* can only be obtained by meanings of biosynthesis. However, portions of both species are indispensable in the pharmaceutical sector. Due the high demand of natural carotenoids in the international market, there's a very pronounced attention to elucidate the molecular mechanisms involved in *Dunaliella* carotenogenesis, with the purpose of increase the β -carotene massive production. Although there's a lot of β -carotene bioaccumulation research, the knowledge of the genes involved in the biosynthesis of this molecule and its regulation in *Dunaliella*, are thin. In this study, an analysis of the *phytoene synthase (psy)*, *phytoene desaturase (pds)*, *zeta carotene desaturase (zds)*, *lycopene- β -cyclase (lyc- β)* genes is performed on certified microalgae strains *D. bardawil* and *D. salina*. As well as partial characterization of the promoter region on the *D. salina psy* gen.

Keywords: β -carotene, *Dunaliella*, *phytoene*, *lycopene- β -cyclase*.

Dedicatoria

A mis padres, Mónica mi esposa y mis hijos Eric y Evan.

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Olmos Soto, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por brindarme su apoyo y asesoría.

Al Dr. José de Jesús Paniagua y al Dr. Israel Marck Martínez, por su apoyo con las retroalimentaciones durante mis avances de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante mi estancia en la Maestría de Ciencias de la Vida.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por permitirme formar parte de esta institución y el apoyo recibido al principio y final de mi estancia.

Al Consejo del Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida, por el apoyo brindado.

Al personal administrativo de CICESE, por la atención y servicios brindados.

A Rosalía Contreras y Edna Sánchez, que siempre me apoyaron con cuestiones técnicas en protocolos y equipos de laboratorio.

A mis amigos Ana, Joel y Manuel, que siempre estuvieron apoyándome cuando lo ocupaba, en lo que fuese.

A mis compañeros de generación que hicieron de esta estadía, una experiencia agradable.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez, por su apoyo incondicional dentro y fuera de lo académico.

A mis padres, que si no fuera por ellos, su amor, consejos y regaños, yo no estaría aquí.

A mi esposa Mónica y mis hijos Eric y Evan, por ser la razón de mi felicidad día a día y que sin ellos nada de esto valdría la pena.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 <i>Dunaliella</i> como organismo modelo.....	1
1.1.2 El β -caroteno y sus aplicaciones.....	2
1.1.3 La carotenogénesis y su regulación molecular.....	3
1.2 Justificación.....	7
1.3 Objetivos.....	7
1.3.1 Objetivo general	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Diseño de oligonucleótidos para los genes carotenogénicos y las regiones promotoras de <i>psy</i> y <i>Db847lycβ</i>	9
2.1.1 Oligonucleótidos de los genes carotenogénicos.....	9
2.1.2 Oligonucleótidos de la región promotora del gen <i>psy</i>	9
2.1.3 Oligonucleótidos de la región promotora del gen <i>lyc-β</i>	10
2.2 Cepas y condiciones de cultivo.....	10
2.3 Extracción de ADN cromosomal, de los cultivos de <i>Dunaliella</i>	10
2.4 Certificación de las cepas <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	11
2.5 Aislamiento de los genes <i>psy</i> , <i>pds</i> , <i>zds</i> y <i>lyc-β</i> , en <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	11
2.6 Obtención de la región reguladora de los genes <i>psy</i> y <i>lyc-β</i> , en cepas certificadas de <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	13
2.6.1 Amplificación del promotor del gen <i>psy</i> , utilizando decaoligonucleótidos.....	13
2.6.2 Amplificación del promotor <i>Db847psy</i> , en cepas certificadas de <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	14
2.6.3 Amplificación del promotor <i>Db847lyc-β</i> , en cepas certificadas de <i>D. salina</i> y <i>D.</i>	

	<i>bardawil</i>	14
2.7	Purificación de productos de PCR, mediante fenol-cloroformo.....	14
2.8	Secuenciación de productos de PCR.....	15
2.9	Análisis bioinformático de los productos secuenciados.....	15
Capítulo 3. Resultados		
3.1	Oligonucleótidos experimentales.....	16
	3.1.1 Oligonucleótidos de los genes <i>psy</i> , <i>pds</i> , <i>zds</i> y <i>lyc-β</i>	16
	3.1.2 Oligonucleótidos para la amplificación de la región reguladora, en los genes <i>psy</i> y <i>lyc-β</i>	17
3.2	Extracción de ADN cromosomal, de <i>D. bardawil</i> y <i>Dunaliella salina</i>	17
3.3	Certificación de <i>D. bardawil</i> y <i>Dunaliella salina</i>	18
3.4	Amplificación del gen <i>psy</i>	19
3.5	Amplificación del gen <i>pds</i>	19
3.6	Amplificación del gen <i>zds</i>	20
3.7	Amplificación del gen <i>lyc-β</i>	21
3.8	Región promotora de <i>psy</i> y <i>Db847lyc-β</i>	22
	3.8.1 Amplificación del promotor del gen <i>psy</i> , en cepas certificadas de <i>D. bardawil</i> y <i>Dunaliella salina</i>	22
	3.8.2 Productos del promotor <i>Db847psy</i> , en cepas certificadas de <i>D. bardawil</i> y <i>Dunaliella salina</i>	23
	3.8.3 Productos del promotor <i>Db847lyc-β</i> , en cepas certificadas de <i>D. bardawil</i> y <i>Dunaliella salina</i>	23
3.9	Purificación de los genes <i>lyc-β</i> , <i>psy</i> y su región promotora.....	23
3.10	Secuenciación de los genes <i>lyc-β</i> , <i>psy</i> y su región reguladora.....	24
3.11	Análisis bioinformático de los genes <i>psy</i> y <i>lyc-β</i>	24
	3.11.1 Revisión de las secuencias del gen <i>psy</i>	24
	3.11.2 Revisión de las secuencias del gen <i>lyc-β</i>	25
3.12	Evaluación de potenciales elementos reguladores dentro del promotor del gen <i>psy</i> , en la cepa certificada de <i>D. salina</i>	25
Capítulo 4. Discusión		
4.1	Oligonucleótidos conservados y específicos.....	27
4.2	Cultivo de <i>Dunaliella</i> y extracción de ADN cromosomal.....	27
4.3	La certificación.....	28
4.4	La presencia del gen <i>psy</i>	29

4.5	Gen <i>pds</i>	30
4.6	Gen <i>zds</i>	31
4.7	Gen <i>lyc-β</i>	32
4.8	Análisis bioinformático de los productos <i>DbpsyCertificada</i> , <i>DspsyCertificada</i> , y <i>Ds lyc-β Certificada</i>	33
4.9	La región reguladora.....	33
 Capítulo 5. Conclusiones		
5.1.	Conclusiones.....	36
 Literatura citada		
 Anexos		
		43

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estereoisómeros del β -caroteno.....	3
2	Diagrama de la carotenogénesis.....	4
3	ADN cromosomal de <i>Dunaliella</i>	18
4	Certificación de <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	18
5	Productos del gen <i>psy</i> , en <i>D. salina</i> y <i>D. bardawil</i>	19
6	Productos del gen <i>pds</i> , en <i>D. salina</i> y <i>D. bardawil</i>	20
7	Productos del gen <i>zds</i> , en <i>D. salina</i> y <i>D. bardawil</i>	21
8	Productos del gen <i>lyc-β</i> , en <i>D. salina</i> y <i>D. bardawil</i>	21
9	Productos de la región promotora del gen <i>psy</i> , en <i>D. salina</i> y <i>D. bardawil</i>	22
10	Fenograma del gen <i>psy</i>	25
11	Diagrama que ejemplifica el gen de <i>psy</i> en <i>D. bardawil</i> y <i>D. salina</i>	30
12	Diagrama de la región promotora de <i>Dspsy</i> Certificada.....	35

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones del termociclador en PCR, para los genes carotenogénicos.....	12
2	Condiciones del termociclador en PCR, para la región promotora del gen <i>psy</i>	13
3	Condiciones del termociclador en PCR, para la región promotora de <i>Db847psy</i>	14
4	Condiciones del termociclador en PCR, para la región promotora de <i>Db847lyc-β</i>	15
5	Oligonucleótidos conservados de los genes <i>psy</i> , <i>pds</i> , <i>zds</i> y <i>lyc-β</i>	16
6	Tamaños de productos de PCR teóricos para el gen <i>psy</i>	16
7	Tamaño de producto de PCR teórico para el gen <i>lyc-β</i>	17
8	Oligonucleótidos para la amplificación de la región reguladora en <i>psy</i> y <i>lyc-β</i>	17
9	Resultados de purificación de ADN.....	23
10	Resultados de secuenciación.....	24
11	Elementos- <i>cis</i>	26
12	Alineamiento del gen <i>psy</i> , a través del programa MEGA7.....	43
13	Alineamiento del gen <i>pds</i> , a través del programa MEGA7.....	44
14	Alineamiento del gen <i>zds</i> , a través del programa MEGA7.....	45
15	Alineamiento del gen <i>lyc-β</i> , a través del programa MEGA7.....	46

Capítulo 1 Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Dunaliella* como organismo modelo.

Dunaliella, género de microalgas descrito inicialmente por Dunal (1838) en la costa Mediterránea de Francia, el cual se ha reportado como algas verdes unicelulares, que carecen de una pared celular rígida, son halofílicas y capaces de crecer en un rango de salinidad (NaCl) de 0.05–5.0M, donde el glicerol, es el metabolito osmótico que permite balancear las diversas salinidades en este tipo de células (Ben-Amotz y Avron, 1981). Se han reportado especies capaces de bioacumular grandes cantidades del pigmento anaranjado-rojizo β -caroteno, donde destacan *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina* con aproximadamente un 10% en peso seco con respecto a su volumen celular, cuando estas son expuestas a intensidades lumínicas elevadas, altas concentraciones salinas y condiciones limitadas de oxígeno y nitrógeno (Borowitzka, 1981; Ben-Amotz *et al.* 1982; Ye *et al.* 2008). En *D. bardawil* y *D. salina*, el β -caroteno es acumulado en forma de gotas aceitosas a través de proteínas globulares, principalmente los estereoisómeros 9-*cis* y “*all*”-*trans*, que se encuentran localizados en los compartimientos intertilacoidales dentro del cloroplasto (Ben-Amotz *et al.* 1982). Este compuesto le da una apariencia rojiza intensa a la célula, en lugar del usual verde que se produce por las clorofilas (Sadeq, 2012).

A través del tiempo, comenzaron a surgir un gran número de algas del género *Dunaliella* que han sido descritas, muchas sin un nombre particular y como consecuencia, han empezado a surgir nombres innecesarios para las especies de este género (Borowitzka y Borowitzka, 1988). A pesar de que *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*, han llegado a ser las especies más importantes en la producción natural de β -caroteno (Del Campo *et al.*, 2007), también caen en dicha problemática. A su vez y como resultado de este conflicto, se ha prestado a que las secuencias con respecto a *Dunaliella*, que los investigadores suben a las distintas bases de datos, tales como NCBI carezcan de fiabilidad.

En un trabajo publicado por Olmos *et al.* (2000), se provee una metodología para la rápida identificación y certificación de cepas de *Dunaliella*, la cual permite discernir entre especie mediante la presencia, tamaño y secuencia de los intrones que se encuentran presentes en el ADN 18S ribosomal.

Debido a la valiosa capacidad de acumulación masiva de β -caroteno que presenta *Dunaliella* (Borowitzka y Borowitzka, 1988), este se ha convertido en uno de los mejores modelos para tratar de entender la regulación de la carotenogénesis, lo cual llevara a un mayor beneficio en el sector comercial.

1.1.2 El β -caroteno y sus aplicaciones.

Los carotenoides son uno de los grupos más grandes de compuestos naturales y tienen una variedad de funciones importantes en el metabolismo primario de plantas y algas (Stahl and Sies 2005; Martin Lohr *et al.*, 2011). Esta familia ha ido cobrando fuerza poco a poco en la industria biotecnológica, siendo utilizados como colorantes para el alimento humano y suplementos nutricionales, aditivos alimenticios para mejorar la pigmentación de huevos y peces, como productos farmacéuticos y para la agricultura e industria cosmética (Bramley, 2003).

Las moléculas de β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina son los carotenoides que han sido mayoritariamente estudiados en el área de salud humana. Se pueden encontrar en múltiples frutas y verduras (Johnson *et al.* 2002).

Desde hace varios años se han considerado de gran interés los carotenoides en dieta, debido a su actividad como provitamina A (Olson y Hayaishi, 1965). Más aun, se ha sugerido que los carotenoides poseen no solo su eficacia vitamínica, si no también acciones biológicas diversas, inhibición de la mutagénesis, reducción del daño nuclear inducido, potenciamiento del sistema inmune, etc. (Bendich y Olson, 1989). Sin embargo, los animales son incapaces de sintetizar β -caroteno de *novo* y por tanto, la única forma en que pueden obtenerlo es mediante su ingesta (Bramley, 2003). Estudios en animales han demostrado que la molécula de β -caroteno, presenta propiedades anticancerígenas (Jayappriyana *et al.* 2013; Raja *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2012). Aunque, los reportes en humanos demuestran que el efecto no es tan eficaz y que inclusive potencia la proliferación de la enfermedad (Druesne-Pecollo *et al.* 2010; Palozza *et al.* 2006).

Olmos *et al.* (2015), proponé que una concentración y relación adecuada entre los isómeros 9-*cis*- β -caroteno (9C β C) y "all"-*trans*- β -caroteno (AT β C), podría prevenir o incluso curar el cáncer en humanos.

Hasta la fecha, no ha sido posible sintetizar el isómero 9C β C, únicamente el AT β C (Fig. 1), razón por la cual este último es el que se encuentra dominando el mercado de β -caroteno en la actualidad. Se ha detectado con anterioridad que *Dunaliella bardawil*, es capaz de producir cantidades equivalentes entre ambos isómeros, 41% 9C β C y 42% AT β C (Ben-Amotz *et al.*1982). Mientras que *Dunaliella salina*, es capaz de bioacumular 47% de 9C β C y 53% de AT β C (Ben-Amotz y Levy, 1996). De ahí, que cada vez sea más urgente elucidar el mecanismo molecular de la carotenogénesis.

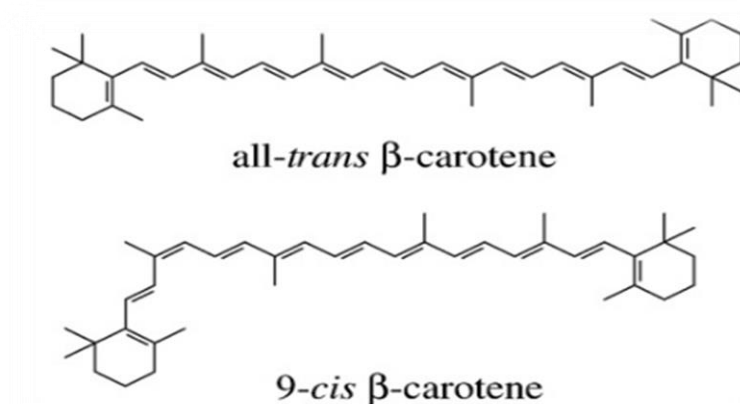


Figura 1. Estereoisómeros del β -caroteno. Modelo que muestra dos de los isómeros del beta caroteno, “all”-trans y 9-cis (imagen diseñada por el Dr. Ye Zhi Wei).

1.1.3 La carotenogénesis y su regulación molecular.

El isopentenil difosfato (IPP) cuyo carbono número 5 es la unidad del isopreno activa en los carotenoides, ha sido considerado como el precursor universal de la biosíntesis del C20 geranylgeranyl difosfato (GGPP) y consecuentemente de los carotenoides y el β -caroteno en plantas y algas (Rohmer *et al.*, 1993).

Durante mucho tiempo, la ruta acetato-mevalonato (MVA), fue considerada como la única que realizaba las modificaciones correspondientes a GGPP, para producir carotenoides en los cloroplastos de las plantas (Lichtenthaler, 1999). William *et al.*, (2009) comprobó la utilización de una vía independiente de MVA en *D. salina*, metileritritol fosfato (MEP) y sugiere la pérdida de los genes que permitían el uso de la ruta MVA quedando funcional de manera única MEP, en *D. salina*.

Para la producción del β -caroteno (Fig. 2), son necesarios un paso de condensación, cuatro desaturaciones y dos ciclaciones en la molécula de licopeno (Takaichi, 2011).

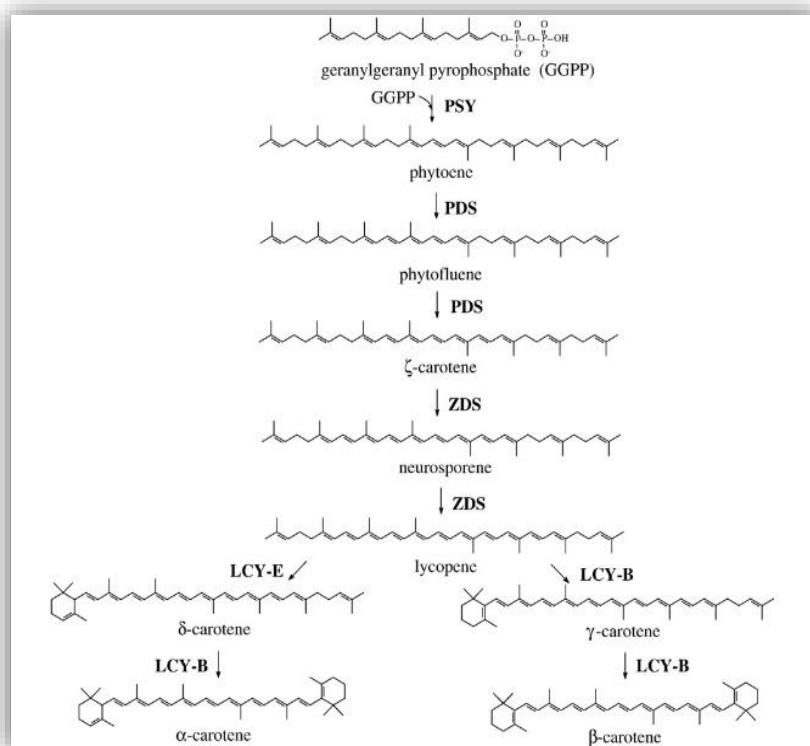


Figura 2. Diagrama de una sección de la carotenogénesis modificado. Se muestra la serie de reacciones que se deben llevar a cabo a partir del geranylgeranyl pirofosfato, incluyendo las enzimas necesarias según la dirección de la reacción, hasta culminar en alguno de los carotenos presentes en la figura (imagen diseñada por el Dr. Ye Zhi Wei).

La fitoeno sintasa (Psy), es la enzima que cataliza la primera reacción de la carotenogénesis condensando dos moléculas de GGPP, para convertirlas en fitoeno, lo cual la hace una proteína clave en el flujo de carbono hacia la síntesis carotenogénica (Shewmaker *et al.*, 1999). Su papel como primer participante, la vuelve una proteína blanco tentativa. Más aun, el hecho de que esta enzima comience la ruta carotenogénica, pero no necesariamente termine en β-caroteno, la vuelve un precursor universal no solo entre microalgas, sino también en plantas superiores, algunos hongos y bacterias (Welsch *et al.*, 2000; Sandmann *et al.*, 2002). Como resultado de alineamientos entre estos distintos organismos, se obtuvo una secuencia de *psy* con un tamaño de 2982pb que contiene cinco exones y cuatro intrones en *D. salina* (Yan *et al.* 2005).

Hace algunos años, se obtuvo la secuencia de la región reguladora en la cepa *D. bardawil* 847, la cual presenta un tamaño de 3363 pbs (Lao *et al.*, 2011). Posee algunos elementos cis conservados, como lo son la caja GATA, CGCG, cajas G reguladoras de la luz, GT1GMSCAM4, que es inducida por NaCl, entre otras. Haciendo uso del conocimiento del promotor, se llevaron a cabo experimentos con esta secuencia,

donde se encontró que su expresión relativa muestra niveles elevados cuando la célula se ve expuesta a concentraciones de sal de 3.0 - 4.5M (Lao *et al.*, 2011). Desafortunadamente, la secuencia no ha sido depositada en las bases de datos, para su validación en cepas certificadas y posteriores experimentos.

La fitoeno desaturasa (Pds), por otro lado, lleva a cabo la primera desaturación del fitoeno, y lo convierte en fitoflueno, el cual sufre una segunda desaturación de la cual es producido el ζ -caroteno. Se ha reportado que dicha proteína en *D. salina*, es realmente parecida a la pds de las plantas superiores y cianobacterias, en comparación con los hongos y bacterias (Zhu *et al.* 2005).

Chen *et al.*, 2016, a través de la secuencia de la *pds* (cDNA) de *D. bardawil* (No. de acceso, Y14807.1) depositada en NCBI, para llevar a cabo la caracterización tanto del gen *pds*, como del promotor en *D. bardawil* 847. Los resultados obtenidos, fueron un gen de 8113 pbs, junto con una región reguladora de 3010 pbs. Mientras que, en *D. salina*, dicho gen se reporta con un tamaño mayor a las 6000 pbs (Gohua *et al.*, 2008). No obstante, el gen *pds*, en *D. salina*, en la actualidad aún no ha sido reportado por completo.

La región reguladora reportada en *D. bardawil* 847, presenta algunos elementos reguladores característicos como la caja GATA (Gilmartin P. *et al.*, 1990), GT1CONSENSUS (Terzaghi W. *et al.*, 1995), MYCONSENSUSAT (Chinnusamy V. *et al.*, 2003 y 2004), etc. Sin embargo, a diferencia del gen *psy*, la expresión de este no se ve regulada por concentraciones elevadas de sal (1.0 - 4.5M), sino que muestra una expresión regular y casi idéntica en todos los niveles de sal (Chen *et al.*, 2016), no hay datos que mencionen la utilización de una concentración 0M.

Una segunda serie de desaturaciones es provocada por la enzima ζ -caroteno desaturasa (Zds), lo cual generara la producción de neurosporeno en primera instancia y de manera subsecuente, licopeno. Estudios realizados por Ye *et al.* (2010 y 2011), reportan la caracterización del cDNA de *zds*, así como su tamaño, 2209 pbs y 2178 pbs para *D. bardawil* 847 y *D. salina* UTEX LB200, respectivamente.

Otro estudio dirigido por Lao *et al.*, (2014), utilizando la misma cepa antes mencionada, comenta que la secuencia completa de este gen en *D. baradwil* 847, es de 6879 pbs y presenta 12 exones. Más aun, se encontró que la región reguladora del gen *zds*, posee un tamaño de 2899 pbs y comparte algunos elementos reguladores con el gen *psy* y *lyc- β* , tales como GATA, GT1GMSCAM4 (Park H. *et al.*, 2004), etc. Sin embargo, uno de los elementos *cis*, que presenta dicho promotor es GBF5BS (Satoh *et al.*, 2002, 2004), el cual responde a entornos hiposomolares (Lao *et al.*, 2014). Dicho elemento, se encuentra

ausente en los genes de *psy*, *pds* y *lyc-β*, donde el primero y último presentan GT1GMSCAM4, como caja reguladora de sal, mientras que en *pds*, no se ha reportado y/o encontrado algún elemento que responda a ambientes salinos.

Experimentos conducidos por el mismo grupo, demostraron que a concentraciones bajas de sal (0-1M), los niveles de expresión de Zds, se mostraban incrementados en contraste con concentraciones hiperosmolares (2.0 - 4.5M). Desafortunadamente, solo la secuencia de *D. salina* UTEX LB200 ha sido publicada en la base de datos, mientras que la secuencia del gen *zds*, así como su promotor en *D. bardawil* 847 no se encuentran reportadas en las bases de datos conocidas.

Finalmente, el último paso de la biosíntesis del β-caroteno es protagonizado por la enzima licopeno-β-ciclasa (Lcy-β), la cual se encargará de ciclar el licopeno en cada uno de sus extremos, dando como producto final la molécula de β-caroteno (Sandmann 2001). Esta proteína, en comparación con las mencionadas anteriormente, se ha sugerido que en *D. salina* CCAP 19/30 (EU327877.1), cuenta con un DNA genómico de un tamaño aún más grande (9008pb), esto debido a la gran cantidad y longitud de sus intrones (Ramos *et al.* 2008). En *D. bardawil* 847, recientemente se ha reportado que el gen posee un tamaño equiparable al de *D. salina*, conteniendo una cantidad de exones e intrones (11 y 10, respectivamente) idéntica. Sin embargo, la secuencia de la primera no ha sido depositada en la base de datos, únicamente el cDNA que consta de 1794 pbs (Liang *et al.*, 2016).

La secuencia del promotor del gen *lyc-β* en *D. bardawil* 847 (KX218393.1), consta de un tamaño de 2621 pbs. Esta región presenta elementos conservados con las otras enzimas, como lo son GT1GMSCAM4, ASF1MOTIFCAMV, etc. GT1GMSCAM4, al igual que en *psy*, se ve fuertemente regulado por concentraciones elevadas de salinidad (3.0 - 4.5M), en el gen de *lyc-β* (Liang *et al.*, 2016).

Este tipo de evidencia, muestra de manera aparente que la carotenogénesis tanto al principio como al final, es regulada por entornos hipersalinos. En el caso particular del gen *zds*, hay influencia por ambientes hipoosmóticos (Lao *et al.*, 2014). Este factor salino, se ha convertido ya en un elemento clave en la ruta molecular. Sin embargo, se desconoce aún la forma en que se ve regulado el gen *pds*.

Se cree que todas estas enzimas funcionan en conjunto, en una serie de respuestas al estrés oxidativo, o generación de agentes reactivos de oxígeno (ROS), que ocurren comúnmente en un ambiente estresante (Lesser, 2006). Esto se debe a que los organismos fotosintéticos, tales como las plantas y algas, poseen una concentración de oxígeno muy alta, como respuesta a la constante fotosíntesis que éstas llevan a

cabo durante sus ciclos de energía (Okamoto *et al.*, 2001). Como es de esperar, *Dunaliella* no es la excepción a la regla. Los carotenoides bioacumulados se concentran en los tejidos verdes, en contra del estrés oxidativo y condiciones adversas (Bouvier *et al.*, 1998).

Shaish *et al.*, (1993), realizó un estudio para poder descifrar la relación íntima entre el β -caroteno y la acumulación de ROS en *Dunaliella*. Donde el resultado fue una acumulación del isoprenoide cuando este inhibía parcialmente la evolución del oxígeno fotosintético a través de una transferencia de irradiancia baja, a una alta, sugiriéndose que los ROS tienen un papel muy importante por no decir crítico, en disparar la respuesta de la bioacumulación masiva del β -caroteno.

Bouvier *et al.*, (1998), demostró que los ROS inducen una respuesta sorprendente en la expresión de algunos genes carotenogénicos en *Capsicum annum*. Este sugiere que la ruta carotenogénica en *Dunaliella*, está ampliamente relacionada con genes que son activados en respuesta a ROS.

Los estudios concernientes a la regulación de la carotenogénesis en *Dunaliella*, son insuficientes en la actualidad, para lograr un control completo sobre la bioproducción de β -caroteno. Más aun, todos los estudios mencionados anteriormente, carecen de un método de certificación apropiado, lo cual podría ocasionar pérdidas importantes de tiempo, esfuerzo, y dinero en un futuro.

1.2 Justificación.

El β -caroteno natural producido por especies de *Dunaliella*, es altamente cotizado en el área comercial e industrial, debido a su capacidad de ser utilizada como cosmético y nutraceutico. Mas aun, el β -caroteno natural presenta propiedades anticancerígenas con las cuales el β -caroteno sintético no cuenta por si solo. Por lo cual, conocer y caracterizar los genes involucrados en la bioacumulación de β -caroteno se ha vuelto muy necesario. Así como, estudios en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*, que permitan comprender el mecanismo de regulación resultan por tanto urgentes, para lograr un control completo sobre la producción de β -caroteno natural.

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo General:

Identificar y comparar los genes y promotores *psy*, *pds*, *zds* y *lcy-β*, en cepas certificadas de *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina*.

1.3.2 Objetivos Particulares:

- 1) Comparar las secuencias que codifican para las enzimas participantes en la síntesis de β-caroteno en microalgas y plantas, para identificar regiones conservadas.
- 2) Caracterizar y comparar los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lcy-β*, en cepas certificadas de *D. salina* y *D. bardawil*.
- 3) Estudiar la secuencia reguladora de los genes caracterizados, para tratar de entender los mecanismos moleculares involucrados en su expresión.

Capítulo 2 Materiales y métodos.

2.1 Diseño de oligonucleótidos para los genes carotenogénicos y las regiones promotoras de *psy* y *Db847lyc-β*.

2.1.1 Oligonucleótidos de los genes carotenogénicos.

A partir de las secuencias reportadas en NCBI para *D. salina* y *D. bardawil*, se realizaron alineamientos de nucleótidos a través de herramientas bioinformáticas (BLAST y MEGA 7), utilizando diversos organismos (microalgas y plantas) que presentan las enzimas requeridas en la ruta carotenogénica. Se utilizaron las regiones altamente conservadas de los genes, las cuales fueron ubicadas por medio de los alineamientos realizados a través de la subherramienta en el programa MEGA 7, Clustal W (<http://www.megasoftware.net/>). Para los genes *psy* y *lyc-β*, se trabajó sobre la secuencia de genes completos de *D. salina*, como referencia. Mientras que para los otros dos genes, se trabajó con DNAs complementarios (ADNc) correspondientes a *D. salina*, como referencia. Esto debido a que las secuencias de los genes completos de *D. salina* y/o *D. bardawil*, no han sido liberadas actualmente. Los alineamientos realizados para cada uno de los genes carotenogénicos, pueden encontrarse en la sección de “anexos”, de este documento.

2.1.2 Oligonucleótidos de la región promotora del gen *psy*.

Para la región reguladora de *psy*, se diseñó un decaoligonucleótido conservado en sentido “forward”, a partir de la secuencia promotora de *Db847lyc-β* (KX218393.1). Las secuencias nucleotídicas de *psy* de *D. salina*, *D. bardawil* 847 y *D. bardawil* UTEX 2538 (AY547325.1, EU328288.1, DQ057342.1, respectivamente), que están presentes en NCBI, fueron utilizadas para fabricar tres oligonucleótidos específicos en sentido inverso. A estos 4 oligonucleótidos, se les integró una secuencia de reconocimiento ubicada en su región 5'. Dichas secuencias, serán reconocidas por un par de oligonucleótidos diseñados con ese fin, “AndpFw” y “AndpRv”. Así mismo, con la finalidad de validar los resultados de la manera más adecuada, se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos por Lao *et al.*, (2011) para amplificar la región reguladora de *D. bardawil* 847, “Ptest for (Fw)” y “Psp3 (Rv)”.

Todos los oligonucleótidos mencionados en esta sección, se encuentran ubicados en la Tabla 8, de este documento.

2.1.3 Oligonucleótidos de la región promotora del gen *lyc-β*.

En base a la secuencia de región promotora del gen *lyc-β* para *D. bardawil* 847, depositada en la base de datos NCBI, se construyeron dos oligonucleótidos, uno al principio y uno en el final de dicha secuencia (Tabla 8).

2.2 Cepas y condiciones de cultivo.

Las células certificadas de *D. salina* y *D. bardawil*, se obtuvieron del laboratorio de microbiología molecular, departamento de biotecnología marina, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, B.C., México. Estas fueron cultivadas por 2 semanas en medio, 2x “Erdschreiber” (NaCl 1M), tal y como indica el banco de cepas UTEX (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=166>) y medio f/2 (NaCl 5M), descrito en el manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas (Paniagua *et al.*, 1989), hasta alcanzar una densidad celular de 1×10^5 Cel ml⁻¹, mediante conteo en cámara de “neubauer”.

2.3 Extracción de ADN cromosomal de los cultivos de *Dunaliella*.

Se realizó la extracción de ADN cromosomal de 9 tubos que contenían el pellet de cepas de *D. salina* y *D. bardawil* (3 tubos y 6 tubos, respectivamente) en fase exponencial tardía, bajo el siguiente protocolo: 1) Obtención del “pellet”. Centrifugación (12,000 r.p.m., 3 mins.) de 1.5 mL del cultivo de microalga; 2) Extracción de ADN. Se resuspendió el “pellet” en 567 µL de “buffer” TE, se adicionaron 5 µL de lizosima (incubación a 37 °C, 10 mins.), 10 µL de RNAsa (incubación a 37 °C, 20 mins.), 30 µL de SDS y 3 µL de proteinasa K (incubación a 37 °C, 1 hr.). Se agregaron 100 µL de NaCl 5M (se mezcló), 80 µL de CTAB/NaCl (se mezcló e incubó a 65 °C, 10 mins.); 3) Remoción de proteínas. Se adicionaron 700 µL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1), se mezcló y centrifugó (12,000 r.p.m., 5 mins.). Se recolectó el sobrenadante, y se agregó 700 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló y

centrifugó (12,000 r.p.m., 5 mins.). Se recolectó el sobrenadante, y se adicionó 360 µL de isopropanol, se mezcló y centrifugó (12,000 r.p.m., 10 mins.), descartando el sobrenadante; 4) Precipitación con Etanol. Se lavó el tubo que contenía ADN, agregando 1 mL de etanol al 70%, y centrifugando (12,000 r.p.m., 5mins.), hasta obtener un ADN transparente. Finalmente, se adicionó 100 µL de TE (filtrado por membrana de 2 µm), para resuspensión de la muestra. El ADN fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando una corriente de 10 mA por 15 mins., seguido por una intensidad de 20 mA por 30 mins, posteriormente teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) y observado con lámpara de UV.

2.4 Certificación de las cepas *D. bardawil* y *D. salina*.

Se realizó un protocolo estándar de PCR (Sambrook *et al.*, 1989), con una temperatura de alineamiento equivalente a 52 °C, haciendo uso de los oligonucleótidos universales MA1 (5' GTAGTCATATCGTTGTCTC 3') y MA2 (5' CTTCTGCAGGTCACC 3') para microalgas (Olmos *et al.*, 2000). De modo seguido, se llevó a cabo un segundo PCR bajo las mismas condiciones antes mencionadas, utilizando los oligonucleótidos específicos para *D. salina* y *D. bardawil*, DSs (5' GCAGGAGAGCTAATAGGA 3')-MA2 y DBs (5' GGGAGTCTTTTCCACCT 3')-MA2, respectivamente (Olmos *et al.*, 2002). Los productos de PCR fueron verificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando una corriente de 10 mA por 15 mins., seguido por una intensidad de 20 mA por 30 mins, posteriormente teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) y observado con lámpara de UV.

2.5 Aislamiento de los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lcy-β* de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se realizó una serie de PCRs con los distintos oligonucleótidos prediseñados. La temperatura media, se ajustó a necesidad utilizando como referencia, las temperaturas medias teóricas de cada pareja de oligonucleótidos (Tabla 5). Las condiciones generales de PCR fueron de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones del termociclador para los genes carotenogénicos. La siguiente tabla muestra las condiciones que se utilizaron para cada par de oligonucleótidos durante la amplificación de los genes carotenogénicos.

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	psyFw1, psyRv1
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	52 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	psyFw2, psyRv2
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	51 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	pdsFw, pdsRv, zdsFw1, zdsRv1
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	54 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	lycBFw, lycBRv
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	56 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	

Los productos de PCR fueron verificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando una corriente de 10 mA por 15 mins., seguido por una intensidad de 20 mA por 30 mins, posteriormente teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) y observado con lámpara de UV.

2.6 Obtención de la región reguladora de los genes *psy* y *lyc-β*, en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

2.6.1 Amplificación del promotor del gen *psy*, utilizando decaoligonucleótidos.

Se llevó a cabo en primera instancia un PCR de 5 ciclos que utilizó una primera serie de oligonucleótidos, PDspsyRv2 y PDb847psyRv2 para *D. bardawil* certificada y PDb2538psyRv2 para *D. salina* certificada, junto con el oligo-P (Fw), para ambas cepas. De manera seguida, se realizó un PCR anidado el cual empleó dos oligonucleótidos secundarios, los cuales son complementarios con los primeros AndpFw y AndpRv. A modo de referencia, se trabajó la primera serie de oligonucleótidos antes mencionados bajo una temperatura media de 65 °C, la cual se encuentra próxima a la temperatura media teórica, que comprende el decaoligonucleótido junto con la secuencia señal. Las distintas condiciones de PCR, y los oligonucleótidos empleados en esta sección, pueden observarse en las Tablas 2 y 8, respectivamente.

Tabla 2. Condiciones del termociclador para la región promotora del gen *psy*. La siguiente tabla muestra las condiciones que se utilizaron para cada par de oligonucleótidos durante la amplificación del promotor del gen *psy*.

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	Oligo-P (Fw), PDspsyRv2, PDb2538psyRv2, PDb847psyRv2
Desnaturalización	1 min.	95 °C	5x	
Hibridación	1 min.	36 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	AndpFw, AndpRv
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	36 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	Oligo-P (Fw), PDspsyRv2, PDb2538psyRv2, PDb847psyRv2
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	65 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	

2.6.2 Amplificación del promotor *Db847psy* en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se realizó un PCR bajo las condiciones indicadas en la Tabla 3, utilizando los oligonucleótidos “Ptest for” y “Psp3”. Donde los rangos de temperatura media utilizados, se ajustaron a necesidad en base a las temperaturas medias teóricas (Tabla 8).

Tabla 3. Condiciones del termociclador para la región promotora de *Db847psy*. La siguiente tabla muestra las condiciones que se utilizaron para cada par de oligonucleótidos durante la amplificación del promotor de *Db847psy*.

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	Ptest for (Fw), Psp3 (Rv)
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	46 °C-52 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	

2.6.3 Amplificación del promotor *Db847lyc-β*, en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se utilizaron las condiciones PCR, indicadas en la Tabla 4. Utilizando los oligonucleótidos PlycβFw y PlycβRv, cuyo rango de temperatura media se ajustó a necesidad, utilizando como referencia sus temperaturas medias teóricas (Tabla 8).

2.7 Purificación de productos de PCR mediante fenol-cloroformo.

Los productos de 25 µL se resuspendieron en 375 µL de agua, se les adicionó 100 µL de fenol (se aplicó vortex) y se centrifugó (14,000 r.p.m., 5 mins.). Posteriormente, se agregó 100 µL de cloroformo (se aplicó vortex) y se centrifugó (14,000 r.p.m., 5 mins.). Se recolectó sobrenadante y se reconcentró la

muestra con filtros Centricon YM-100 (Omicron®). Las muestras se cuantificaron por “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer” y se verificaron en gel de agarosa.

2.8 Secuenciación de productos de PCR.

Los productos de PCR se mandaron secuenciar al “Instituto de Biotecnología de la UNAM” en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos.

2.9 Análisis bioinformático de los productos secuenciados.

Se evaluó cada uno de los genes trabajados utilizando el modelo “Neighbor-joining” incluido en el “software” MEGA7. Este método fue desarrollado por Naruya Saitou y Masatoshi Nei en 1987, es utilizado frecuentemente para filogenia y/o la construcción de fenogramas basados en datos de ADN o proteínas.

Para los productos de la región promotora, se utilizó el programa “PLACE” (Higo *et al.*, 1999), cuya función es la búsqueda de potenciales elementos reguladores de ADN, en plantas. Posee una página en línea (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>), de acceso gratuito.

Tabla 4. Condiciones del termociclador para la región promotora de *Db847lyc-β*. La siguiente tabla muestra las condiciones que se utilizaron para cada par de oligonucleótidos durante la amplificación del promotor de *Db847lyc-β*.

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos	Oligonucleótidos
Desnaturalización inicial	5 mins.	95 °C	1x	PlycBFw, PlycBRv
Desnaturalización	1 min.	95 °C	25x	
Hibridación	1 min.	46 °C-52 °C		
Extensión	2 mins.	72 °C		
Extensión final	10 mins.	72 °C	1x	

Capítulo 3 Resultados

3.1 Oligonucleótidos experimentales.

3.1.1 Oligonucleótidos de los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lyc-β*

Se obtuvieron 6 pares de oligonucleótidos conservados en algunas microalgas y plantas, que poseen genes involucrados en la carotenogénesis. 2 pares para el gen *psy*, 1 par para el gen *pds*, 2 pares para el gen *zds* y 1 par para el gen *lyc-β*, los cuales presentan una Tm de 56°C (Tabla 5). Así mismo, se calcularon los tamaños teóricos que serán amplificados para los oligonucleótidos concernientes a *psy* (Tabla 6) y *lyc-β* (Tabla 7).

Tabla 5. Oligonucleótidos conservados de los genes *psy*, *pds*, *zds*, *lyc-β*. Se pueden observar la secuencia, longitud, orientación y temperatura media a la cual fueron diseñados los oligonucleótidos.

<i>Psy</i>		# bases	Tm (Teórica)
psyFw1	GAGTACGCCAAGACCTTC	18 nts	56 °C
psyFw2	GATTGAGGGCATGCGGAT	18 nts	56 °C
psyRv1	ATCCGCATGCCCTCAATC	18 nts	56 °C
psyRv2	GAAGTTGTCGTAGTCATTCT	20 nts	56 °C
<i>Pds</i>			
pdsFw	TGTGCTGGGTGGCAAGG	17 nts	56 °C
pdsRv	ATCTTCTCAGGCCAAGACA	19 nts	56 °C
<i>Zds</i>			
zdsFw1	GTCCACAGCTGTAGAGCT	18 nts	56 °C
zdsFw2	GTGGGACCCCATTGCCT	17 nts	56 °C
zdsRv1	AGGCAATGGGGTCCCAC	17 nts	56 °C
zdsRv2	CCTCGAAGCTCTCGATGT	18 nts	56 °C
<i>lyc-β</i>			
lyc-βFw	CAACTATGGGTGCTGGGT	18 nts	56 °C
lyc-βRv	GCATGGCATAACAGGAAGG	17 nts	56 °C

Tabla 6. Tamaños de productos de PCR teóricos para el gen *psy*. Se muestran los productos potenciales a obtener durante la amplificación del gen *psy*, en *D. bardawil* (*Db*) y *D. salina* (*Ds*).

Oligonucleótidos	<i>Db</i> 847 (EU328288.1)	<i>Db</i> UTEX 2538 (DQ057342.1)	<i>Ds</i> (AY547325.1)
psyFw1 y psyRv1	534 pbs	683 pbs	995 pbs
psyFw2 y psyRv2	2278 pbs	1899 pbs	1518 pbs

Tabla 7. Tamaño de producto de PCR teórico para el gen *lyc-β*. Se muestra el producto a obtener durante la amplificación del gen *lyc-β*, en *D. salina*.

Oligonucleótidos	<i>D. salina</i> (KX218392.1)
<i>lyc-β</i> Fw y <i>lyc-β</i> Rv	1583 pbs

3.1.2. Oligonucleótidos para la amplificación de la región reguladora en los genes *psy* y *lyc-β*.

Se fabricaron 8 oligonucleótidos en total, que se utilizaron exclusivamente para amplificar la región promotora de *psy* y 2 para *lyc-β* (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación de la región reguladora en *psy* y *lyc-β*. En esta tabla, se pueden observar la secuencia, longitud, orientación y temperatura media a la cual fueron diseñados los oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	# bases	Tm teórica
Promotor <i>psy</i>			
Oligo-P (Fw)	-----	23 nts	34 °C
PDspsyRv2	GCACCGGAAGCGATCAATCATCG	23 nts	34 °C
PDb847psyRv2	GCTGTTGCTGCGATCAATCATCG	24 nts	36 °C
PDb2538psyRv2	CGTCACCTGCCGATCAATCATCG	23 nts	34 °C
AndpFw	CGATTGTACTTCG	13 nts	34 °C
AndpRv	CGATGATTGATCG	13 nts	34 °C
Ptest for (Fw)	AACAATGCCACCAATACC	18 nts	52 °C
Psp3 (Rv)	GAATGGTAGTCGCAGAG	17 nts	52 °C
Promotor <i>lyc-β</i>			
Nombre	Secuencia 5'→ 3'	# bases	Tm teórica
PlycβFw	AGTGGAGTAGCAGAGACATC	20 nts	52 °C
PlycβRv	CTTGCTTATACTCAATTGTA	20 nts	52 °C

3.2 Extracción de ADN cromosomal de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se obtuvieron nueve ADNs cromosomales de la extracción realizada. Tres ADNs corresponden a *D. salina* y seis a *D. bardawil* (Fig. 3).



Figura 3. ADN cromosomal de *Dunaliella*. Gel de agarosa al 1.2%, con integración de 2, que contiene ADN cromosomal de *D. salina* (pozos 1-3) y *D. bardawil* (pozos 4-9).

3.3 Certificación de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se obtuvieron 4 bandas en total. Un par con 2500 pbs y 1000 pbs correspondientes a *D. bardawil* y otro par con 2100 pbs y 700 pbs para *D. salina* (Fig. 4).

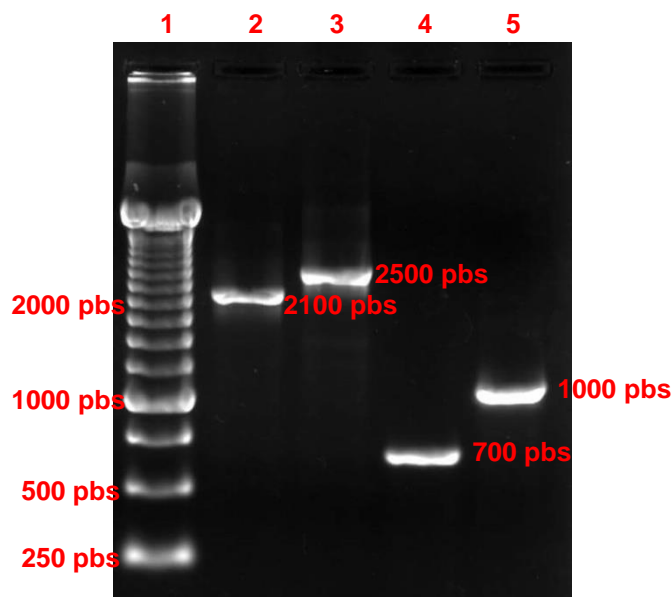


Figura 4. Certificación de *D. bardawil* y *D. salina*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3, que contiene los productos amplificados durante la certificación de *D. bardawil* y *D. salina*. Los pozos, comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN "Invitrogen"; 2) *D. salina* (2100 pbs), con oligonucleótidos MA1-MA-2; 3) *D. bardawil* (2500 pbs) con oligonucleótidos MA1-MA-2; 4) *D. salina* (700 pbs), con oligonucleótidos DSs-MA-2; 5) *D. bardawil* (1000 pbs), con oligonucleótidos DBs-MA-2.

3.4 Amplificación del gen *psy*.

Se amplificaron cuatro productos de PCR, en total. Utilizando el par de oligonucleótidos *psyFw1* y *psyRv1*, a una T_m de 52 °C, se obtuvieron 700 pbs y 1000 pbs en *D. salina* y *D. bardawil*, respectivamente. Con la pareja de oligonucleótidos *psyFw2* y *psyRv2*, se produjeron 1900 pbs y 1450 pbs para *D. salina* (T_m de 48 °C) y *D. bardawil* (T_m de 51 °C), respectivamente (Fig. 5).

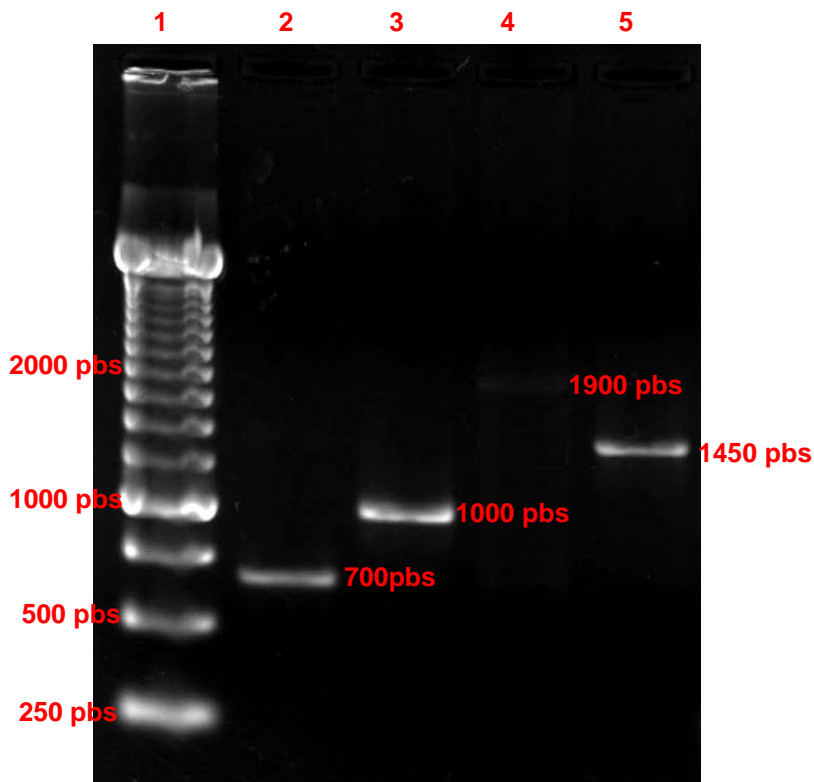


Figura 5. Productos del gen *psy*, en *D. salina* y *D. bardawil*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3, cuyos pozos, comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN "Invitrogen"; 2) *D. salina* (700 pbs), con par de oligonucleótidos *psyFw1* y *psyRv1*; 3) *D. bardawil* (1000pbs), con par de oligonucleótidos *psyFw1* y *psyRv1*; 4) *D. salina* (1900 pbs), con par de oligonucleótidos *psyFw2*; 5) *D. bardawil* (1450 pbs), con par de oligonucleótidos *psyRv2*.

3.5 Amplificación del gen *pds*.

Utilizando los oligonucleótidos *pdsFw* y *pdsRv*, se obtuvieron multibandeos en ambas cepas certificadas de *D. salina* y *D. bardawil*. Ambos productos a una T_m final de 54 °C, presentaron un patrón a partir de las 650 pbs hasta las 1300 pbs (Fig. 6).

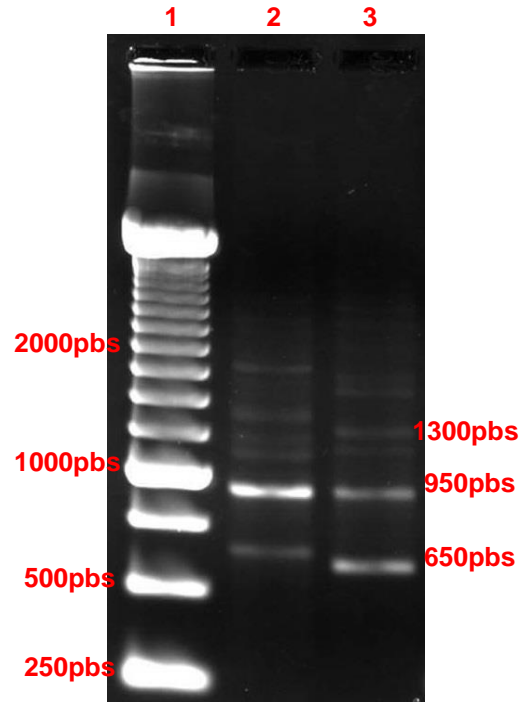


Figura 6. Productos del gen *pds*, en *D. salina* y *D. bardawil*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3, cuyos pozos comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN "Invitrogen"; 2) *D. salina* (700 pbs y 950 pbs), con par de oligonucleótidos *pdsFw* y *pdsRv*; 3) *D. bardawil* (650 pbs y 950 pbs), con par de oligonucleótidos *pdsFw* y *pdsRv*.

3.6 Amplificación del gen *zds*.

A una T_m final de 54 °C, mediante el uso de los oligonucleótidos *zdsFw1* y *zdsRv1*, se obtuvo un multibandeo con ambos productos. Estos presentaron un cierto patrón, casi idéntico (Fig. 7). El segundo par de oligonucleótidos *zdsFw2* y *zdsRv2*, no generaron ningún producto visible.

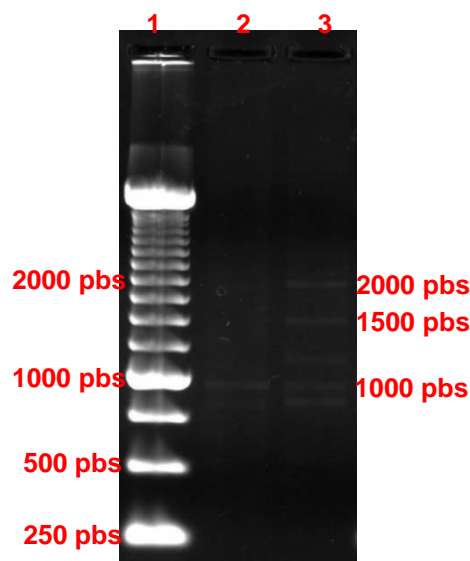


Figura 7. Productos del gen *zds*, en *D. salina* y *D. bardawil*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3, cuyos pozos comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN "Invitrogen"; 2) *D. salina* (900 pbs, 1000 pbs, 1450 pbs y 1950 pbs), con par de oligonucleótidos *zdsFw1* y *zdsRv1*; 3) *D. bardawil* (900 pbs, 1000 pbs, 1200 pbs, 1500 pbs y 2000 pbs), con par de oligonucleótidos *zdsFw1* y *zdsRv1*.

3.7 Amplificación del gen *lyc-β*.

A una T_m final de 56 °C, utilizando los oligonucleótidos *lyc-βFw* y *lyc-βRv*, se obtuvieron los siguientes productos: 700 pbs y 1600 pbs para *D. salina*, y 600 pbs en *D. bardawil* (Fig. 8).

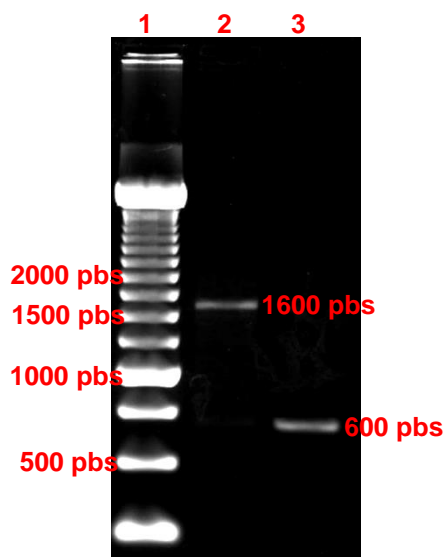


Figura 8. Productos del gen *lyc-β*, en *D. salina* y *D. bardawil*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3 cuyos pozos, comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN "Invitrogen"; 2) *D. salina* (700 pbs y 1600 pbs), con par de oligonucleótidos *lyc-βFw* y *lyc-βRv*; 3) *D. bardawil* (600 pbs), con par de oligonucleótidos *lyc-βFw* y *lyc-βRv*.

3.8 Región promotora de *psy* y *Db847lyc-β*.

3.8.1 Amplificación del promotor del gen *psy*, en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

Se obtuvieron dos productos de distinto tamaño, a una T_m de 65 °C. *D. salina*, presentó una banda de 900 pbs y *D. bardawil* amplificó una banda de 1350 pbs, utilizando el oligonucleótido Oligo-P (Fw) y los oligonucleótidos específicos PDb2538psyRv2 y PDb847psyRv2, respectivamente (Fig. 9). El uso de estos oligonucleótidos a una T_m de 34 °C – 36 °C, generó un multibandeo el cual no fue posible remover al utilizar los oligonucleótidos AndpFw y AndpRv.

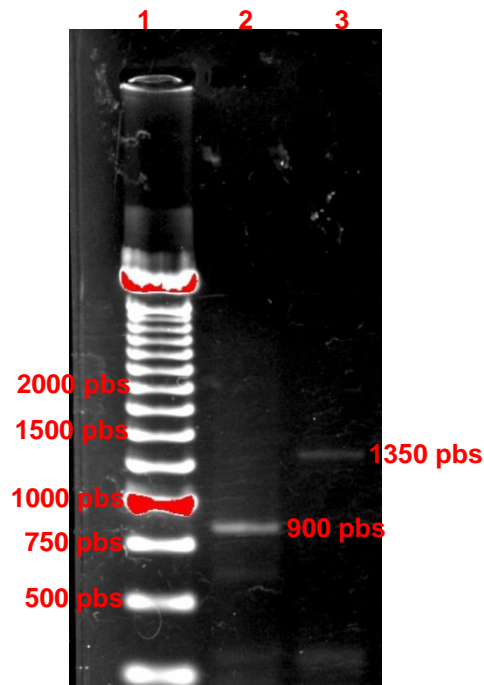


Figura 9. Productos de la región promotora del gen *psy*, en *D. salina* y *D. bardawil*. Gel de agarosa al 1.2% con integración de 3, cuyos pozos comprenden los siguientes productos: 1) Escalera de 250 pbs de ADN “Invitrogen”; 2) *D. salina* (800 pbs), con par de oligonucleótidos Oligo-P (Fw)-PDb2538psyRv2; 3) *D. bardawil* (1350 pbs), con par de oligonucleótidos Oligo-P (Fw)-PDb847psyRv2.

3.8.2 Productos del promotor *Db847psy*, en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

No se presentó amplificación visible, utilizando los oligonucleótidos Ptest for (Fw) y Psp3 (Rv), propuestos por Lao *et al.*, (2011), en *D. bardawil* y *D. salina* certificadas.

3.8.3 Productos del promotor *Db847lyc-β*, en cepas certificadas de *D. bardawil* y *D. salina*.

No hubo resultado alguno mediante el uso de la pareja de oligonucleótidos PlycBfw y PlycBRv, en *D. salina* y *D. bardawil*, certificadas.

3.9 Purificación de las bandas de los genes *lyc-β*, *psy* y su región promotora.

Los resultados obtenidos del DNA purificado evaluados mediante “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer”, mostraron concentraciones adecuadas para su secuenciación y en su mayoría, un cociente DNA/proteína aceptable (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de purificación de ADN. Muestra el nombre, cociente ADN/proteína y la concentración de DNA de doble cadena para cada especie, obtenidas mediante NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer”.

Espece	Gen/Promotor	260/280	[DNA]
<i>Dunaliella salina</i>	Gen <i>psy</i>	0.99	1015 ng/μl
<i>Dunaliella bardawil</i>	Gen <i>psy</i>	1.01	1005 ng/μl
<i>Dunaliella salina</i>	Gen <i>lyc-β</i>	1.88	1639 ng/μl
<i>Dunaliella salina</i>	Promotor <i>psy</i>	1.84	1554 ng/μl
<i>Dunaliella bardawil</i>	Promotor <i>psy</i>	1.91	1845 ng/μl

3.10 Secuenciación de los productos del gen *lyc-β*, *psy* y su región reguladora.

Se generaron cinco resultados de los productos mandados a secuenciar, cuyos tamaños pueden observarse en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de secuenciación. En la primera columna se muestra la especie utilizada; la segunda columna se refiere al tipo de producto trabajado; la tercer y última columna presenta los tamaños obtenidos durante la secuenciación, llevadas a cabo en el IBT, UNAM.

Especie	Gen/Promotor	Tamaño (bases)
<i>Dunaliella salina</i>	Gen <i>psy</i>	659
<i>Dunaliella bardawil</i>	Gen <i>psy</i>	884
<i>Dunaliella salina</i>	Gen <i>lyc-β</i>	1177
<i>Dunaliella salina</i>	Promotor <i>psy</i>	818
<i>Dunaliella bardawil</i>	Promotor <i>psy</i>	163

3.11 Análisis bioinformático de los genes *psy* y *lyc-β*.

3.11.1 Revisión de las secuencias del gen *psy*.

La secuencia *Dspsy* certificada, fue cubierta en un 96% por la secuencia del gen *psy* en *D. bardawil* 2538 (DQ057342.1), que se encuentra en la base de datos. Así mismo, esta arrojó un porcentaje de identidad del 99%, una vez finalizado el proceso que se llevó a cabo utilizando la herramienta bioinformática BLAST. Mediante la herramienta de MEGA 7, se obtuvo un fenograma (Fig. 10) que muestra algunas de las especies que presentan el gen *psy*. Por otra parte, la secuencia que corresponde a *Dbpsy* certificada, se cubrió en un 38% y 39%, junto con un porcentaje de identidad del 94% y 92% para *D. parva* FACHB-815 (KY069273.1) y *D. salina* (AY547325.1), respectivamente.

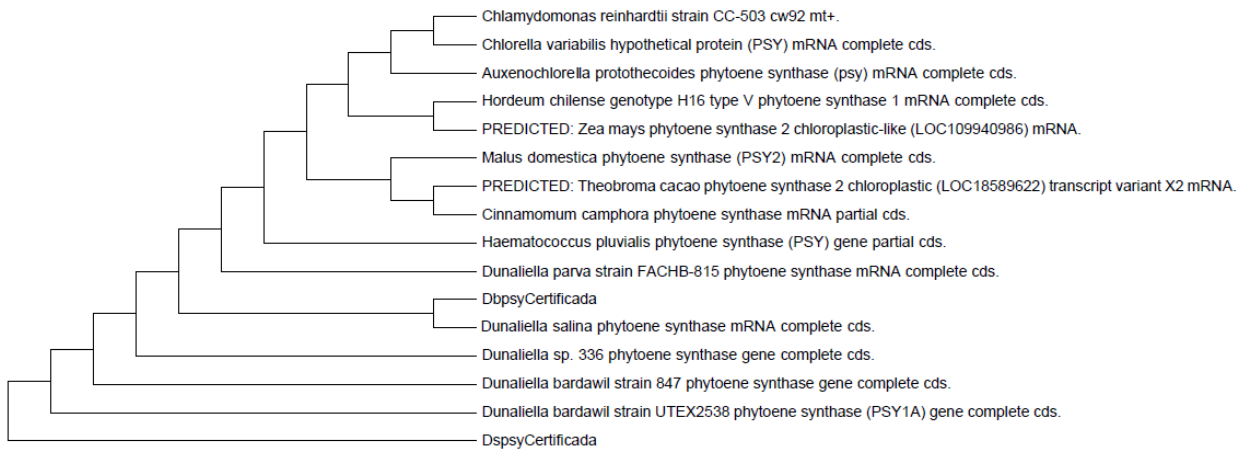


Figura 10. Fenograma del gen *psy*. Muestra las relaciones más cercanas que tienen *DspsyCertificada* y *DbpsyCertificada*, con otras especies que poseen un gen *psy*.

3.11.2 Revisión de las secuencias del gen *lyc-β*.

A través de BLAST y MEGA 7, se obtuvo que *D. salina* certificada cubrió 1177 pbs en *D. salina* CCAP 19/30 (EU327877.1), con un porcentaje de identidad del 77.88%. Los otros alineamientos son despreciables (<200 pbs) y no coinciden con alguna planta o microalga.

3.12 Evaluación de elementos reguladores dentro del promotor del gen *psy*, en la cepa certificada de *D. salina*.

La secuencia evaluada manualmente reveló un sitio de inicio de la transcripción a 99 bases de distancia del codón de inicio "ATG", el cual cuenta con un sitio de inicio de la traducción a 8 bases de este (Fig. 12).

La herramienta de "PLACE", reveló la existencia y posición aproximada de algunos elementos reguladores que podrían estar presentes dentro de la región reguladora del gen *psy*, en *D. salina*. Algunos de estos son: La caja TATA, que es partícipe clásico para el inicio de la transcripción, en la posición -39 (Grace M. *et al.*, 2004). La secuencia "CCAAT", elemento que señala el sitio de unión para el factor de transcripción de ARN, en eucariotas, ubicado en -72 (Laloum T. *et al.*, 2013). GT-1 (posición -

566) y GT-1GMSCAM4 (posición -201), cajas responsivas a luz (Terzaghi W. *et al.*, 1995) y sal (Park H. *et al.*, 2004), respectivamente. El resto de los elementos encontrados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Elementos-*cis*. Se presentan los principales elementos reguladores, que potencialmente se podrían ver involucrados con la transcripción del gen *psy*, así como su potencial función en este.

Elemento- <i>cis</i>	Función	Referencia
ATG	Codón de inicio en la región codificante.	(Frederick B. <i>et al.</i> , 1997)
Sitio de inicio de la traducción.	Sitio de reconocimiento para el inicio de la traducción.	(Kozak M., 1987)
Sitio de inicio de la transcripción.	Sitio de reconocimiento para el inicio de la transcripción.	(Elder D., 1992)
TATA "box"	Control de la transcripción.	(Grace M. <i>et al.</i> , 2004)
GATA "box"	Interruptor de luz.	(Gilmartin P. <i>et al.</i> , 1990)
CCAAT "box"	Señaliza el sitio de unión para el factor de transcripción de ARN, en eucariotas.	(Laloum T. <i>et al.</i> , 2013)
GT-1 "CONSENSUS"	Regulación por luz.	(Terzaghi W. <i>et al.</i> , 1995).
GT-1 GMSCAM4	Expresión por patógeno y NaCl.	(Park H. <i>et al.</i> , 2004).
BOXLCOREDPCAL	Activador en respuesta a luz UV-B.	(Maeda K. <i>et al.</i> , 2005).
MYCCONSUSAT	Respuesta hacia la deshidratación y el frío.	(Chinnusamy V. <i>et al.</i> , 2003 y 2004).
MYB2CONSUSAT	Respuesta a deshidratación.	(Abe H. <i>et al.</i> , 2003).
CGCGBOXAT	Regulación por luz.	(Yang T. y Poovaiah B. W., 2002).
CURECORECR	Activador en respuesta a bajos niveles de oxígeno.	(Quinn J. <i>et al.</i> , 2002).
DRECRTCOREAT	Respuesta a deshidratación.	(Dubouzet J. <i>et al.</i> , 2003).

Capítulo 4 Discusión

4.1 Oligonucleótidos conservados y específicos.

Los oligonucleótidos obtenidos, a partir de MEGA7 y NCBI, se diseñaron para ser conservados con las especies que participaron en los alineamientos (microalgas y plantas). Se tomaron solo las regiones que mostraban mayor cantidad de conservación, tratando de que estas estuviesen ubicadas en el principio y fin del gen, o en su defecto, dentro de los exones (primero y último), cuando aplicase.

Los alineamientos para cada uno de los genes carotenogénicos, pueden encontrarse en la sección de “anexo”, de este documento.

Con respecto a los oligonucleótidos específicos en sentido inverso, para la región promotora de *psy*, estos se diseñaron dentro de las primeras 25 bases a partir del primer codón codificante, y se complementaron con el oligonucleótido Oligo-P (Fw), el cual se desarrolló a partir de una secuencia de *lyc-β* en *D. bardawil* 847. A estos, se les adicionó una secuencia de reconocimiento, creada con el fin de reamplificar el primer producto obtenido por la serie de oligonucleótidos antes mencionados. Los oligonucleótidos AndpFw y AndpRv, responden a dicha secuencia y permiten la obtención de un producto secundario. Mientras que los oligonucleótidos para amplificar la región reguladora de *lyc-β* en *D. bardawil* 847, se diseñaron tomando las primeras y últimas 20 bases de todo el promotor.

4.2 Cultivo de *Dunaliella* y extracción de ADN cromosomal

Para obtener una buena cantidad de ADN cromosomal, que pueda ser utilizado en distintos procesos y múltiples veces, es necesario generar una gran cantidad de biomasa, de la cual este pueda ser extraído. *D. salina* y *D. bardawil*, al ser especies de microalgas halofílicas, requieren de una determinada concentración de salinidad en el medio que se utilice para cultivarlas (1M y 5M, respectivamente). El medio f/2 (Paniagua *et al.*, 1989), que ha sido ampliamente utilizado, se preparó en el laboratorio con agua de mar obtenida del sistema de filtrado de CICESE, con una concentración 5M de NaCl para *D. bardawil*. En el caso de *D. salina*, se utilizó una concentración salina de 1M y se cultivó en el medio 2x Erdschreiber (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=166>), debido a su previa aclimatación a este medio en el cepario UTEX. Después de aproximadamente dos semanas, se generó la

cantidad de células que se requería (1×10^5 cel/ml) para la extracción de ADN. Esto debido a que las cepas se encontraban en condiciones estresantes.

El ADN cromosomal obtenido a partir del “pellet” generado por los cultivos de microalgas, fue sometido a electroforesis para comprobar la presencia de este, tal y como puede observarse en la Figura 3, de este escrito.

4.3 La certificación

Las bases de datos, tales como NCBI, cuentan con una abundante cantidad de información, la cual puede ser aportada por cualquier persona/investigador. Sin embargo, estos bancos al no implementar o exigir un tipo de metodología que ampare los datos que se deseen depositar, provoca que la información encontrada en las bases de datos comience a generar múltiples confusiones entre investigadores, así como el empleo innecesario de tiempo, trabajo y dinero.

Debido a que el diseño de los oligonucleótidos realizados requería del uso de secuencias nucleotídicas, fue necesario recurrir a estos bancos. Por tal razón, se llevó a cabo una certificación de las cepas que se encontraban en el cepario del laboratorio de microbiología molecular en CICESE. Primeramente, se llevó a cabo una amplificación del gen 18S para ambas cepas, haciendo uso de los oligonucleótidos universales MA1-MA2, tal y como refiere Olmos et., al (2000), los cuales amplifican un tamaño de 2100 pbs en *D. salina*, mientras que *D. bardawil* presenta 2500 pbs (Fig. 4).

El siguiente paso en esta fase, fue buscar la especificidad de las especies *D. salina* y *D. bardawil*, haciendo uso de los oligonucleótidos específicos (DSs-MA2 y DBs-MA2, respectivamente), que amplifican 700 pbs en *D. salina* y 1000 pbs para *D. bardawil* (Olmos et., al 2002), como puede apreciarse en la Figura 4. Habiendo concluido esta parte experimental, se volvió evidente que nos encontramos trabajando con las microalgas objetivo y por tanto, puede continuarse hacia la siguiente fase, la amplificación de los genes carotenogénicos seleccionados, donde se podrá observar de manera precisa, si las secuencias obtenidas de los bancos, realmente corresponden a la especie de las cuales fueron obtenidas.

4.4 La presencia del gen *psy*.

Durante las reacciones de PCR llevadas a cabo, se amplificaron cuatro productos. El primer par de oligonucleótidos para este gen (*psyFw1* y *psyRv1*), amplificó 700 pbs para *D. salina* y 1100 pbs para *D. bardawil*, aproximadamente. El tamaño que se esperaba para estas dos bandas era de 995 pbs (AY547325.1) y 534 pbs (EU328288.1) o 683 pbs (DQ057342.1), respectivamente (Tabla 2). En ambos casos, los tamaños no coinciden, esto podría deberse a las siguientes razones: 1) Las secuencias dentro de las bases de datos, no concuerdan con las especies de las cuales fueron obtenidas; 2) Los oligonucleótidos podrían estar alineándose inespecíficamente.

El segundo par de oligonucleótidos (*psyFw2* y *psyRv2*), amplificó 1500 pbs para *D. bardawil*, mientras que en *D. salina* se obtuvieron 1900 pbs después de las modificaciones realizadas en la temperatura (Tabla 1) y microlitros de ADN utilizados. Los productos teóricos (Tabla 2), según el diseño de los oligonucleótidos, son 1518 pbs para *D. salina* y 1988 o 2278 pbs (dependiendo de la cepa) para *D. bardawil*. Nuevamente el tamaño no coincide con lo esperado (Fig. 11), esto podría deberse a las mismas razones explicadas anteriormente. Mas otro punto a considerar, fue que tanto el oligonucleótido “forward”, como el “reverse”, a pesar de ser conservados con múltiples especies, son idénticos a la secuencia de *D. salina* (AY547325.1) y por consiguiente, los oligonucleótidos deben de alinearse sin problema alguno, con la secuencia del gen *psy*. Estos resultados, potencialmente indican una alta probabilidad de que el nombre de las cepas dentro de las bases de datos, es incorrecto. Sin embargo, un análisis más profundo es requerido para llegar a una conclusión, ya sea evaluando los resultados obtenidos mediante su secuenciación y comparación contra las bases de datos, o a través de la certificación de las cepas que se encuentran depositadas en estas fuentes, donde esta última no necesariamente generara un resultado confiable, debido a que la posibilidad de un cambio de cepas conforme al tiempo, en los bancos y/o dentro de los grupos de investigación, es indiscutiblemente elevada.

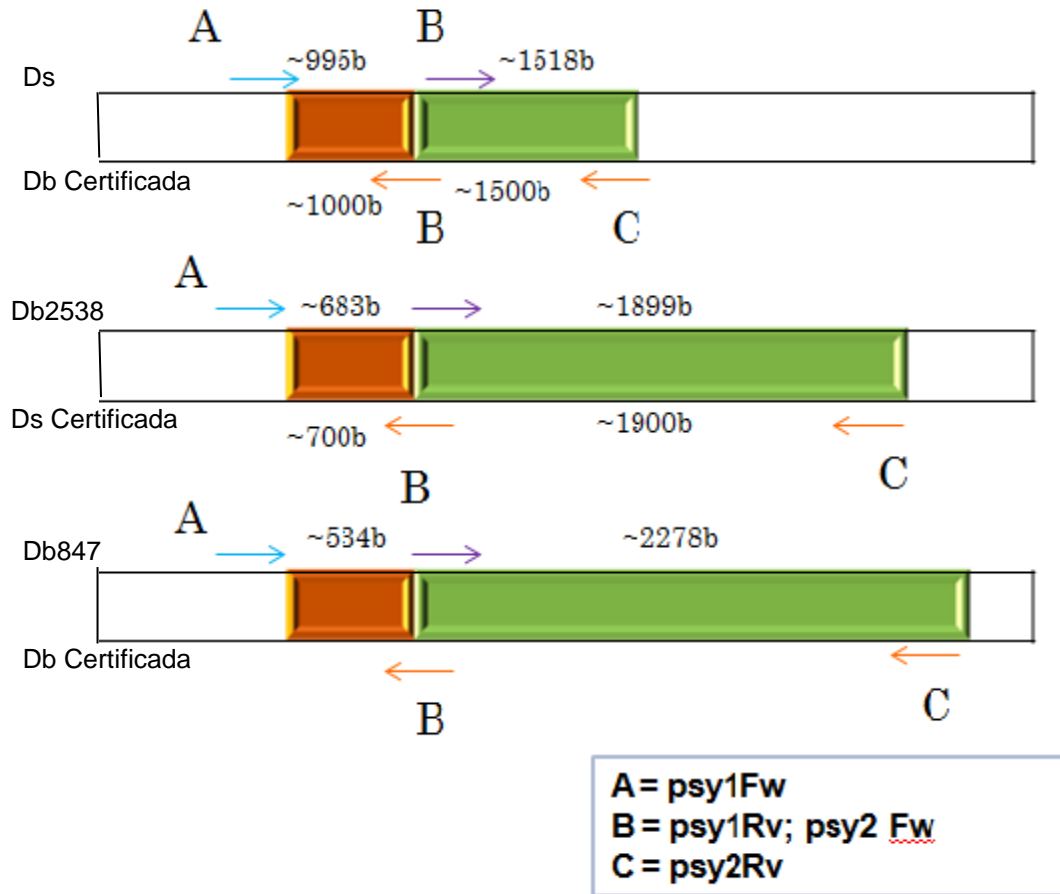


Figura 11. Diagrama que ejemplifica el gen de *psy* en *D. bardawil* y *D. salina*. El nombre por encima de cada barra, pertenece a las cepas no certificadas, por el contrario, los nombres por debajo de las barras, se refieren a cepas certificadas. Los números que se encuentran sobre las barras, muestran los tamaños teóricos que deben de amplificar para cada cepa (Tabla 2), mientras que los tamaños que se encuentra directamente debajo de cada barra, pertenecen a los resultados obtenidos en este proyecto. La letra A, se refiere al oligonucleótido *psy1Fw*; B, se refiere tanto al oligonucleótido *psy1Rv* que actúa como pareja de A, como a *psy2Fw*, quien es la pareja de C; C, equivale al oligonucleótido *psy2Rv*.

4.5 Gen *pds*.

Los oligonucleótidos generados para este gen (*pdsFw* y *pdsRv*), abarcaron únicamente la región codificante de las especies, por tanto, tratar de predecir un tamaño de producto esperado, es complicado. Chen *et al.*, (2016), reportó un gen *pds* con 8113 pbs correspondiente a *D. bardawil* 847, conteniendo este un total de 12 exones y 11 intrones. Por otro lado, Sun *et al.*, (2008), reporta que *D. salina* posee un gen *pds* mayor a 6000 pbs. Los resultados obtenidos en este proyecto, mostraron un patrón de bandeo para ambas especies de *Dunaliella*. Esto llevó a un debate sobre lo que realmente estaba ocurriendo, dado que las secuencias, aparentemente se están alineando en las mismas regiones

(Fig. 6). Algunas explicaciones o razones de lo ocurrido serían: 1) *pds*, es un gen que puede ser levemente expresado bajo condiciones normales de cultivo o de estrés salino en *D. bardawil* 847 (Chen *et al.*, 2016). Sin embargo, la extracción de DNA cromosomal realizada en este proyecto, se llevó a cabo durante etapas tardías de la fase exponencial en ambas cepas. El desconocimiento de los niveles de expresión, bajo otros factores de estrés, dificultan saber en qué etapa del crecimiento de estas microalgas, es donde hay mayor cantidad de dicho transcrito. Se cree que la probabilidad de estar obteniendo productos primarios o inmaduros del gen *pds*, es elevada. Es necesario medir la expresión relativa de este gen, durante distintas etapas de su crecimiento, así como probar diferentes factores de estrés; 2) Otra posibilidad que está íntimamente ligado con lo mencionado anteriormente, es considerar que dicho gen podría estar pasando por procesos de “splicing”. Esto podría estar ocasionando que los exones de donde fueron diseñados los oligonucleótidos, se estén acomodando a distintas distancias, provocando que se amplifiquen distintos productos de un mismo gen. Obteniendo así, varios productos incompletos de un mismo gen.

Actualmente, las secuencias reportadas por Chen *et al.*, (2016) y Sun *et al.*, (2008), no han sido liberadas en los bancos de información, lo cual dificulta hacer un análisis con más detalle de los resultados obtenidos.

4.6 Gen *zds*.

Los resultados que generaron el primer par de oligonucleótidos (*zdsFw1* y *zdsRv1*), fueron primeramente un multibando que al igual que el gen *pds*, mostraban un patrón en los tamaños de ambas especies (Fig. 7).

Lao *et al.*, (2014), menciona que el gen *zds* de *D. bardawil* 847 posee un tamaño de 6879 pbs, el cual contiene 12 exones. Reporta así mismo, que a diferencia del gen *pds*, *zds* si muestra altos niveles de expresión en condiciones totalmente hiposalinas (0M), y niveles bajos de expresión en condiciones hipersalinas (2M-4.5M).

Considerando que la expresión *zds*, se vuelve notoria hasta la fase roja de las microalgas, al cultivar en un medio hipersalino. Extraer ADN cromosomal durante la etapa verde de estas cepas, hace que la

probabilidad de encontrar productos de *zds* maduros, se vuelve demasiado baja. Es requerido hacer amplificaciones en distintas etapas de la curva de crecimiento, así como en condiciones de estrés salino.

Al ser un gen grande, es necesario considerar la posibilidad de que pase por procesos de “splicing”, esto de la misma manera pudo haber influenciado en los resultados negativos con los oligonucleótidos *zdsFw2* y *zdsRv2*, posicionándolos de manera inadecuada para una correcta amplificación. Desafortunadamente, no hay estudios al respecto que profundicen en estos tópicos. Más aun, no hay información sobre la regulación del gen *zds* en *D. salina*, actualmente. Por tanto, una comparación con su cepa hermana, se vuelve complicada e inexacta.

Otro punto a considerar, el cual no se encuentra muy alejado de lo explicado anteriormente, es que los estudios donde se encuentre una cepa certificada de *D. bardawil*, que logre entrar a la fase roja, son nulos. Sin embargo, Lao *et al.*, (2014) y Liang *et al.*, (2016), reportan haber llegado a esta fase de la expresión, utilizando la cepa *D. bardawil* 847 no certificada. Sería de alto interés certificar dicha cepa, para corroborar la especie y las condiciones de laboratorio que llevan a la expresión de *zds*.

4.7 Gen *lyc-β*

En *D. salina*, se obtuvo un tamaño de 1600, el cual corresponde con el producto teórico esperado (Tabla 3). El origen del producto teórico, proviene de una secuencia en NCBI, correspondiente a *Dslyc-β* (EU327877.1), depositada por Ramos *et al.*, (2008).

Este resultado preliminar, nos asegura con altas probabilidades que la secuencia para dicho gen depositado en la base de datos NCBI, es verídico. Sin embargo, los resultados de secuenciación representan una parte indispensable para una completa certificación de esta cepa (EU327877.1). Estos, se pueden encontrar en la siguiente sección de dicho escrito.

El producto obtenido que corresponde a *D. bardawil*, no comprende ningún resultado teórico. Esto, se debe a que durante la realización de los oligonucleótidos carotenogénicos (Tabla 1), no existía secuencia alguna para el gen *lyc-β*, en *D. bardawil*. Posteriormente, se encontró una secuencia de ADN complementario para dicho gen, en *D. bardawil* 847 (X218392.1), depositada por Liang *et al.*, (2016). Al comparar la secuencia antes mencionada, con los oligonucleótidos que fueron utilizados para dicho gen,

se encontró que uno de los oligonucleótidos, no resulto conservado. La distancia resultante en esta secuencia de un oligonucleótido a otro, no era mayor a 200 pbs. Por tanto y considerando que la secuencia corresponde a un ADNc, es posible que el producto obtenido en *D. bardawil* certificada, sea acertado. Esto, debido probablemente a la presencia de un intron con un tamaño aproximado de 400 pbs, resultando en total un producto de 600 pbs, tal y como pudo observarse anteriormente (Fig. 6). Por cuestiones, en general de tiempo, se decidió postergar la secuenciación del resultado.

4.8 Análisis bioinformático de los genes, *Dspsy*Certificada, *Dbpsy*Certificada, y *Dslyc-β*Certificada.

La alineación encontrada entre las muestras y las distintas especies de microalgas y plantas (Fig. 6), mostro no solo el correcto funcionamiento de los oligonucleótidos conservados implementados, sino también su íntima relación con el género *Dunaliella*. Sin embargo, un detalle destacable observado en la distribución del fenograma (Fig. 10), es que las muestras certificadas no se han alineado con la especie esperada. Obteniendo una *D. salina* certificada idéntica a una *D. bardawil* UTEX2538 (DQ057342.1) en la base de datos y una *D. bardawil* certificada, que es similar a una cepa de *D. salina* (AY547325.1).

Al contrario del gen *psy*, *Dslyc-β* certificada resulto prácticamente idéntica (77.8%) a la cepa *Dslyc-β* CCAP 19/30 (EU327877.1) utilizada por Ramos *et al.*, (2008), sobre la cual se trabajó durante la fabricación de los oligonucleótidos.

Este tipo de resultados ha dejado en evidencia una vez más, que la manipulación de estas especies de *Dunaliella*, sin emplear un correcto modo de certificación, puede dejar repercusiones que afectan directamente el trabajo, esfuerzo y dinero empleado entre los investigadores del área, que utilizan la información depositada en las bases de datos, como una fuente confiable. La implementación de un sistema que permita validar la información depositada en estas bibliotecas, resulta urgente y necesario.

4.9 La región reguladora.

El uso del oligonucleótidos AndpFw y AndRv, generó resultados inespecíficos a diferencia de los obtenidos con el Oligo-P (Fw) y los oligonucleótidos específicos PDb2538psyRv2 y PDb847psyRv2, a una Tm de 65°C que generaron un resultado para *D. bardawil* de 1350 pbs y un resultado para *D. salina* de 900 pbs (Fig. 9).

Lao *et al.*, (2011), reporta que la región reguladora del gen *psy* en *D. bardawil* 847, posee un tamaño de 3458 pbs y que el sitio de inicio de la transcripción, se encuentra a 370 nucleótidos del codón de inicio "ATG". Los fragmentos amplificados durante el proyecto son <1500 pbs y por tanto, únicamente se trabajó con la primera mitad de la región promotora de ambas cepas. Afortunadamente la secuencia evaluada mostró; un ATG y un sitio de inicio de la traducción muy cercanos, un sitio de inicio de la transcripción consenso y una caja TATA (-39) rodeada de regiones ricas en G-C (Fig. 12), que se encuentran en posiciones conservadas y que son indispensables en un promotor eucariota (Bernard *et al.*, 2010). Es importante resaltar que la secuencia reportada por Lao *et al.*, (2011) no presentó algunos elementos en las regiones esperadas (TATA, GC-"RICH"), por lo tanto la interpretación de su secuencia es dudosa. Además, debido a que la secuencia no fue reportada es imposible comparar y comprobar sus resultados con los nuestros.

A través de los elementos-*cis*, obtenidos utilizando la herramienta "PLACE" (Higo *et al.*, 1999), se ubicaron múltiples cajas reguladoras en *D. salina* certificada, que coinciden con lo encontrado por Lao *et al.*, (2011), en *D. bardawil* 847. Más aun, varios de estos elementos, como GT1, GT1GMSCAM4, CURECORECR, etc., presentan funciones altamente relacionadas con las condiciones necesarias para la bioacumulación de β -caroteno en *D. salina*, como lo son estrés por luz, sal y limitaciones del oxígeno.

La relación entre los elementos encontrados en *D. salina* certificada y *D. bardawil* 847, es en términos prácticos altamente similar. Las diferencias que pueden encontrarse entre ambas, son las posiciones y repeticiones de dichas cajas reguladoras. Considerando lo anterior y el tamaño de la fracción de región promotora (Fig. 9) obtenido en *D. bardawil* certificada (1350 pbs), se genera la posibilidad de que pudiese existir una regulación más estricta en esta especie lo que podría ayudar a explicar porque esta especie no logra entrar en fase roja, bajo los mismos estímulos que *D. salina*. Desafortunadamente, se determinó durante la evaluación de los resultados del promotor *Db847lyc β* (Liang *et al.*, 2016), en las cepas certificadas de *D. salina* y *D. bardawil*, que *D. bardawil* 847 no es *D. salina* ni *D. bardawil*. Por lo tanto, debido a la falta de certificación de dicha cepa es difícil saber si la cepa utilizada por Lao *et al.*,

(2011), fue reemplazada durante el trabajo de Liang *et al.*, (2016), ya que ambos forman parte del mismo grupo de investigación. Esta razón y el hecho de no tener acceso a la secuencia promotora del gen *psy* en *D. bardawil* 847, vuelven dificultoso el llegar a una conclusión sobre el tipo de regulación que rige a estas dos especies de microalgas.

Sería formidable, contar con la secuencia promotora antes mencionada, para realizar un alineamiento o en su defecto, con la cepa utilizada por Lao *et al.*, (2011), de ese mismo año para conocer la especie que se ha estado trabajando hasta la actualidad.

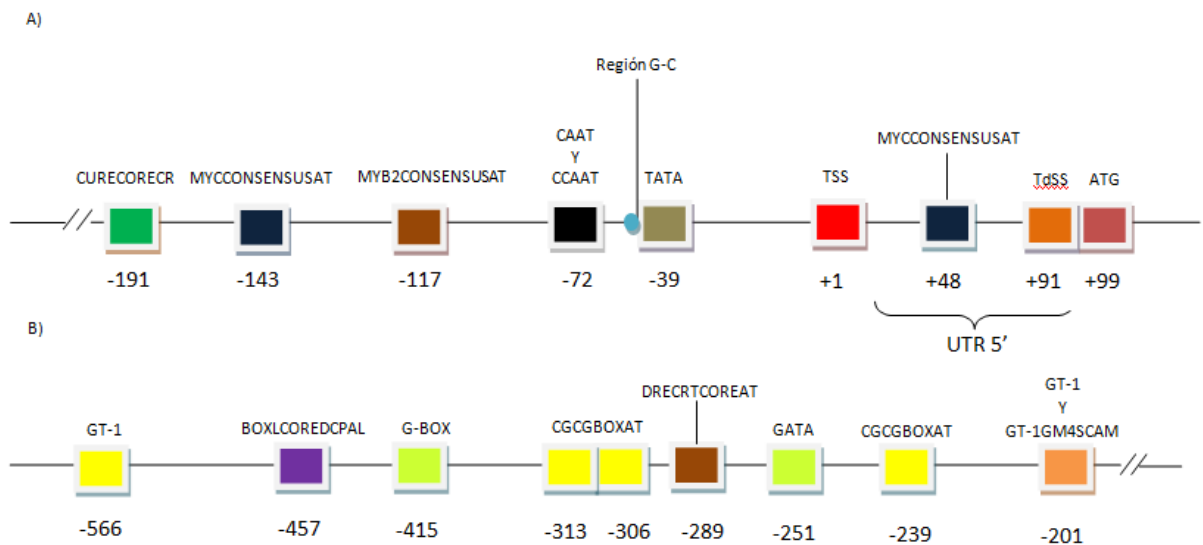


Figura 12. Diagrama de la región promotora de *DpsyCertificada*. A) Fracción de la región promotora (-200 a +100) donde pueden observarse el codón de inicio "ATG" (+99), el sitio de inicio de la traducción (+91), sitio de inicio de la transcripción (+1), la TATA "BOX" (-39), entre otros elementos-*cis*. B) Fracción de la región promotora (-201 a -500) que muestra múltiples elementos reguladores que se ven influenciados por luz, GT-1 (-201), CGCGBOXAT (-239, -306, -313), G-BOX (-415), así como un elemento regulado por luz UV-B (-457) y sal (-201), los cuales podrían estar fuertemente involucrados en la carotenogénesis.

Capítulo 5 Conclusiones

- Las cepas *D. salina* (AY547325.1) y *D. bardawil* UTEX 2538 (DQ057342.1) utilizadas para caracterizar la secuencia del gene *psy*, en realidad son *D. bardawil* y *D. salina* respectivamente, según nuestro método de certificación.
- El gen *lyc-β* atribuido a la cepa *D. salina* CCAP 19/30 (EU327877.1), depositada por Ramos et al., (2008), corresponde con la cepa certificada de *D. salina* por tanto dicha secuencia es verídica y confiable.
- *D. bardawil* 847 utilizada por Liang et al., (2016), no es *D. bardawil*, ni *D. salina* certificada.
- La región promotora del gen *psy* en *D. salina*, es distinta a la región reguladora del gen *psy* en *D. bardawil* 847 (Lao et al., 2011), según nuestros resultados. La secuencia obtenida en este trabajo presenta los elementos-*cis* indispensables para ser considerada como región regulatoria, los cuales no son presentados por Lao et al., (2011). Además, presenta múltiples elementos-*cis* requeridos para la bioacumulación de β-caroteno.
- La falta de implementación de un sistema de certificación en las bases de datos sigue siendo una problemática actualmente.
- La implementación de una curva de crecimiento, junto con una evaluación de la expresión diferencial, es necesaria para observar donde se encuentra el nivel más elevado de transcrito relativo, en los genes *pds*, *zds*, de *D. salina*, y *D. bardawil*.

Literatura citada

- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi K., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1):63-78.
- Arriaga-Alba M., Rivera-Sánchez R., Parra-Cervantes G., Barro-Moreno F., Flores-Paz R. y García-Jiménez E., 2000. Antimutagenesis of β -Carotene to Mutations Induced by Quinolone on *Salmonella typhimurium*. *Archives of Medical Research*, 31(2):156-161.
- Ben-Amotz A., 1975. Adaptation of the unicellular alga *Dunaliella parva* to a saline environment. *Journal of Phycology*, 11(1):50-54.
- Ben-Amotz A y Avron M., 1981. Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences*, 6:297-299.
- Ben-Amotz A. y Avron M., 1983. On the factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant algae *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72 (3):593-597.
- Ben-Amotz A. y Levy Y., 1996. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5):729-734.
- Ben-Amotz A., Katz A., Avron M., 1982. Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of beta-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (*Chlorophyceae*). *Journal of Phycology*, 18(4):529-533.
- Bendich A. y Olson J. A., 1989. Biological actions of carotenoids. *The FASEB Journal*, 3(8):1927-1932.
- Bernard V., Brunaud V., Lecharny A., 2010. "TC-motifs at the TATA-box expected position in plant genes: a novel class of motifs involved in the transcription regulation". *BMC Genomics.*, 11(1):166.
- Blattner F., Plunkett III G., Bloch C., Perna N., Burland V., Riley M, Collado J., Glasner J., Rode C., Mayhew G., Gregor J., Davis N., Kirkpatrick H., Goeden M., Rose D., Mau B., Shao Y., 1997. The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, 277 1453-1474.
- Borowitzka L. J., 1981. The microflora: adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiology*, 81:33-46.
- Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J., 1988. *Dunaliella*. In: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J., (eds.) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 27-58.
- Bouvier F., Backhaus R. A., Camara B., 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273:30651-30659.

- Chen H. H., Chen S. L., Lao Y. M., Liang M. H., Jiang J. G., 2016. Using EGFP as a reporter to confirm the function of phytoene desaturase promoter in *Dunaliella bardawil*. *Algal Research*, 20:16-21.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee S. B. H., Hong X., Agarwal M., Zhu J. K., 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and development*, 17(8):1043-1054.
- Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J. K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of experimental botany*, 55(395):225-236.
- Contreras R., 2005. Identificación molecular de cepas de *Dunaliella salina*, evaluación de la acumulación de β -caroteno y determinación de la variabilidad genética intraespecie, CICESE, Tesis de Maestría, Ensenada, 31pp
- Del Campo J. A., García-González M., Guerrero M. G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6):1163-1174.
- Druesne-Pecollo N., Latino-Martel P., Norat T., Barrandon E., Bertrais S., 2010. Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 127(1):172-184.
- Dubouzet J., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi K., 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4):751-763.
- Dunal F., 1838. Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens. *Ann. Sc. Nat. Bot 2 Sér*; 9:172.
- Elder D., 1992. Consensus Sequences at Transcription Start Sites. *Rvista di Biologia*, 85(1):103-108.
- Foyer C. H., Descourvières P., Kunert K. J., 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 17(5):507-523.
- Fryer M. J., 1992. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment*, 15(4):381-92.
- Gilmartin P. M., Sarokin L., Memelink L., Chua N. H., 1990. Molecular light switches for plant genes. *The Plant Cell*, 2(5):369-378.
- Gloria N. F., Soares N., Brand C., Oliveira F. L., Borojevic R., Teodoro A. J., 2014. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*., 34(3):1377-1386

- Grace M. L., Chandrasekharan M. B., Hall T. C., Crowe A. J., 2004. Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the beta-phaseolin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 279:8102-8110.
- Guillard R. R. L. y Ryther J. H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms, *Cyclotella nana husted* and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 299-239.
- Gutierrez-Millan, L. E., 1996. Acido desoxirribonucleico, proteína y pigmentos durante la carotenogenesis inducida en una nueva cepa de *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*), aislada de una laguna hipersalina de Baja California. CICESE, Tesis de Maestria, Ensenada, 82pp.
- Haili D., Yan D., Jinye M., Qingtao L., Yiqin W., Yunyuan X., Chengcai C., Kang C., Congming L. y Jianru Z., 2007. The *Arabidopsis Spontaneous Cell Death1* gene, encoding a ζ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signaling. *Cell Research*, 17(5):458-470.
- Heber D., 2000. Colorful cancer prevention: Alpha-carotene, lycopene, and lung cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4): 901-902.
- Higo K., Y. Ugawa, M. Iwamoto y T. Korenaga, 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research*, 27(1): 297-300.
- Hong W. K., Sporn M. B., 1997. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278(5340): 1073-1077.
- Jayappriyana K. R., Rajkumar R., Venkatakrishnan V., Nagaraj S., Rengasamy R., 2013. In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3(2): 99-105.
- Johnson E. J., 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care Journal*, 5(2):56-65.
- Kozak M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(20): 8125-8148.
- Laloum T., De Mita S., Gamas P., Baudin M., Niebel A., 2013. "CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?". *Trends in Plant Science*, 18(3):157-166.
- Lao Y. M., Xiao L., Luo L. X., Jiang J. G., 2014. Hypoosmotic expression of *Dunaliella bardawil* zeta carotene desaturase is attributed to a hypoosmolarity-responsive element different from other key carotenogenic genes. *Plant Physiology*, 165:359-372.
- Lao Y. M., Xiao L., Ye Z. W., Jiang J. G., Zhou S. S., 2011. *In silico* analysis of phytoene synthase and its promoter reveals hints for regulation mechanisms of carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. *Structural bioinformatics*, 27(16):2201-2208.

- Lichtenthaler H. K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:47-65.
- Lesser M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 68:253-78.
- Liang M. H., Lu Y., Chen H. H., Jiang J. G., 2016. The salt-regulated element in the promoter of lycopene β -cyclase gene confers a salt regulatory patten in carotenogénesis of *Dunaliella bardawil*. *Environmental Microbiology*, 19(3):982-989.
- Lohr M., Schwender J., Polle J. E. W., 2012. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae. *Plant Science*, 185-186:9-22.
- Maeda K., Kimura S., Demura T., Takeda J., Ozeki Y., 2005. DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (DcPAL1) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Molecular Biology*, 59:739-752.
- Mayne S. T., 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10(7): 690-701
- Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P., 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(1):18-24.
- Olmos J., Gómez R., Rubio V. P., 2015. Apoptosis Comparison Effects Between Synthetic and Natural B-Carotene from *Dunaliella salina* on MDA-MB-231 Brest Cancer Cells. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 7: 51-56.
- Olmos J., Paniagua J., Contreras R., 2000. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1): 80-84.
- Olmos J., Paniagua J., Contreras R., Trujillo L., 2002. Molecular identification of β -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides. *Biotechnology Letters*, 24(5):365-369.
- Olson, J. A., y Hayaishi, O. 1965. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(5):1364-1370.
- Omenn G. S., Goodman G. E., Thornquist M. D., Balmes J., Cullen M. R., Glass A., Keogh J. P., Meyskens F. L., Valanis B., Williams J. H., Barnhart S., Hammar S., 1996. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*., 334(18):1150-1155.
- Paiva S.A. y Russell R. M., 1999. Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5):426-33.

- Palozza P., Serini S., Trombino S., Lauriola L., Ranelletti F. O., Calviello G., 2006. Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂. *Carcinogenesis*, 27(12):2383-2391.
- Paniagua J., 1989. Cultivos de Cepas Puras. En: Buckle L. F., Granados C., Loya D. H., Voltolina D., Morales E. R., 1989. *Manual de Metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas*. (pp. 7-9). CICESE.
- Park H. C., Kim M. L., Kang Y. H., Jeon J. M., Yoo J. H., Kim M. C., Park C. Y., Jeong J. C., Moon B. C., Lee J. H., Yoon H. W., Lee S. H., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y., Hong J. C., Cho M. J., 2004. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiology*, 135:2150-2161.
- Quinn J. M., Eriksson M., Moseley J. L., Merchant S., 2002. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiology*, 128(2):463-471.
- Ramos A., Coesel S., Marques A., Rodrigues M., Baumgartner A., Noronha J., Rauter A., Brenig B., Varela J., 2008. Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* lyc- β gene encoding a functional lycopene β -cyclase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79:819-828.
- Raja R., Hemaiswarya S., Balasubramanyam D., Rengasamy R., 2007. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiological Research*, 162(2): 177-184.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, 295(2):517-524.
- Sadeq Emeish, 2012. Production of natural beta carotene from *Dunaliella* Living in the Dead Sea. *Jordan Journal of Earth and Environmental Sciences*, 4(2):23-27.
- Sambrook K. T., 1989. Polymerase Chain Reaction. In: E. F. Frish, y T. Maniatis (Ed). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (pp. 1150). Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sandmann G., 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1):4-12.
- Sandmann G., 2002. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiologia Plantarum*, 116(4):431-440.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2002. ACTCAT, a novel *cis*-acting element for proline and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 130:709-719.

- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2004. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 45:309-317.
- Shaish A., Avron M., Pick U., Ben-Amotz A., 1993. Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*; 190(3):363-368.
- Shaish A., Harari A., Hananshvili L., Cohen H., Bitzur R., Luvish T., 2006. 9-cis β -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibratetreated patients. *Atherosclerosis*; 189(1):215-221.
- Shewmaker, C. K., Sheehy, J. A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D. Y., 1999, Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 20(4): 401-412.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87-96.
- Sun G., Sui Z., Zhang X., 2008. Cloning and Characterization of the phytoene desaturase (*pds*) gene- a key enzyme for carotenoids synthesis in *Dunaliella* (*Chlorophyta*). *Journal of Ocean University of China*, 7(3):311-318.
- Takaichi S., 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosynthesis and Functions. *Marine Drugs*, 9(6):1101-1118.
- Terzaghi W. B., Cashmore A. R., 1995. Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46:445-474.
- Tsai C. F., Lu F. J., Hsu Y. W., 2012. Protective effects of *Dunaliella salina*-a carotenoids-rich alga - against ultraviolet B-induced corneal oxidative damage in mice. *Molecular Vision*, 18:1540-1547.
- Welsch R., Beyer P., Hugueney P., Kleinig H., Lintig J. V., 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, 211(6): 846-854.
- Willian C., Paniagua J., Olmos J., 2009. The biosynthesis and accumulation of-carotene in *Dunaliella salina* proceed via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. *Natural Product Research*, 23(11):1021-1028.
- Yan Y., Zhu Y. H., Jiang J. G., Song D. L., 2005. Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular *Chlorophyte*, *Dunaliella salina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1466-1469.
- Yang T. y Poovaiah B. W., 2002. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47):45049-45058.

- Ye Z. W., Jiang J. G., Chen Q., 2008. Characterization of cDNA of lycopene beta-cyclase responsible for a high level of beta-carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(3):285-292.
- Ye Z. W., y Jiang J. G., 2010. Analysis of an essential carotenogenic enzyme: zeta carotene desaturase from unicellular alga *Dunaliella salina*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(21):11477-11482.
- Ye Z. W., Liu G. N., Jiang J. G., 2011. Structural and phylogenetic analysis of novel zeta carotene desaturase from *Dunaliella bardawil*, a unicellular alga that accumulates amounts of β -carotene. *Limnology and Oceanography*, 56(1):133-138.

Anexos

Tabla 12. Alineamiento del gen *psy*, a través del programa MEGA7. En las primeras dos columnas se pueden apreciar el organismo que participo en el alineamiento, junto con su número de acceso correspondiente. Las siguientes tres columnas, indican los oligonucleótidos resultantes del alineamiento. Las bases nucleotídicas que se encuentran con una fuente gruesa y en color negro, se refiere a la secuencia referencia utilizada en el alineamiento. Las bases nucleotídicas en color rojo, muestran las diferencias en contraste con la secuencia referencia.

Organismo	#Acceso	psyFw1	psyFw2/psyRv1	psyRv2
<i>Dunaliella salina</i>	AY547325 .1	GAG TAC GCC AAG ACC TTC	GAT TGA GGG CAT GCG CAT	GAA CGA CTA CGA CAA CTT C
<i>Dunaliella sp.</i> 336	DQ46330 6.1	GAA TAC GCC AAG AC G TTC	GAT CGA GGG CAT GCG CAT	GAA CGA CTA TGA CAA CTT C
<i>Dunaliella bardawil</i> strain 847	EU328288 .1	GAG TAC GCC AAG ACC TTC	GTT CCA CTT CCA AGG GAT	GAA TGA CTA CGA CAA CTT C
<i>Dunaliella bardawil</i> strain UTEX2538	DQ05734 2.1	GAG TAC GCC AAG ACC TTC	GAT CGA GGG CAT GCG AAT	GAA TGA CTA TGA CAA CTT C
<i>Haematococcus pluvialis</i>	AY835634 .1	GAG TTC GCA AAG AC G TTT	GAT TGA GGG GAT GCG GAT	GAA TGA CTA TGA CAA TTT T
<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> strain CC-503	XM_0017 01140.1	GAG TAT GCC AAG ACT TTC	GAT AGA GGG AAT GAG GCT	GAA CGA CTA CGA CAA CTT C
<i>Zea mays</i>	DQ35643 0.1	GAG TAC GCC AAG ACA TTC	GAT CGA GGG GAT GCG CAT	CAA CGA CTA CGA CAA CTT C
PREDICTED: <i>Brachypodium</i> <i>distachyon</i>	XM_0035 76773.3	GAG TAC GCC AAG AC G TTC	GGG CGA GGG GAT GCG CAT	CAA CGA CTA CGA CAA CTT C
<i>Auxenochlorella</i> <i>protothecoides</i>	FJ968161. 1	GAG TAT GCC AAG AC G TTT	GAT T GG CGG TAT GCG CAT	CAA CGA CTA CAA CAA CTT C
<i>Oryza sativa</i> Indica Group	DQ35643 1.1	GAG TAC GCC AAG ACA TTC	GGA GGA GGG CAA TCT GGG	CAA CGA TTA CAA CAA CTT C

Tabla 13. Alineamiento del gen *pds*, a través del programa MEGA7. En las primeras dos columnas se pueden apreciar el organismo que participo en el alineamiento, junto con su número de acceso correspondiente. Las siguientes tres columnas, indican los oligonucleótidos resultantes del alineamiento. Las bases nucleotídicas que se encuentran con una fuente gruesa y en color negro, se refiere a la secuencia referencia utilizada en el alineamiento. Las bases nucleotídicas en color rojo, muestran las diferencias en contraste con la secuencia referencia.

Organismo	# Acceso	pdsFw	pdsRv
<i>Dunaliella salina</i>	DQ845248	TGT CTT GGC CTG AGA AGA T	GT GCT GGG TGG CAA GGT
<i>Dunaliella salina</i> UTEX LB200	GQ923693.1	TGT CTT GGC CTG AGA AGA T	GT GCT GGG TGG CAA GGT
<i>Dunaliella bardawil</i>	Y14807.1	TGT CTT GGA CTG AGA AGA T	GT GCT GGG GGG CAA GGT
<i>Haematococcus pluvialis</i>	X86783.1	TCA GCT GGC CTG AGA AGA T	GT ACT AGG CGG CAA GGT
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XM_00169080 7	TCA CTT GGC CGG AGA AGA T	GT GCT CGG TGG CAA GGT
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	FJ968162.1	TTT CGT GGC CCG AGA AGA T	GT GCT GGG AGG CAA GGT
<i>Muriella zofiengensis</i>	EF621405.1	TGA CAT GGC CAG AAA AGA T	GT GCT GGG TGG CAA GGT
<i>Ulva pertusa</i>	KF581158.1	TGA CAT GGC CTG AAA AGA T	GT ACT CGG TGG CAA GGT
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_117498.3	TGA CAT GGC CAG AGA AAA T	GT TCT TGG TGG AAA GAT
<i>Strelitzia reginae</i>	JX117875.1	TGA CTT GGC CAG AGA AAG T	GT TCT GGG TGG AAA GGT
<i>Triticum aestivum</i>	FJ517553.1	TTA CTT GGC CGG AGA AGG T	GT GTT GGG CGG AAA GTT
<i>Hydrilla verticillata</i>	AY639658.1	TCA CTT GGC CAG AGA AAG T	GT ATT GGG TGG CAA GGT
<i>Oryza sativa</i>	AF049356.1	TAA CTT GGC CAG AGA AGG T	GT TTT GGG TGG AAA GAT
PREDICTED: <i>Setaria italica</i>	XM_00498540 6.1	TTA CCT GGC CGG AGA AAG T	GT TTT GGG CGG AAA GGT
<i>Rhododendron kiusianum</i>	LC071467.1	TTA CTT GGC CAG AGA AAA T	GT TTT AGG TGG AAA GGT
<i>Zea mays</i>	NM_00111191 1.1	TTA CTT GGC CGG AGA AGA T	GT TTT GGG TGG AAA GGT
<i>Ipomoea sp. Kenyan</i>	AB499051.1	TTA CGT GGC CAG AGA AAA T	GT GCT GGG AGG AAA GGT
<i>Bixia orellana</i>	KT358997.1	TGA CAT GGC CAG AGA AAA T	GT CCT AGG CGG AAA GGT
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	EU719210.1	TGA CAT GGC CAG AGA AAA T	GT TCT TGG TGG AAA GAT

Tabla 14. Alineamiento del gen *zds*, a través del programa MEGA7. En las primeras dos columnas se pueden apreciar el organismo que participo en el alineamiento, junto con su número de acceso correspondiente. Las siguientes tres columnas, indican los oligonucleótidos resultantes del alineamiento. Las bases nucleotídicas que se encuentran con una fuente gruesa y en color negro, se refiere a la secuencia referencia utilizada en el alineamiento. Las bases nucleotídicas en color rojo, muestran las diferencias en contraste con la secuencia referencia.

Organismo	#Acceso	zdsFw1	zdsFw2/zdsRv1	zdsRv2
<i>Dunaliella salina</i> (UTEX: LB 200)	HM75426 5.1	GTC CAC AGC TGT AGA GCT	GTG GGA CCC CAT TGC CT	ACA TCG AGA GCT TCG AGG
<i>Haematococcus pluvialis</i>	KP759941 .1	GTC CAC AGC TGT AGA GTT	GTG GGA CCC TAT AGC CT	ACA TCG ACT CCA TGG AGG
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> strain CC-503	XM_00170 0734.1	GTC CAC GGC CGT GGA GCT	GTG GGA CCC CAT TGC CT	ACA TTG ACT CCA TGG AGG
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> strain CS-41	GU269622 .1	GTC CAC TGC AGT GGA GCT	GTG GGA CCC AAT TGC CT	ACA TTG ACA GCA TGG AGG
<i>Cocomyxa subellipsoidea</i> C-169	XM_00565 0435.1	GTC CAC TGC TGT GGA GCT	GTG GAA CCC TGT GGC GT	ACA TCG ACA GCA TGG AGG
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	XM_01139 8264.1	GTC CAC GGC GGT GGA GCT	GTG GGA CCC CAT TGC AT	ACA TCG ACT CCA TGG AGG
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATU38550	GTC GAC TGC TGT AGA GCT	GTG GGA TCC TGT TGC TT	ACA TAG ATA GTA TGG AAG
<i>Carica papaya</i>	FJ812088. 1	GTC AAC TGC AGT AGA GTT	GTG GGA TCC TGT TGC AT	ACA TAG ACA GTA TGG AAG
<i>Sorghum bicolor</i>	AY714266 .1	GTC CAC CGC TGT TGA GCT	GTG GGA TCC TGT TGC TT	ACA TTG ACA GCA TGG AAG
<i>Capsicum annuum</i>	NM_0013 24568.1	GTC GAC TGC TGT GGA GCT	GTG GGA TCC TGT TGC AT	ACA TCG ATA GTA TGG AAG
<i>Brassica napus</i>	NM_0013 15877.1	GTC AAC TGC TGT TGA GCT	GTG GGA TCC TGT TGC TT	ACA TAG ATA GTA TGG AAG
<i>Cucumis melo</i>	NM_0013 28475.1	GTC GAC CGC TGT TGA GCT	GTG GGA CCC AGT TGC CT	ACA TAG ATA GCA TGG AAG
<i>Lycium chinense</i>	KJ174516. 1	GTC GAC TGC TGT GGA GCT	GTG GGA CCC TGT TGC AT	ACA TCG ATA GCA TGG AAG
<i>Lycium ruthenicum</i>	KF957707 .1	GTC GAC TGC TGT GGA GCT	GTG GGA CCC TGT TGC AT	ACA TCG ATA GCA TGG AAG

Tabla 15. Alineamiento del gen *lyc-6*, a través del programa MEGA7. En las primeras dos columnas se pueden apreciar el organismo que participo en el alineamiento, junto con su número de acceso correspondiente. Las siguientes tres columnas, indican los oligonucleótidos resultantes del alineamiento. Las bases nucleotídicas que se encuentran con una fuente gruesa y en color negro, se refiere a la secuencia referencia utilizada en el alineamiento. Las bases nucleotídicas en color rojo, muestran las diferencias en contraste con la secuencia referencia.

Organismo	#Acceso	lycBFw	lycBRv
<i>Dunaliella salina</i>	EU327876.1	CAA CTA TGG GTG CTG GGT	CCT TCC TGT ATG CCA TGC
<i>Dunaliella sp.</i> ABRIINW-G4	HQ728089.1	CAA CTA TGG GTG CTG GGT	CCT TCC TGT ATG CCA TGC
<i>Dunaliella sp.</i> KU22	KM016906.1	CAA CTA TGG GTG CAG AGT	CCT TCT TGT ACG TCA TGC
<i>Haematococcus pluvialis</i>	AY182008.1	CAA CTA CGG GGC ATG GGT	CCT TTT TGT ACG CCA TGC
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AY860818.1	CAA CTA TGG TGT CTG GCT	CCT TCC TGT ACG CCA TGC
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	XM_0113994 93.1	CAA CTA TGG CGT CTG GTG	CGT TCC TGT ATG CCA TGC
<i>Zea mays</i>	AY206862.1	CAA CTA CGG CGT GTG GGT	CCT TCC TCT ACG CCA TGC
PREDICTED: <i>Oryza sativa</i> Japonica Group	XM_0157717 49.1	CAA CTA CGG CGT CTG GGT	CGT TCC TCT ACG CCA TGC
<i>Marchantia polymorpha</i>	AB794089.1	CAA TTA TGG AGT TTG GGT	CTT TCT TGT ATG CCA TGC
PREDICTED: <i>Nelumbo nucifera</i>	XM_0102749 26.1	CAA TTA TGG GGT CTG GGT	CAT TTT TGT ATG CAA TGC
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_0010846 62.1	CAA TTA TGG AGT TTG GGT	CGT TCT TGT ACG CTA TGC
PREDICTED: <i>Populus euphratica</i>	XM_0110289 90.1	TAA TTA TGG TGT TTG GGT	CTT TCC TCT ACG CCA TGC
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i>	XM_0104832 38.1	CAA CTA TGG TGT TTG GGT	CGT TCT TGT ACG CCA TGC
PREDICTED: <i>Ricinus communis</i>	XM_0025314 52.2	TAA TTA TGG TGT TTG GGT	CTT TTC TGT ATG CAA TGC