UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de tabaco genéticamente modificado portador del gen *phaC* de *Aeromonas caviae* para la síntesis de polihidroxialcanoatos

Diana Daniela Portela Dussán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología
Medellín, Colombia
2022

Desarrollo de tabaco genéticamente modificado portador del gen *phaC* de *Aeromonas caviae* para la síntesis de polihidroxialcanoatos

Diana Daniela Portela Dussán

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director:

Prof. Ph.D. Silvio Alejandro López Pazos

Codirector:

Prof. Ph.D. Felipe Sarmiento Salazar

Línea de Investigación:

Biotecnología vegetal

Grupo de Investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología

Medellín, Colombia

2022

A mi querido profesor Alejandro Chaparro-Giraldo (Q.E.P.D.) quien guió mi proceso académico y este trabajo.

A Dios por ser mi mentor que guía cada paso de mi existencia; a mi padre, a mi madre, por todo el amor, paciencia, esfuerzo, dedicación y apoyo, y a mis hermanas por el amor y apoyo incondicional que me han brindado.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Diana Daniela Portela Dussán

30/07/2022

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y al Doctorado en Biotecnología.

Al Doctor Silvio Alejandro López Pazos, docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño, por brindarme la orientación en este proyecto, agradezco su paciencia, constancia, enseñanza, apoyo, y acompañamiento durante todo el proceso investigativo.

Al doctor Alejandro Chaparro-Giraldo (Q.E.P.D.), Director del Grupo de investigación Ingeniería Genética de Plantas, por la confianza otorgada para la realización del proyecto en su grupo de investigación, así mismo por su apoyo, enseñanzas y orientación.

Al Doctor Felipe Sarmiento, docente del Departamento de Biología, por su colaboración, enseñanzas, orientación durante este proceso y por haberme apoyado y acogido en el momento más crítico del proceso.

A mi pareja Jairo Andrés Saldarriaga Meneses por su paciencia, compañía y apoyo en la etapa final de este proceso.

A Estefanía Rojas por su colaboración, aportes y apoyo en relación al estudio de parasporinas de *Bacillus thuringiensis* y su perspectiva de producción en tabaco.

A Fabián Villamil Bolaños y a Mariana Moncayo, por todo el apoyo y colaboración en los experimentos del trabajo.

A mis compañeras y amigas Elizabeth Méndez, Luz Adriana Pedraza, Sandra Milena Gonzalez Sayer, y Lizeth Yazmin Tabima, por sus consejos y apoyo incondicional.

A mis compañeros del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Jenny Jiménez, Meike Estrada, Edna Yadira Rodríguez Abril, Luisa Galindo, Julián Mora y Adriana Carolina Rojas, por su colaboración, consejos y amabilidad .

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia - MINCIENCIAS y la Gobernación del Huila por mi beca doctoral (convocatoria 677 de 2014).

Este trabajo fue apoyado por la Fundación para la promoción de la investigación y la tecnología - FPIT del Banco de la Republica de Colombia (proyecto 4552).

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia – MINCIENCIAS, con el proyecto "Identificación de parasporinas de *Bacillus thuringiensis*, para determinar su mecanismo de acción sobre células de cáncer de cuello uterino, y su perspectiva de producción en plantas" (contrato 802-2018, código 123380763011).

Resumen

En este trabajo se planteó un modelo basado en Derechos de Propiedad Intelectual (DPI) para generación de productos de interés industrial en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que aporte en nuevos usos comerciales del cultivo. Este modelo comprende análisis del estado de patentes asociadas a los elementos implicados en un avance biotecnológico, y así establecer una estrategia que permita alcanzar un producto con una carga mínima de patentes asociadas que hagan factible su liberación comercial (denominado Estudio de Libertad de Operación - ELO). Este diseño se usó en el desarrollo de líneas genéticamente modificadas (GM) de tabaco, portadoras del gen *phaC* de *Aeromonas caviae* para síntesis de polihidroxialcanoatos en peroxisomas, para lo cual se realizó un ELO especifico con el cual se estableció un esquema que incluye el uso de casetes de expresión sintéticos de uso comercial para ser clonados en vectores de libre acceso pCAMBIA, transformación del vector en la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (protegida por cinco patentes vigentes hasta 2032), la patente que cubre el método de transformación de este trabajo tiene vigencia hasta 2023. Además se identificaron 16 patentes relacionadas con los elementos relevantes para el desarrollo de una línea GM de tabaco productora de polihidroxialcanoatos en peroxisomas: secuencia promotora, codificante y terminadora, vector de transformación, cepa de *A. tumefaciens* para transformación, y péptido de tránsito, de las cuales 11 se encuentran vigentes. La variedad Samsun con la que se trabajó tiene titulos de obtentor de Variedades vegetales caducados. Se diseñaron dos casetes de expresión con el transgen *phaC* de *A. caviae* y péptido de tránsito a peroxisomas, con ajuste de uso codónico para *N. tabacum* (denominado $PHAC_{Ac}MOD$) y sin modificación de uso codónico (denominado $PHAC_{A.c}$), los cuales fueron insertados en el genoma de tabaco, logrando una frecuencia de transformación de 0.78 % con el transgen $PHAC_{Ac}MOD$ y 3.9 % con el transgen $PHAC_{A.c}$ para la variedad Samsun. Las plantas transformadas produjeron 0.36 mg de polihidrobutirato, con observación de gránulos relacionados en peroxisomas. El modelo experimental basado en DPI fue aplicado a la variedad Virginia k326, proceso cubierto por el mismo tipo y número de patentes, y titulos de obtentor de Variedades vegetales caducados, alcanzando

frecuencias de transformación de 1.56 % con el constructo $PHAC_{Ac}MOD$ y 4.29 % con la construcción $PHAC_{A.c}$. Finalmente, siguiendo el mismo esquema apoyado en DPI, se transformó ambas variedades con un casete de expresión codificante de la parasporina 6 de *Bacillus thuringiensis* (una proteína con actividad anticancerígena) usando procedimientos experimentales idénticos, como perspectiva para producción de biofarmacos en tabaco. En el análisis de propiedad intelectual se identificaron siete patentes que protegen parasporinas en general con vigencia hasta 2033, ninguna patente específicamente cubre a la parasporina 6.

Palabras clave: polihidroxialcanoatos, *Aeromonas caviae*, *Nicotiana tabacum*, Derechos de Propiedad Intelectual, polihidroxibutirato, gen *phaC*, parasporina 6

Development of genetically modified tobacco carrying the *phaC* gene of *Aeromonas caviae* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates

Abstract

Here we present a model based on Intellectual Property Rights (IPR) for the production of industrial goods in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) in order to develop new commercial uses for this crop. This model comprises a Freedom to Operate (FTO) analysis of the patents related to the elements involved in a biotechnological product in order to establish a strategy to develop a product with the minimum associated patent load and, therefore, facilitate its eventual commercialization. This approach was used in the development of Genetically Modified (GM) tobacco lines carrying the *phaC* gene from *Aeromonas caviae* for the production of polyhydrohyalkanoates in peroxisomes. For this, a case specific FTO analysis was carried out. Based on this analysis we outlined a strategy that includes the use of commercial synthetic expression cassettes cloned in free-access vectors (CAMBIA) and the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 with these vectors. This bacterial strain is protected by five patents in force until 2032, but the patent covering the transformation method used here expires in 2023. We identified 16 patents related to relevant elements involved in the development of a GM tobacco line that produces polyhydroxyalkanoates in peroxisomes (promoter, coding and terminator sequences, transformation vector, *A. tumefaciens* strain, and transit peptide). Of these, eleven are still in force. Samsun tobacco variety was protected by Plant Breeder's Rights, but these are now expired. We designed two expression cassettes with the *A. caviae phaC* gene and a peroxisomal transit peptide. The sequence of one of these was adjusted to optimize it for *N. tabacum* codon usage ($PHAC_{Ac}MOD$) while the other was not modified for codon usage ($PHAC_{A.c}$). These expression cassettes were transformed into the tobacco (var. Samsun) genome with a frequency of 0.78 % ($PHAC_{Ac}MOD$) and 3.9 % ($PHAC_{A.c}$). Transformed plants produced 0.36 mg of polyhydroxybutyrate and related peroxisomal granules were observed. This IPR based experimental model was applied to *N.*

tabacum var. Virginia k326, in a process covered by the same type and number of patents and expired Plant Breeder's Rights, with a transformation frequency of 1.56 % for $PHAC_{Ac}MOD$ and 4.29 % for $PHAC_{A.c}$. Following the same IPR based approach and identical experimental methods, both tobacco varieties were also transformed with an expression cassette coding for *Bacillus thuringiensis* parasporin 6 (a protein with anticancer activity) as a perspective for the production of biopharmaceuticals in tobacco. An IP analysis of this gene led to the identification of seven patents protecting parasporins in general, in force until 2033, but none covering parasporin 6 specifically.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, *Aeromonas caviae*, *Nicotiana tabacum*, Intellectual Property Rights, polyhydroxybutyrate, *phaC* gene, parasporin 6.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Lista de figuras ..... **XVIII**

Lista de tablas ..... **XX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XXI**

Introducción **29**

1. Objetivos **33**
Objetivo General 33
Objetivos Específicos 33

2. Marco teórico **35**
2.1. Generalidades sobre Nicotiana tabacum 35
2.1.1. Nicotiana tabacum 35
2.1.2. Condiciones climáticas y edáficas para el cultivo de *Nicotiana tabacum* 37
2.1.3. Etapas del cultivo de *Nicotiana tabacum* 37
2.1.4. Variedades de *Nicotiana tabacum* 38
2.2. Las plantas genéticamente modificadas 39
2.2.1. Componentes requeridos en el desarrollo de una planta genéticamente modificada 43
2.2.2. Tabaco genéticamente modificado como biofábrica 45
2.3. Derechos de Propiedad Intelectual sobre plantas transgénicas 47
2.3.1. Aspectos relevantes de las patentes 48
2.3.2. Títulos de obtentor 51
2.3.3. Libertad de operación 51
2.4. Generalidades de los polihidroxialcanoatos 53
2.4.1. Características fisicoquímicas de los polihidroxialcanoatos 55
2.4.2. Síntesis y degradación de los polihidroxialcanoatos 56
2.4.3. Rutas para la síntesis de los polihidroxialcanoatos 63
2.4.4. *Aeromonas caviae* y polihidroxialcanoatos 65
2.5. Polihidroxialcanoatos en plantas 66
2.5.1. Síntesis de de los polihidroxialcanoatos en el citosol 67
2.5.2. Síntesis de los polihidroxialcanoatos en plastidios 67
2.5.3. Síntesis de los polihidroxialcanoatos en peroxisomas 68

3. Materiales y métodos **70**

3.1. Análisis del estado de propiedad intelectual para Colombia de una línea genéticamente modificada de tabaco productora de polihidroxialcanoatos 70
3.2. Diseño *in silico* de casetes de expresión codificantes de PHA sintasa para la síntesis de polihidroxialcanoatos.....71
3.3. Cultivo de tejidos y transformación de *Nicotiana tabacum* con casete sde expresión codificantes de PHA sintasa 72
3.4. Caracterización de los eventos de transformación obtenidos en *Nicotiana tabacum* con el casete de expresión codificante de PHA sintasa 75

4. Resultados y discusión 79
4.1. Análisis del estado de propiedad para Colombia de una línea genéticamente modificada de tabaco productora de polihidroxialcanoatos 79
4.3. Aspectos relevantes en el diseño de un casete de expresión.....92
4.3.1. Diseño *in silico* casetes de expresión codificante de PHA sintasa para la síntesis de polihidroxialcanoatos 95
4.4. Cultivo de tejidos y transformación de *Nicotiana tabacum* con el casete de expresión codificante de PHA sintasa.....103
4.4.1. Establecimiento del protocolo de regeneración.....103
4.4.2. Transformación de *Nicotiana tabacum* variedad Samsun con *Agrobacterium tumefaciens*.....108
4.4.3. Caracterización polímero 117
4.4.4. Identificación de gránulos de polihidroxialcanoatos en peroxisomas de *Nicotiana tabacum* variedad Samsun 121
4.5. Consideraciones de la transformación de *Nicotiana tabacum* con casetes de expresión codificantes de PHA sintasa basado en DPI.....123

5. Perspectivas 125
5.1. Aplicación del modelo basado en Derechos de Propiedad Intelectual en desarrollo de tabaco genéticamente modificado para sintesis de polihidroxialcanoatos usando la variedad Virginia k326 125
5.1.1. Introducción 125
5.1.1. Metodología.....126
5.1.2. Resultados y discusión 127
5.2 Aplicación del modelo basado en Derechos de Propiedad Intelectual en el desarrollo de tabaco transgénico para la producción de proteínas anticancerígenas de *Bacillus thuringiensis* 139
5.2.1 Introducción.....139
5.2.2 Metodología.....141
5.2.3. Resultados y discusión 141

6. Conclusiones y recomendaciones.....151
6.1. Conclusiones.....151

7. Anexo 153
7.1. ANEXO: Congreso nacional 153
7.2. ANEXO B: Articulo Aceptado publicación.....155
7.3. ANEXO C: Pasantía 156

8. Bibliografía 157

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1. Morfología de la flor de *N. tabacum*.....36
Figura 2-2. Esquema del proceso de transformación genética de plantas. 40
Figura 2-3. Partes de una patente.. 49
Figura 2-4. Diseño del ELO en desarrollo de plantas GM......53
Figura 2-5. Estructura de la enzima PhaA. 57
Figura 2-6. Estructura de PhaB.. 59
Figura 2-7. Estructura de PhaC. 60
Figura 2-8. Rutas metabólicas usadas para la biosíntesis de PHAs en plantas.. 64
Figura 2-9. Biosíntesis de PHAs por la vía de la β-oxidación.....65
Figura 3-1. Esquema de proceso de transformación. 74
Figura 4-1. Estado de libertad de operación de los componentes del constructo de expresión y el método de transformación para el desarrollo de una línea de tabaco que expresa el gen *phaCA.c* de *A. caviae* para síntesis de PHAs en peroxisomas. 87
Figura 4-2. Esquema basado en ELO para desarrollar una línea GM con baja carga de DPI de tabaco productora de PHAs.....90
Figura 5-1. Protocolos de regeneración N. tabacum variedad Virginia k326.. 128
Figura 5-2. Capacidad de regeneración de *N. tabacum* variedad k326. 130
Figura 5-3. Respuesta de *N. tabacum* variedad Virginia K326 al agente de selección...130
Figura 5-4. Respuesta de *N. tabacum* variedad Virginia K326 al agente de selección...131
Figura 5-5. Explantes de *N. tabacum* variedad Virginia k326 transformados con los casetes de expresión $PHAC_{A.c}$ y $PHAC_{AC}MOD$.A 132
Figura 5-6. Efecto casetes de expresión sobre la regeneracion de explantes de *N. tabacum* variedad Virginia k326.. 133
Figura 5-7. Expresión del gen reportero GUS en hojas de plantas regeneradas de explantes variedad Virginia k326 transformados con los casetes de expresión PHACA.c. y PHACACMOD. 134
Figura 5-8. Electroforesis en 1 % de amplificación de fragmento 613 pb correspondiente a $PHAC_{A.c.}$ en plantas transformadas de la variedad Virginia k326.. 135
Figura 5-9 Electroforesis en 1% de amplificación fragmento 613 pb correspondiente a PHACACMOD en plantas transformadas de la variedad Virginia k326.....136
Figura 5-10. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) amplificación fragmento 369 pb correspondiente al gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* en plantas transformadas de la variedad samsun. 136

Figura 5-11. Expresión de los genes de referencia *ef1α* y *AXI1* en las líneas transgénicas de la variedad Virginia K326.....138
Figura 5-12. Expresión de los transgenes $PHAC_{AC}MOD$ y $PHAC_{A.c}$ en las líneas transgénicas de la variedad Virginia k326. 138

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1. Propiedades físicas de PHAs. Fuente: Modificado de (Rehm, 2007). 55
Tabla 2-2. Clasificación de PHA dependiendo de la longitud de la cadena lateral. Fuente: (Rehm, 2007). 56
Tabla 3-1 Protocolos para la regeneración de brotes de *N. tabacum* 72
Tabla 4-1 Patentes relacionadas con el diseño de tabaco GM que expresa en peroxisomas el gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* 81
Tabla 4-2 Componentes de los casetes de expresión *phaC*. 96
Tabla 4-3 Valores de referencia del uso codónico para *N. tabacum* según la base de datos Kazusa Japón. Fuente: (Kazusa, 2020). 96
Tabla 4-4 Optimización uso codónico gen *phaC*.....97
Tabla 4-5 Protocolos de regeneración de *N. tabacum* variedad Samsun. 104
Tabla 4-6 Características térmicas del P4HB. 121
Tabla 5-1 Protocolos de regeneración de N. tabacum variedad Virginia k326 128
Tabla 5-2 Protocolo de regeneración de N. tabacum variedad Virginia k326.....129
Tabla 6-1 Patentes relacionadas con PS con actividad anticancerigenas.....142
Tabla 6-2 Componentes casete de expresion Ps6A 144

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
Ach5FtsZ	Gen ACH especifico de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*
ADATs	Adenosina deaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico transferido
AIA	Hormona vegetal ácido indolacético
AmA1	Gen Antígeno Apical de Membrana
ANA	Hormona vegetal ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
*BamH*I	Enzima de restricción (Proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*)
BAP	Hormona vegetal bencilaminopurina
BktB	Enzima β-cetotiolasa B
Bt	*Bacillus thuringiensis*
CAMV 35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor
CoA	Coenzima A

Símbolo	**Término**
Cry	Proteínas Cry
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
dsADN	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
FabH	Enzima 3- cetoacil-acil ACP sintasa III
FadA	Enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa
FadB	Enzima 3HA-CoA dehidrogenasa
FadD	Enzima acil-CoA sintetasa
FadE	Enzima acil-CoA dehidrogenasa
FadG	Enzima β-cetotoacil-ACP reductasa
FP	Primer directo (Forward primer)
GM	Genéticamente modificado
GAP	Proteínas asociadas a los gránulos de PHAs.
GFP	Proteína verde fluorescente
Glicox	Péptido de tránsito hacia peroxisomas
GUS	Gen reportero *GUSA-intron*
His tag	Etiqueta de polihistidina
*Kpn*I	Enzima de restricción (Proveniente de *Klebsiella pneumoniae*)
mcl-PHA	Polihidroxialacanoatos con polímeros de cadena media
M-MulV	Transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus
nphT7	Gen *AcetoacetII-CoA sintasa*
*npt*II	Gen *Neomicin fosfotransferasa*
ORF	Marco abierto de lectura
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Símbolo	**Término**
PCR+	Plantas PCR positivas
phaA	Gen polihidroxialcanoato A
PhaA	Enzima β-cetotiolasa
$PHA_{AC}MOD$	Casete de expresión modificado
phaB	Gen polihidroxialcanoato B
PhaB	Enzima acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH
phaC	Gen polihidroxialcanoato C
PhaC	Enzima PHA sintasa
$phaC_{AC}$	Gen *Polihidroxialcanoato sintasa*
phaCBA	Operon phaC
phaG	Gen polihidroxialcanoato G
PhaG	Enzima 3HA-ACP:CoA transacilasa
phaJ	Gen polihidroxialcanoato J
PhaJ	Enzima enoil-CoA hidratasa
PhaM	Enzima multifuncional relacionada con síntesis de PHAs
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PhaZ	Enzima PHB despolimerasa
PHB	3R-polihidroxibutirato
phbB	Gen *Acetoacetil-CoA reductasa*
PHBs	Polihidroxibutiratos
PHH	Polihidroxihexanoato
PHV	Polihidroxivalerato
P-NOS	Promotor de la nopalina sintasa
PS	Parasporinas
R-3-HB	Monómeros de R-3-hidroxiacil butirato

Símbolo	Término
R-HA	Ácidos R-3 hidroxicarboxílicos
RP	Primer reverso (Reverse primer)
scl-PHA	Polihidroxialcanoatos con monómeros de cadena de corta
SKI2	Gen *SuperKiller 2*
ssADN	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
T-nos	Terminador de la nopalina sintasa
var.	Variedad
Vit	Vitaminas

Compuestos químicos

Símbolo	Término
$CHCl_3$	Triclorometano
CO_2	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
K_4Fe	Ferrocianuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
Mg	Magnesio
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
N	Nitrógeno
Na_2EDTA	Disodio etilendiaminotetraacético dihidrato
NaCl	Cloruro de sodio

Símbolo	Término
NaH_2PO_4	Fosfato monosódico
$NaOCl_2$	Clorito de sodio
O	Oxígeno
P	Fósforo
S	Azufre
Tris	Trisaminometano

Medios de crecimiento

Subíndice	Término
LB	Medio de crecimiento para bacterias Luria Bertani
MS	Medio básico de crecimiento para plantas Murashige & Skoog
SOC	Medio de crecimiento para bacterias superóptimo con represión de catabolitos
YPD	Medio de crecimiento para bacterias levadura peptona dextrosa

Símbolos

Superíndice	Término
°C	Grados centígrados
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Cm	Centimetro
g/L	Gramos por litro
H	Horas
ha, has	Hectarea, hectáreas
J/g	Joules por gramos
kDa	Kilodalton

Superíndice	Término
kV	Kilovoltios
Mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
Min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Micromolar
Nm	Nanometros
Rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
Tg	temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
Ton	Tonelada
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV-VIS	Espectroscopia ultravioleta-visible
ΔHm	Entalpia de fusión
Λmax	Absorbancia

Abreviaturas

Abreviatura	Término
%AT	Porcentaje de adeninas y timinas
% GC	Porcentaje de guaninas y citosinas
CAI	Indice de adaptación de codones

Abreviatura	Término
CMV	Virus del Mosaico del pepino
DO	Densidad óptica
DPI	Derechos de Propiedad Intelectual
DSC	Calorimetría diferencial - de barrido
ELO	Estudio de Libertad de Operación
FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
GM	Genéticamente Modificado.
IPC	Código internacional de patentes
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
Nc	Numero efectivo de codones
OMPI	Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
OMS	La Organización Mundial de la Salud.
PBR	Título de Obtentor
PCT	Tratado de Cooperación en materia de Patente
PRSV	Potyvirus de la mancha anular de la papaya
PVX	Papa resistente al Virus X
PVY	Papa resistente al Virus Y
RDP	Resistencia Derivada de Patogénos
TMV	Tabaco resistente al Virus del Mosaico
UPOV	Protección de Nuevas Obtenciones Vegetales
VGD	Software Visual Gene Developer

Introducción

El cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) aporta 40 millones de empleos en el mundo, con producción de cuatro millones de toneladas. Solo en Colombia esta actividad genera alrededor de 250 jornales/hectárea, con área de siembra de 1796 hectarea, producción de 3592 toneladas comercializadas, generando dividendos aproximados de 11 millones de dólares en exportaciones, donde se produce principalmente en los departamentos de Sucre, Santander y Huila (MinAgricultura, 2020). Las condiciones climáticas y edáficas de las regiones donde se cultiva tabaco favorecen su desarrollo durante todo el año y constituye un renglón agricola importante para Colombia. Sin embargo, a partir del año 2010, la producción a nivel nacional ha disminuido paulatinamente debido a los altos costos de producción, con reducción del área de siembra, cierre de actividades de compra de cosechas por parte de las tabacaleras British American Tobbaco y Philiph Morris International, sumado al impacto negativo que representa el consumo de cigarrillo para la salud que ha obligado a las entidades gubernamentales a regular la producción y comercialización de este derivado, incluyendo la implementación del acuerdo marco del control de tabaco liderado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que intensifica los impuestos a producción de cigarrillos como medida para desalentar el consumo, situación que ha favorecido el contrabando de cigarrillos afectando directamente a pequeños y grandes productores (MinAgricultura, 2020). Actualmente el único comprador de la hoja de tabaco es laindustria nacional, perjudicando la estabilidad de alrededor de 7000 familias, la política agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural (MADR) ha venido trabajando para fortalecer la cadena a través estrategias de financiamiento, adecuación de tierras e infraestructura de secado, acompañamiento técnico y búsqueda de alternativas para el cultivo. En este contexto se propone generar tabaco genéticamente modificado (GM), o transgénico, a través de la inserción de genes que le confieran propiedades de interés industrial como una opción viable, como se ha evidenciado para la industria farmacéutica donde se ha puesto en contexto la producción de fármacos en plantas, puesto que los cultivos no

requieren de equipos y sistemas especializados, e incluso la parte operativa del proceso es sencilla una vez se ha logrado obtener material vegetal GM adaptado a campo para sembrar en masa (Whittall et al., 2021). La producción de plantas GM con diversos fines, p.ej. producción de fármacos, fibras o plásticos, tienen ventajas como disminución de costos (menor infraestructura que la contraparte de bioreactores), alta concentración de biomasa, síntesis especifica en tejido o compartimiento celular, menor probabilidad de contaminación con microorganismos infecciosos y menor gasto de energía (Moon et al., 2020).

La síntesis de polihidroxialcanoatos (PHAs), un tipo de poliéster producido por diversas especies de bacterias, ha sido usado como materia prima en la industria del plástico para generar un material biodegradable y seguro para la salud y el ambiente (Shafei et al., 2018). La principal limitante de producción en biorreactores de plásticos derivados de PHAs es el alto precio, debido a que estos son sintetizados por algunos microorganismoscuando existe una limitación de nutrientes esenciales o exceso de fuente de carbono, por lo tanto, a gran escala requiere de alta demanda de carbono externa que incrementa costos (Koller & Mukherjee, 2022). La posibilidad de generar estos PHAs en vegetales puede ser eficiente a partir de inserción de genes codificantes de enzimas mediadoras de su biosíntesis en rutas metabólicas esenciales como glucolisis, ciclo de Krebs, β-oxidación, síntesis de ácidos grasos *de novo*, catabolismo de aminoácidos y el ciclo de Calvin (Yadav et al., 2021). Las aproximaciones realizadas hasta el momento en arroz (*Oryza sativa*), nabo (*Brassica rapa*), *Arabidopsis thaliana*, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y *N.tabacum*, a partir de la inserción de genes *phaA*, *phaB* y *phaC* de las bacterias *Cupriavidus necátor*, *Aeromonas caviae* y *Pseudomonas aeruginosa* han permitido producción de polihidroxibutiratos (PHBs) y copolimeros como PHB-polihidroxivalerato (PHV) y PHB-PHV-polihidrohexanoato (PHH). Desafortunadamente, se ha evidenciado que su biosíntesis en citosol y plastidios genera esterilidad y retraso en el crecimiento de las plantas (Mittendorf et al*.,* 1998; Slater et al*.,* 1999; Poirier et al*.,* 2002; Lössl et al*.,* 2005). En contraste, la síntesis de PHAs en peroxisomas ha permitido obtener polímeros en tejidos vegetales sin generar efectos negativos en las plantas, sin embargo, los niveles de producción son bajos (Hahn et al*.,* 2000; Arai et al., 2002, Tillbrook et al., 2014). Teniendo en cuenta que en experiencias previas en *N. tabacum*, la producción de PHB en cloroplastos y en citosol afectaron el crecimiento

de plantas transformadas (Bohmert, 2002), conducir la síntesis de PHAs en peroxisomas de *N.tabacum* tiene la posibilidad de disminuir efectos deletéreos en el desarrollo, al tiempo que se da la síntesis de PHAs en este compartimiento subcelular.

Es importante resaltar que el desarrollo de una línea GM de tabaco que pueda ser económicamente viable para los agricultores debe tener potencial de liberación en el mercado, sin embargo, la producción de este tipo de desarrollos biotecnológicos basados en plantas GM requieren un paquete tecnológico que contiene Derechos de Propiedad Intelectual (DPI) basados en patentes a las que se debe acceder por pago de regalías, lo cual puede limitar su acceso (OMPI, 2022) (Hincapié & Chaparro-Giraldo, 2014). Esta limitante puede ser controlada si se genera una planta GM libre de DPI, o con acuerdos de licenciamiento. Para alcanzar un producto GM altamente libre de DPI se puede aportar un análisis de patentes, u otros tipos de protección intelectual, de los elementos usados en el proceso de desarrollo que permita identificar alternativas a las reinvindicaciones que afectan el producto, lo cual se denomina Estudio de Libertad de Operación (ELO) (Rojas Arias, 2017).

Establecer un modelo basado en DPI para modificación genética de *N. tabacum* enfocado a la producción biotecnológica de insumos para la sociedad es un aporte dirigido a explorar nuevos mercados para este cultivo, diferentes a la elaboración de cigarrillos, que puede favorecer la estabilidad económica de la cadena productiva, y quizás fortalecería la capacidad de producción en sectores industriales. En este trabajo se establece un modelo basado en generar un sistema biológico fundamentado en un ELO, para obtener tabaco GM para producción de PHAs usando un transgén dirigido a la síntesis de mezclas de polímeros de cadenas cortas y largas en peroxisomas. Este modelo de base en DPI proporcionó la pauta para su posterior aplicación en otras variedades de tabaco comerciales, con la perspectiva de ser aplicado en otros ámbitos de interés, como la producción de medicamentos para la industria farmacéutica.

1. Objetivos

Objetivo General

Producir líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L. portadoras del gen *phaC* de *Aeromonas caviae* para la síntesis de polihidroxibutirato bajo un esquema de Derechos de propiedad intelectual.

Objetivos Específicos

- Establecer el estado de la propiedad intelectual de los elementos implicados en desarrollo de líneas transgénicas de tabaco productoras de polihidroxialcanoatos.

- Diseñar un casete de expresión para síntesis de PHA sintasa en *Nicotiana tabacum*.

- Caracterizar los eventos de transformación obtenidos en *Nicotiana tabacum* con el casete de expresión codificante de PHA sintasa.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades sobre Nicotiana tabacum

2.1.1. Nicotiana tabacum

El tabaco (*N. tabactum* L.) es una hierba perenne, con características de plantas vasculares y dicotiledóneas, perteneciente a la familia Solanaceae. Es una especie anfidiploide (2n = 48) producto del cruce entre *N. sylvestris* y *N. tomentosa*, originaria de la región andina de Suramérica entre Perú y Ecuador. Durante la colonización de América este cultivo se extendía por todo el continente, y en 1959 fueron introducidas sus semillas en España por los colonizadores; a partir de este momento su cultivo se extendió por todo el mundo (Knapp et al., 2004; Yukawa et al., 2006; Edwards et al*.,* 2017).

Se caracteriza por presentar una raíz larga y fibrosa, tallo grueso velloso y subleñoso que puede llegar a tres metros de altura, que en su extremo superior se ramifica para dar origen a las hojas que se caracterizan por ser grandes y densas de morfología ovalada, lanceolada o acorazonada, distribuidas en cada lóbulo del tallo en espiral ascendente, y en la mayoría de las variedades la hoja numero 1 se reencuentra con la hoja numeros 8 o 13, mientras que las hojas inferiores están ubicadas en un ángulo horizontal, las cuales son grandes, densas, lanceoladas, alternas y poseen un color verde pálido (Lewis, 2020).

Las flores son hermafroditas, gamopétalas de color rosado con una corola pubescente, cáliz de 3.5 cm, y una longitud entre 6 a 10 cm; cada flor posee cinco anteras y un estigma central (Figura 2-1). La etapa de floración se produce entre 100 a 190 días después de la germinación. Esta especie es insensible al fotoperiodo, aunque existen algunos genotipos que florecen en fotoperiodos cortos; puede florecer durante varios años en ambientes propicios para su desarrollo una vez se inicia la inflorescencia primaria. La panícula

terminal de la inflorescencia primaria puede producir docenas de flores, y en cada rama axial pueden existir ramas de flores y cada flor puede producir una capsula ovoide de 15 a 20 mm, donde alberga hasta 3000 semillas (Lewis, 2020)

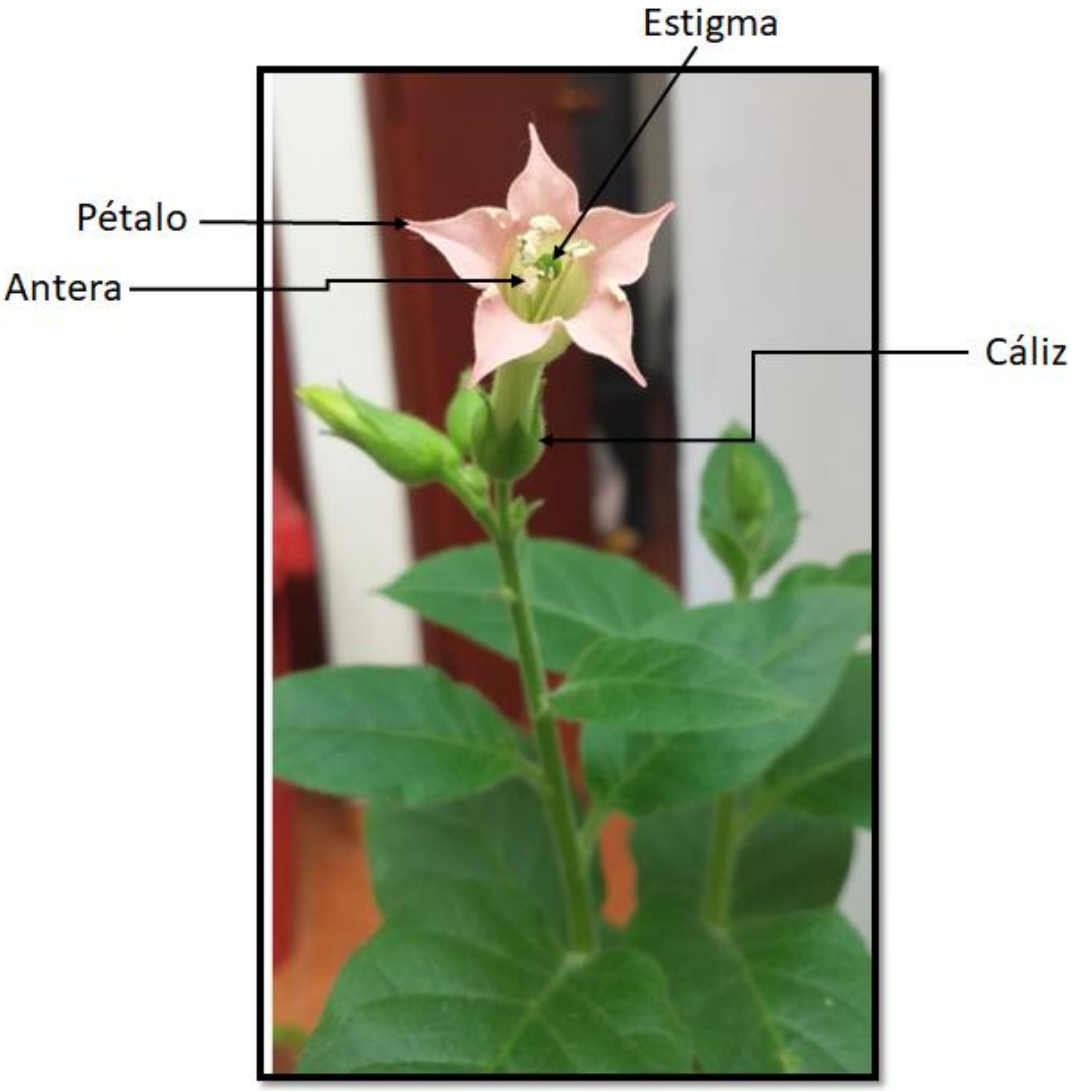


Figura 2-1. Morfología de la flor de *N. tabacum*.

Las semillas son dicotiledóneas endospérmicas, de color castaño oscuro y arriñonado. Estas semillas están recubiertas por una envoltura conformada por la testa y endospermo, responsables de la dormancia sobre la protuberancia de la radícula. El endospermo contiene lípidos y proteínas que son sintetizadas en la etapa de maduración de la semilla para suministrar nutrientes al embrión, durante la germinación, y a la plántula. La germinación consiste en la emergencia de la radícula a través de la testa y endospermo,

es inducida por la imbición de las semillas entre 18 - 23ºC, y bajo oscuridad, después de 7 - 12 días, por medio de la emergencia de la radícula a través de la testa y endospermo (Onelli et al., 2017).

La composición química de las hojas de *N. tabacum* está conformada por glúcidos (40 %), cenizas (24-29 %), oxido de potasio (3.51-4.86 %), oxido de sodio (0.02-0.15 %), cloro (0.5 -3%), oxido de magnesio (0.5-2%), nitrógeno (N) (2-5 %), nicotina (3 %) (Tremols et al., 2012; Capdesuñer et al., 2016). El tallo está compuesto de alcaloides (0.5-0.62 %), nitratos (0.-2- 7.29 %), glucosa (0-5.17 %), fructuosa (0-6.15%), sacarosa (0.38-2.08 %), ácido cítrico (0.34-0.77 %), acido málico (2.21/4.81 %), ácido oxálico (1.06-1.23 %) y N (0.88-0.91 %) (Sung & Seo, 2009).

2.1.2. Condiciones climáticas y edáficas para el cultivo de *Nicotiana tabacum*

Los factores ambientales intervienen en la duración del ciclo vegetativo de *N. tabacum*. Su cultivo se desarrolla desde 45º de latitud norte hasta 30º de latitud sur. La temperatura óptima está entre 18 - 28ºC, es necesario tener en cuenta que las temperaturas óptimas varían según las etapas de crecimiento; durante su crecimiento en semilleros la temperatura adecuada es de 16ºC, para la fase de trasplante hasta la recolección se requiere un periodo libre de heladas entre 90 -100 días (Hawks & Collins, 1986; Henry et al., 2019). La humedad es determinante en la finura de la hoja, se ha evidenciado que en regiones secas las plantas producen hojas con mayor contenido de nicotina que en las regiones húmedas, este cultivo no requiere un exceso de agua. Su cultivo es óptimo en suelos franco arenosos, profundos, fértiles y no inundables, con un pH ligeramente ácido para tabacos de hoja clara, y ligeramente alcalino para tabacos de tipo oscuro (Hawks & Collins, 1986; Henry et al., 2019).

2.1.3. Etapas del cultivo de *Nicotiana tabacum*

El cultivo de tabaco inicia con la etapa de semillero, un 95 % se realiza en bandeja flotante, y el 5 % de forma tradicional a través de la raíz desnuda. Después de seis semanas la planta alcanza 15 cm de altura y 5 mm de espesor (González & William, 1998; Finagro, 2018). La segunda etapa es la de trasplante, que se realiza con máquinas trasplantadoras

de dos o más hileras, además contiene pinzas las cuales capturan la planta en posición invertida, estas plantas son giradas y colocadas en un surco que va abriendo la máquina (González & William, 1998; Finagro, 2018). La siguiente etapa es el riego, la planta en su estado vegetativo contiene un 90 % de su peso en agua, por lo cual el riego debe ser moderado, puesto que un exceso de agua puede ocasionar una excesiva formación de nerviaciones en las hojas y menor contenido de nicotina, así mismo un suministro deficiente de agua genera un bajo rendimiento y un producto poco combustible. Una vez se realiza un riego inicial después del trasplante, se deben aplicar 4 - 6 riegos, después de 15 - 20 días del riego inicial. El riego adecuado es por aspersión porque favorece la formación de hojas finas sin nervaduras gruesas (González & William, 1998; Finagro, 2018). La cuarta etapa es la conducción, que contempla el plan de fertilización, control de malezas a través de la aplicación de herbicidas a base del compuesto Quizalofop-P-ethil para eliminar gramíneas, eliminación de las primeras hojas de la parte inferior del tallo y despunte y desbrote. Las hojas son cosechadas entre 90 - 100 días. La última etapa es el curado, este se genera una vez las hojas son maduras que se tornan de verde a amarillo pálido, en este ciclo los azucares y las sustancias nitrogenadas emigran hacia el tallo. Las hojas son recolectadas y secadas en estufa para ser comercializadas (González & William, 1998; Finagro, 2018).

2.1.4. Variedades de *Nicotiana tabacum*

Las variedades de *N. tabacum* se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo con la técnica de secado que se aplica según el contenido de nicotina, N y azucares en las hojas, los cuales varían entre variedades. Los cuatro grupos son: curado en atmosfera artificial (flue-cured), curado al aire, curado al fuego y curado al sol (Finagro, 2018).

El proceso de secado del grupo Flue-cured se da en un recinto cerrado en el que se distribuye el calor generado por una estufa a través de chimeneas o tuberías, este curado dura aproximadamente una semana. Las variedades curadas por aire son secadas en estructuras techadas, pero con laterales abiertos de tal forma que se genere la circulación libre del aire, las hojas son colgadas en el techo y su secado dura dos meses. Las variedades curadas por fuego son exhibidas a fogones de leña para secar sus hojas, este tipo de curado se usa en mezclas de tabaco para pipa, rapé y tabaco para mascar. El

curado al sol de hojas de tabaco les proporciona a las variedades sometidas a este proceso robustez en su sabor (Finagro, 2018; McMurtrey, 2017).

2.2. Las plantas genéticamente modificadas

Hace alrededor de 9500 años se generaron los primeros indicios de domesticación de las plantas que se conoce actualmente. Intuitivamente los agricultores seleccionaban las semillas o frutos que eran más sencillos de cultivar y tenían mejor sabor. Los primeros cultivos domesticados fueron el trigo y la cebada. Posteriormente, alrededor de 7500 a.C., fueron domesticados el arroz y la soya, hace 3500 años a.C. fue domesticado el maíz, el frijol y la calabaza, y hace 2500 años a.C. fue domesticada la papa (Díaz Guillén, 2010; Fuller, 2007). Actualmente se cuenta con 12 especies de cereales, 23 especies de hortalizas y 35 especies de frutas domesticadas (Asociación de Semilleros Argentinos, 2015; Chacón-Sanchez, 2009).

En la época moderna con los avances de la ciencia se comprendieron con mayor profundidad los procesos de domesticación de plantas. En 1859, Charles Darwin maravillado con la cantidad de variedades vegetales domesticadas dedicó su primer capítulo de su obra “el origen de las especies” una explicación sobre la selección artificial y natural en la domesticación, y los efectos de la hibridación y autofecundación en el proceso (Chacón-Sanchez, 2009). En 1865 y 1866 Gregor Mendel realizó cruzamientos entre diferentes clases de arvejas concluyendo que los factores (genes) en el polen y en los óvulos son los que determinan las características de las semillas (descendencia), con su descubrimiento estableció las leyes de la herencia que dieron origen a la Genética. Después de 34 años, se retomaron las leyes de Mendel como base del fitomejoramiento. Entre 1918 a 1926 Shull, Edward East y Donald Jones lograron obtener líneas de maíz a través de la autofecundación, y posteriormente la producción de semillas hibridas que aumentaron la producción comercial (Malacarne & Reynolds, 2015). Posteriormente, los fitomejoradores evidenciaron que para seleccionar las mejores plantas se necesitaba que existiera variabilidad, sin embargo, algunos cultivos como el trigo y el arroz tienen poca variabilidad genética, por lo que los fitomejoradores inicialmente la desarrollaron realizando cruzamiento entre plantas emparentadas, luego usando mutaciones con agentes químicos o físicos, y finalmente con la inserción de genes por ingeniería genética de plantas. Las plantas GM fueron obtenidas a partir de modificación de su ADN mediante métodos de

ingeniería genética con el objetivo de introducir nuevas características a la planta a través de la inserción de uno más genes foráneos (Herrera-Estrella et al., 1983) (Figura 2-2).

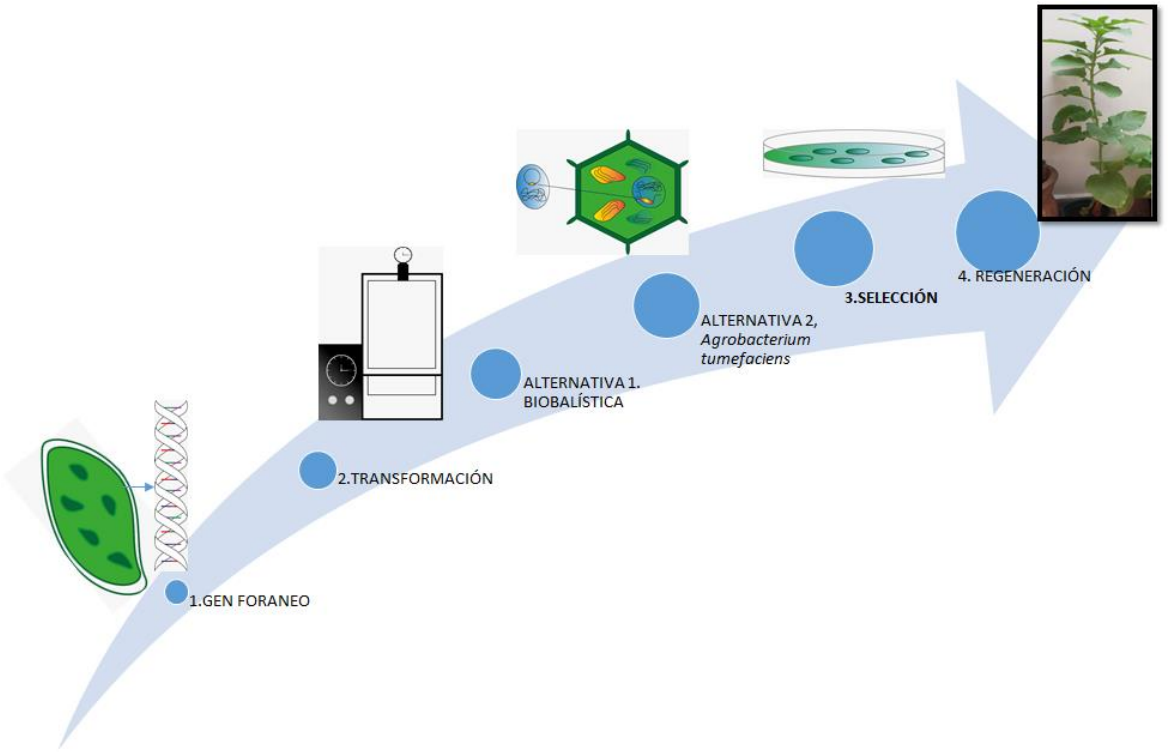


Figura 2-2. Esquema del proceso de transformación genética de plantas. Un gen es insertado en el genoma vegetal por medio de biobalistica o la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, para posteriormente seleccionar los eventos GM.

Los primeros protocolos de transformación plantas GM, o transgénicas, se realizaron en 1983, por el ingeniero bioquímico Luis Herrera-Estrella y su equipo de trabajo (Herrera-Estrella et al., 1983), y posteriormente lograron transformar frijol para resistencia a toxinas, con desarrollo de protocolos para transformación genética de tomatillo, papaya, maíz criollo y espárrago (Herrera-Estrella & Simpson, 1995; Assad-García et al., 1992). En 1994 se introduce la primera planta de algodón GM resistente a insectos (Malacarne & Reynolds , 2015).

Las plantas GM han favorecido el desarrollo de diversas actividades para fortalecer sectores como la agricultura, la industria farmacéutica, entre otros. En agricultura se ha logrado incrementar productividad al proteger los cultivos contra plagas, enfermedades,

malezas, sequías y salinidad en suelos, o con regeneración de suelos contaminados con metales pesados, retraso de la maduración de los frutos para reducir el tiempo de almacenamiento, y mejora nutricional de frutos (ISAAA, 2021). Dentro de algunos desarrollos relevantes en plantas GM para el sector agrícola se encuentran:

- Tomate GM con maduración tardía y mayor contenido de sólidos, reduciendo expresión de genes codificantes de proteínas involucradas en degradación de la pared celular y biosíntesis de etileno, ha sido desarrollado a partir de la tecnología antisentido, el cual consiste en introducir un ARNm complementario al ARNm del gen de interés, estos dos genes forman una estructura de dos hebras de tal forma que se “silencia” la síntesis de la proteína (Smith, et al., 1999).
- El mejoramiento de los componentes nutricionales en cereales y leguminosas se ha logrado en tabaco y canola GM que sintetizan proteínas con mayor contenido de metionina (Altenbach, 1989), además se obtuvo soya y canola GM que poseen un mayor contenido de lisina mediante modificación de las enzimas involucradas en su síntesis (Falco, et al., 1995). De igual forma, en la papa se ha logrado aumentar el contenido de aminoácidos esenciales mediante inserción de un gen del amaranto que codifica una proteína no alergénica (*AmA1*) (Chakraborty, 2000). El arroz es uno de los alimentos más consumidos en Asia, es por ello que se han insertado en arroz GM, denominado arroz dorado, tres genes codificantes de las proteínas para síntesis de β-caroteno (Pro-vitamina A), expresando en el endospermo de la semilla la vitamina A, importante en regiones asiáticas donde hay deficiencia de alimentos ricos en esta vitamina (Ye, X et al., 2000).
- Introducción de genes codificantes de proteínas Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que tienen actividad insecticida sobre insectos del orden Coleóptera, Lepidóptera y Díptera para mejorar resistencia a plagas. Hasta la fecha se han logrado plantas GM resistentes a insectos de algodón, papa, maíz, canola, soya y arroz. Hoy en día se comercializan plantas GM de maíz Bt resistentes al barrenador del maíz, papas Bt resistentes al escarabajo colorado, algodón Bt resistente al gusano rosado. Se ha desarrollado arroz Bt hibrido con resistencia al bordeador de hojas y barrenador amarillo del tallo, sin embargo, aún no ha obtenido aprobación para su liberación comercial (Abbas, 2018).

- Desarrollo de plantas GM resistentes a virus, bajo el concepto de resistencia derivada de patogénos (RDP), que consiste en la inserción de genes del patógeno en la planta. El tabaco resistente al virus del mosaico del tabaco (TMV) fue la primera planta GM desarrollada por RDP. Posteriormente, fueron desarrolladas plantas de calabaza amarilla GM resistente al virus del mosaico amarillo; papa resistente al virus X (PVX) y virus Y (PVY) pepinos GM resistentes al virus del mosaico del pepino (CMV), y papaya GM resistente a la mancha anular de la papaya (PRSV). Actualmente la calabaza GM resistente al virus del mosaico amarillo y papaya GM resistente a (PRSV) son comercializados (Zhao et al., 2019).
- La tolerancia a herbicidas de cultivos es una estrategia para aumentar la productividad de cultivos, al permitir un control de las malezas que inhiben el crecimiento y desarrollo adecuado de cultivos por la liberación de sustancias químicas, o por competir por recursos naturales esenciales para crecimiento. En este sentido, se han desarrollado plantas GM tolerantes a glifosato y glufosinato. Se ha logrado resistencias a glifosato en soya, tabaco, tomate, canola, algodón y remolacha azucarera. La resistencia a glufosinato se ha obtenido en caña de azúcar, arroz, maíz, canola y algodón. De igual forma se han desarrollado plantas de colza resistentes al herbicida boximil (Mall et al., 2019).
- Plantas GM tolerantes a estrés abiótico es una estrategia para contrarestar los efectos del cambio climático en cultivos agrícolas, a través de la inserción de genes asociados con la producción de osmolitos y de factores de transcripción (Carvajal-Campos & Jiménez, 2021). La Glicina-Betaína es un carbohidrato establizador de la membrana citoplasmática en condiciones de estrés abiótico, este carbohidrato es sintetizado a partir de colina y glicina, mediante las enzimas monooxigenasa y la betaína aldehído deshidrogenasa; los genes codificantes de estas enzimas han sido transferidas a plantasn GM de papa y tomate para confirer tolerancia a la sequía (Goel et al., 2011; Li et al., 2014. La trehalosa es un osmolito usado como osmoprotector por microorganismos cuando estan en condiciones de estrés abiótico y en las denominadas plantas de resurrección (*Myrothamus flabellifolius*) caracterizadas por su resistencia a la sequía. Los genes implicados en la síntesis de trehalosa trehalosa-6- fosfato sintasa (*TPS*) y trehalosa-6- fosfato fosfatasa (*TPP*) han sido transferidos a

plantas GM de maíz y tomate con el fin de conferir tolerancia a la sequía (Lyu et al., 2013).

Factores de transcripcion como MYB, WRKY, NAC, DREB, estan implicados en la regulación de genes de respuesta a estrés abióticos han sido usados para la transformación genética de papa y tomate tolerantes a la salinidad, maní y maíz tolerante a la sequía (Aydin et al., 2014; Kiranmai et al., 2018; Gao et al., 2020).

2.2.1. Componentes requeridos en el desarrollo de una planta genéticamente modificada

Para el desarrollo de una planta GM se requiere de un casete de expresión conformado por un promotor, secuencia codificante y secuencia terminadora. Se requiere vector de transformación, un método de transformación, y establecimiento de un cultivo de tejidos vegetales que permita la selección y regeneración de los explantes transformados. Se describen brevemente a continuación:

- Promotor es la región de ADN ubicada aguas arriba en el extremo 5´ que regula en *cis* la expresión de genes adyacentes. Los promotores están conformados por una región central (50-100 pb) contiguo al sitio de iniciación que posee una caja TATA y un elemento iniciador. Regiones de regulaciones proximales (compuesta de cajas CAAT y CG) y secuencias reguladoras distales que regulan la actividad del núcleo del promotor como intensificadores que potencian la y silenciadores que inhiben activadores y reducen la transcripción. De acuerdo con el funcionamiento, tipo y nivel de expresión, los promotores usados en la ingeniería genética vegetal son clasificados en: constitutivos, tejido-específicos, inducibles y sintéticos. El promotor constitutivo regula la expresión de genes ubicados en aguas abajo en todos los tejidos, independiente de las condiciones ambientales o del estadio de desarrollo. Los niveles de expresión de los genes regulados bajo este promotor varían entre los tejidos a pesar de actuar en todos los tejidos. Un promotor tejido-especifico genera expresión del gen en un tejido en especial, por ejemplo hojas o raíces. El promotor inducible, es activado cuando existe estímulos químicos o físicos endógenos o externos, permitiendo controlar la expresión espacial y temporalmente, actúan en tejidos específicos o en una etapa determinada de desarrollo de la planta (De Guglielmo, 2016).

- Terminador es la secuencia terminadora comprende unos 40 pares bases ricas en regiones GC, seguido de 6 o más A, la región rica en GC forma una estructura en horquilla por complementariedad de bases, esta horquilla junto con las 6 o más A, son una señal para la separación de la ARN polimerasa del ADN y dar por terminada la transcripción (Shabani, 2019).
- El vector de transformación contiene genes marcadores que permiten seleccionar las células transformadas, estos genes están regulados por un promotor fuerte que funciona bien en las plantas. Los genes de selección codifican proteínas que generan resistencia a antibióticos o tolerancia a herbicidas, en la mayoría de los casos estos genes son de origen microbiano. Para que la selección sea efectiva la célula vegetal sin transformar debe ser susceptible al agente de selección. Los vectores de transformación además contienen un sitio de multiclonación, conformado por enzimas de restricción donde se introduce el gen deseado, un origen de replicación bacteriano y si se usa el método de transformación con *A. tumefaciens* una región T-ADN que es transferida a la planta (Low et al., 2018).
- Existen métodos de transformación directos capaces de transferir ADN a cualquier célula o tejido a través de un procedimiento físico como la biobalística, que transfiere el ADN a partir del bombardeo de las células con microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos de ADN, este método es frecuentemente usado en especies recalcitrantes a la transformación. Otro de los métodos directos es la transfección de protoplastos a través de la electroporación en donde se produce la apertura transitoria de poros a través de una descarga eléctrica, la formación de poros permite el intercambio entre el exterior e interior celular y el ingreso del ADN (Low et al., 2018). La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método indirecto basado en el modelo de infección que genera la bacteria en plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas. La bacteria genera tumores en las plantas infectadas debido a que transfiere un pequeño fragmento de su ADN (T-ADN) proveniente de un plásmido denominado Ti. El T-ADN es transferido e integrado al genoma vegetal gracias a los bordes derecho e izquierdo que lo conforman y de los genes de virulencia (*vir*) que se encargan de la escisión, transferencia e integración del T-ADN. El ADN transferido a la planta contiene genes codificantes de opinas que *A. tumefaciens* usa como fuente de N y C, y la formación de los tumores se genera por genes que afectan la síntesis de hormonas de crecimiento vegetal. Las cepas usadas para transformación genética de plantas

poseen mutaciones para en la región *vir* de tal forma que no se genere la formación de tumores y eliminación del T-ADN en donde se encuentran los genes codificantes de las opinas. A estas cepas se les insertan vectores que contienen un T-ADN donde se introduce el gen de interés que se desea transferir. La integración en el genoma aun no es conocida, sin embargo, existen hipótesis que señalan que el ADN ingresa de cadena sencilla, y cuando se integra es convertido en cadena doble. Otra posibilidad señala que ingresa y se integra como ADN de cadena doble, o que ingresa de circularizado y se integra lineal. El sitio exacto de integración es desconocido y es aleatorio en todo el genoma con un numero variable de copias (1 - 3 copias) (Lacroix & Citovsky, 2019).

2.2.2. Tabaco genéticamente modificado como biofábrica

La producción de proteínas en plantas GM (granja de genes) es una estrategia segura y barata, en comparación a biorreactores microbianos, ya que el proceso es sencillo partiendo de la base de usar plantas con gran biomasa vegetal, cuyo genoma exprese el transgén en altos niveles, y se puede usar tierras de cultivo que no son aptas para alimentación humana (Clark, 2020). La producción de proteínas recombinantes en plantas permitiría obtener medicamentos, fibras, plásticos, entre otros. La síntesis de proteínas recombinantes en plantas GM tiene ventajas como: obtener proteínas a menor costo porque los sistemas vegetales requieren menos infraestructura que los sistemas de fermentación, existen cultivos que proporcionan biomasa suficiente para cosechar a escala industrial, la síntesis de proteínas se pueden dirigir a determinados compartimientos intracelulares, o se puede dirigir la expresión del transgen en algún compartimiento especifico. Finalmente, la contaminación con patógenos humanos, que se puede generar en la producción de las proteínas recombinantes es mínima (Moon et al., 2020). Algunos ejemplos son:

- Arroz GM que expresa proteínas humanas lactoferrina y lisozima, ha sido una de las biofábrica más conocidas, estas proteínas son usadas para tratar infantes que sufren deshidratación y diarrea (Humphrey et al., 2002).
- En soya GM se produjo un anticuerpo contra el virus del herpes (HSV), eficaz en la prevención de la infección vaginal por HSV en ratón (Gomez, 2002).

- En trigo y arroz se han producido anticuerpos IgG (ScFvT84.66) contra el antígeno carcinoembriónico como tratamiento para cáncer (Gomez, 2002).
- En maíz GM se produjo la bioencapsulación de la subunidad B de la toxina lábil de *Escherichia coli,* la cual indujo una fuerte respuesta inmune en ratones (Streatfield et al., 2001).
- En papa GM se obtuvo la proteína B de la toxina sensible a calor de *Vibrio cólera*, y la proteína VP60 del virus hemorrágico de conejos, las proteínas fueron probadas en ratones demostrando ser protectoras por administración vía oral 45 (Kim M. Y., 2017).
- En tomate GM se ha producido una glicoproteína del virus de la rabia, probada en ratones, a través de su administración vía oral (Giddings, 2001).
- En *Arabidopsis* GM, se ha sintetizado la glicoproteína S del coronavirus transmisible de la gastroenteritis en cerdos, la proteína fue probada en ratones a través de administración parental (Gomez, 2002).

El tabaco es idóneo para producción de diverso tipo de proteínas de interés, siendo en el campo farmaceútico donde se obtenido la mayor cantidad de evidencia de su viabilidad, ya que para la producción de medicamentos el tabaco tiene ventajas como la generación de mucha biomasa a partir de la cual se puede obtener la proteína de interés. Desde 1990 se han realizado estudios de producción de fármacos humanos en tabaco, como glucocerebrosidasa, eritropoyetina humana, anticuerpo Fv de cadena única (para Linfoma No-Hodgkin), la proteína CaroRx (para caries) (ChileBIO, 2020; Kittur et al., 2013; Holásková et al., 2018; Limkul et al., 2016). Entre algunas experiencias destacadas se encuentran:

- En tabaco se sintetizó un anticuerpo secretor quimérico IgG/IgA contra un antígeno de superficie de *Streptococcus mutans*, el agente causal de caries dental (Daniell et al., 2001). El anticuerpo fue probado en un ungüento tópico en dientes de varios voluntarios, demostró ser tan eficaz como el anticuerpo producido en un hibridoma de ratón.
- En tabaco GM se ha insertado el gen codificante de la proteína superficial de la cubierta del virus de la hepatitis B, y el gen codificante de la cápside del virus Norwalk, con eficacia por administración oral en ratones (Cramer et al., 1996).

- La Universidad de Queensland está realizando la producción de ciclótidos, un péptido que no se descompone en tubo digestivo, adecuado para uso en fármacos orales como algunos anticancerígenos, usando tabaco australiano (modelo para fármacos), esto es de vanguardia para países en desarrollo ya que podrían cultivar medicamentos a bajo costo, y con mejor acceso y estabilidad del producto (Queensland, 2018).
- La Universitat Politècnica de València (2018) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España) desarrollan el proyecto 40 NEWCOTIANA, financiado por la Unión Europea, entre 19 industrias y universidades de ocho países europeos más Australia, para transgénesis de tabaco para producción de medicamentos (Universitat Politècnica de València, U., 2018).
- El tabaco ha sido usado para productos nocivos para salud, especialmente cigarrillos, el proyecto NEWCOTIANA busca convertir a *N. tabacum* y *N. benthamiana* en biofábricas de fármacos humanos como antiinflamatorios, vacunas y anticuerpos, bajo la economía del conocimiento. En el año 2020, se produjeron antígenos de Covid-19 en tabaco GM, estos antígenos fueron evaluados con éxito sobre ratones, y actualmente se han iniciado pruebas clínicas en humanos (ChileBIO, 2020).

2.3. Derechos de Propiedad Intelectual sobre plantas transgénicas

Los Derechos de Propiedad Intelectual (DPI) son conferidos a las personas que crean a partir de ideas gestionadas en su mente, estos derechos le proporcionan propiedad sobre la utilización por parte de otras personas de su creación por un plazo específico. Los DPI se dividen en dos ejes principales: derechos de autores de obras literarias y artísticas, que tiene como fin fomentar y recompensar la labor creativa; propiedad industrial, el cual se divide en dos clases de protección, el primero de ellos es la protección de marcas e indicaciones geográficas cuyo objetivo es estimular y garantizar la competencia leal entre empresas y proteger a los consumidores para que puedan elegir. El segundo constituye un grupo de derechos que estimula la innovación, la invención y la creación de tecnología, a este grupo pertenecen las patentes, los secretos comerciales y los modelos industriales (OMPI, 2022).

La liberación comercial de líneas de plantas GM debe tener en cuenta aspectos como los DPI, que cubren los elementos usados en su proceso de mejoramiento genético, tales como vectores de transformación, genes, regiones reguladoras, proteínas, cepas, genotipos de plantas y protocolos de transformación, puesto que en caso de estar protegidos se requiere pagar licencias o acuerdos de transferencia de tecnología con el fin de evitar infringir derechos a terceros (Carroll, 2016). Dentro de los DPI que protegen líneas GM de plantas se encuentran las patentes, modelo de utilidad y títulos de obtentor de variedades vegetales (Heikkilä & Lorenz, 2017).

2.3.1. Aspectos relevantes de las patentes

Las patentes son el derecho que se le otorga a su creador sobre su invención de explotarla, o impedir que sea comercializada por terceros, y en compensación por este derecho su propietario emite un documento público que constituye la patente, en dónde suministra la información técnica de la invención (OMPI, 2022).

Las patentes son jurisdiccionales, es decir que son aprobadas por cada país, por lo tanto, es necesario realizar la solicitud de patente en el país o países en donde se está interesado en proteger la invención, la cual tiene una protección máxima de 20 años en el territorio donde fue otorgada, después de este tiempo la patente pasa a ser de dominio público y puede ser explotada comercialmente por terceros (OMPI, 2022; SIC, 2022).

Las invenciones genéticas pueden ser controversiales, puesto que los genes y proteínas pueden tener una utilidad inventiva, existen países en donde se pueden patentar como se encuentran en la naturaleza, sin embargo, en otros países los genes no pueden ser objeto de patentamiento, pero sus productos pueden ser causa de protección siempre y cuando sean modificados para que posean una característica diferenciadora con respecto a cómo se encuentra en la naturaleza (OMPI, 2022).

El documento de la patente se divide en tres secciones (Figura 2-3):

- La primera sección es la portada en donde se identifica los inventores y los solicitantes, número de publicación, código de clasificación, título de la

invención, fecha de presentación y resumen de la invención (Universidad Politécnica de Madrid, 2011; Lens, 2022).

- La segunda sección es la caracterización de la patente que incluye el título, el sector técnico que delimita el campo de aplicación en el que se ajusta la invención, el estado de la técnica que resalta el conocimiento que existe sobre el tema, el problema y la solución propuesta que deben ser inventiva y una descripción de las características generales de la invención que delimita el alcance de las reivindicaciones, en esta descripción se incluye descripción de los dibujos, y la exposición de cómo se desarrolla la invención y su aplicación industrial (Universidad Politécnica de Madrid, 2011; Lens, 2022).
- La tercera sección incluye las reivindicaciones (claims), estas constituyen la parte más importante de la patente, en esta sección se define el objeto para el que se solicita la protección, es decir el alcance de la protección. En esta sección se define jurídicamente la protección y determina la frontera de explotación conferida por la patente. Estas reivindicaciones deben ser claras y concisas, fundamentadas en la descripción de la invención (Universidad Politécnica de Madrid, 2011; Lens, 2022).

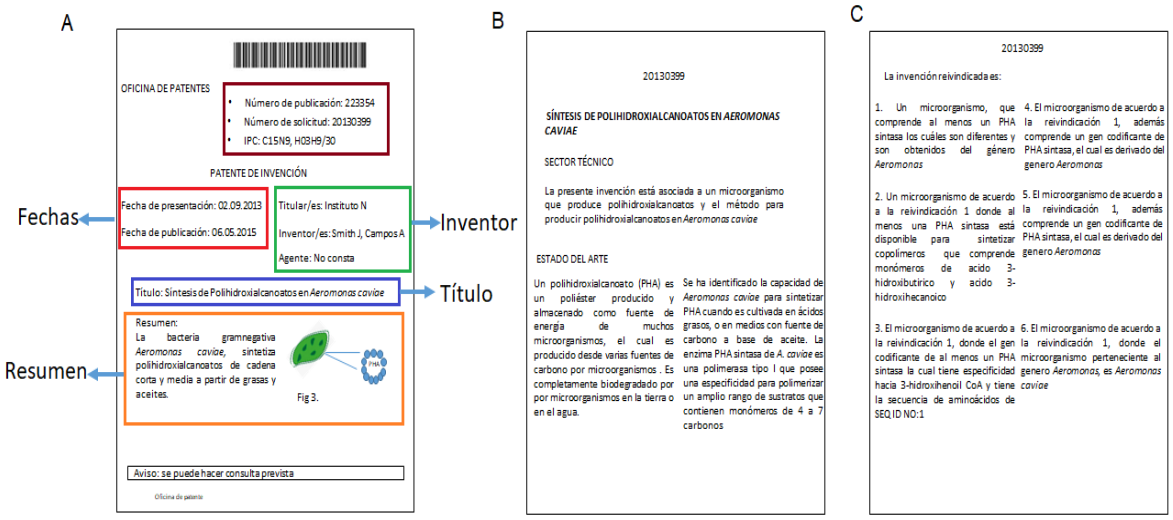


Figura 2-3. Partes de una patente. A: Portada. B: Caracterización de la patente. C: Reivindicación.

Las reivindicaciones están constituidas por dos secciones; un preámbulo que señala el objeto y campo de aplicación de la invención, y la parte caracterizada que especifica las características de la técnica propia de la invención que la diferencia del estado de la técnica (Lens, 2022). Existen dos tipos de reivindicaciones, independientes y dependientes. Las reivindicaciones independientes hacen referencia a aquellas en donde se indica todas las características técnicas que conforman el objeto de la invención y de la protección sin mencionar la reivindicación o reivindicaciones anteriores, estas reivindicaciones pueden solicitar proteger un producto, un procedimiento para fabricar un producto, el uso de ese producto, o un dispositivo para la realización de un procedimiento. Las reivindicaciones dependientes hacen referencia a todas las características de los objetos protegidas en las reivindicaciones anteriores, es decir que dependen de una reivindicación anterior que puede ser dependiente o independiente (Lens, 2022). Las reivindicaciones independientes extienden el objeto de protección de la patente, mientras que las reivindicaciones dependientes limitan su alcance de la que son dependiente (Universidad Politécnica de Madrid, 2011).

La concesión de una patente depende de la novedad, nivel inventivo y su aplicación industrial. Una invención se considera novedosa cuando no existe información de ella en el estado de la técnica, es decir, no hay conocimiento en el mundo sobre lo propuesto. El nivel inventivo hace referencia a que la técnica no sea obvia y evidente para una persona versada en el tema que después de verificar el estado del arte pueda determinar su proceder. Por último, la invención debe tener una aplicación industrial, es decir que se pueda utilizar para fabricar o desarrollar algún producto en cualquier industria (OMPI, 2022).

Una patente puede ser protegida en varios países con una sola solicitud a través del Tratado de Cooperación en materia de Patente (PCT). El PCT es administrado por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), al que están suscritos 140 países. Una vez se realiza la primera solicitud por PCT en alguna de las oficinas de patentes de los países miembro, o en la OMPI, se lleva a cabo una búsqueda internacional sobre el estado de la técnica para determinar si la invención que se desea proteger es o no patentable. En caso de ser favorable su patentabilidad la OMPI publica la solicitud internacional después de los 18 meses de haberse realizado la solicitud. Después de 30 meses los solicitantes pueden presentar su solicitud de patente en la oficina nacional o regional en la que quieran proteger su invención, pero el documento debe estar traducido

al idioma de la oficina nacional o regional, cumplir con las especificaciones exigidas en cada región donde desea proteger su invención y pagar los impuestos exigidos (PCT-The International Patent System, 2019).

2.3.2. Títulos de obtentor

El Título de Obtentor (PBR del inglés Plant Breeder Rights) es un recurso de DPI *sui generis* creado para proteger variedades vegetales desarrolladas por mejoramiento genético, la persona que obtiene estas nuevas variedades se denomina obtentor (UPOV, 2022). El otorgamiento de un PBR le concede al titular a propiedad de esa variedad y toda persona que desee comercializarla debe ser autorizada por el titular (obtentor). Esta autorización generalmente se otorga en forma de un acuerdo de licencia. Una variedad puede ser protegida por PBR si cumple con los siguientes criterios: novedad, distinción, uniformidad y estabilidad; también se le debe dar una denominación apropiada. El PBR tiene una vigencia de 25 años a partir de la fecha de concesión, en el caso de árboles frutales, árboles forestales y vides, y de 20 años para las demás especies; su validez es jurisdiccional, es decir, estará vigente en el país donde se otorgó, sin embargo, si se solicita a través de organizaciones intergubernamentales el derecho es válido en todos los estados miembros de la organización (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017).

La organización intergubernamental Unión Internacional para la Protección de Nuevas Obtenciones Vegetales (UPOV del inglés International Union for the Protection of New Varieties of Plants) es un organismo internacional que promueve un sistema efectivo de protección de variedades vegetales, y cuenta con una base de datos (PLUTO) que permite la búsqueda de títulos de obtentor solicitados en países miembros de la UPOV para diferentes especies de plantas. Los miembros de la UPOV son elegibles para la exención del obtentor, que permite a todos los obtentores utilizar variedades protegidas para otras actividades de mejoramiento (UPOV, 2022).

2.3.3. Libertad de operación

Antes de desarrollar una planta GM con fines comerciales se requiere un análisis de DPI para verificar si los elementos como secuencias codificantes de genes, secuencias

reguladoras, genotipos y técnicas que se utilizan en su creación están protegidos, y de ser así, el término y los países en los que su desarrollo, aplicación y comercialización no infringen los derechos de terceros. El número de patentes que protegen esta tecnología puede incrementar los costos asociados al desarrollo, debido al pago de regalías o licencias (Alandete-Saez et al., 2015). El análisis de los DPI que están involucrados en el diseño de una planta GM requiere de un conocimiento legal y científico minucioso para interpretar adecuadamente los elementos protegidos (promotor, terminador, secuencia codificante del gen, variedad vegetal, método y vector de transformación).

Una alternativa para facilitar la liberación comercial y reducir costos en la creación de una planta GM es realizar un análisis del estado de propiedad intelectual de cada uno de los elementos que se desean utilizar en el proceso (Figura 2-4). Un Estudio de Libertad de Operación (ELO) es un análisis legal que permite determinar si un desarrollo biotecnológico se puede ejecutar con elementos libres de DPI, o con la menor carga de DPI, para reducir el pago de regalías o licencias por usar los elementos requeridos para su desarrollo (Nagori & Mathur, 2009). El ELO requiere de la definición del objeto del desarrollo tecnológico para realizar una busqueda de patentes, o solicitudes de patentes, relacionadas con el objeto de estudio. La búsqueda de patentes implica un conocimiento técnico del tema relacionado con el desarrollo biotecnológico, para determinar las palabras clave que describan la tecnología, así como los códigos de clasificación que delimiten las áreas de aplicación del objeto del desarrollo biotecnológico, incluyendo secuencias biológicas que pueden ser identificadas en reivindicaciones (Ortiz & Escorsa, 2010).

Las patentes que son identificadas en la búsqueda para el ELO deben ser analizadas en dos etapas. El primer análisis consiste en determinar de acuerdo con el objeto del desarrollo biotecnológico si se puede eliminar patentes cuyo objeto sea diferente al que se está buscando. En el segundo análisis, las patentes que no fueron eliminadas son evaluadas a detalle, teniendo en cuenta las reivindicaciones dependientes e independientes con el fin de determinar el alcance de la protección para definir si protege o no alguno de los elementos que hacen parte del objeto del desarrollo biotecnológico (Hincapié & Chaparro-Giraldo, 2014). De igual forma es necesario hacer el análisis de las patentes teniendo en cuenta los siguientes aspectos: las patentes se rigen de acuerdo con la legislación del país en dónde fueron solicitadas y otorgadas, se debe tener en cuenta que las patentes pierden su vigencia después de 20 años, y su protección cesa cuando no

se paga la tasa anual de mantenimiento, en los dos casos las patentes se vuelven de dominio público. La conclusión de un determinado ELO permite identificar elementos que pueden estar libres de patentes o de títulos de obtentor, y en caso de ser protegidos por patentes, facilita la posibilidad de negociación con los propietarios de las patentes antes de desarrollar el producto biotecnológico, y así favorecer su futura comercialización (Heikkilä & Lorenz, 2017).

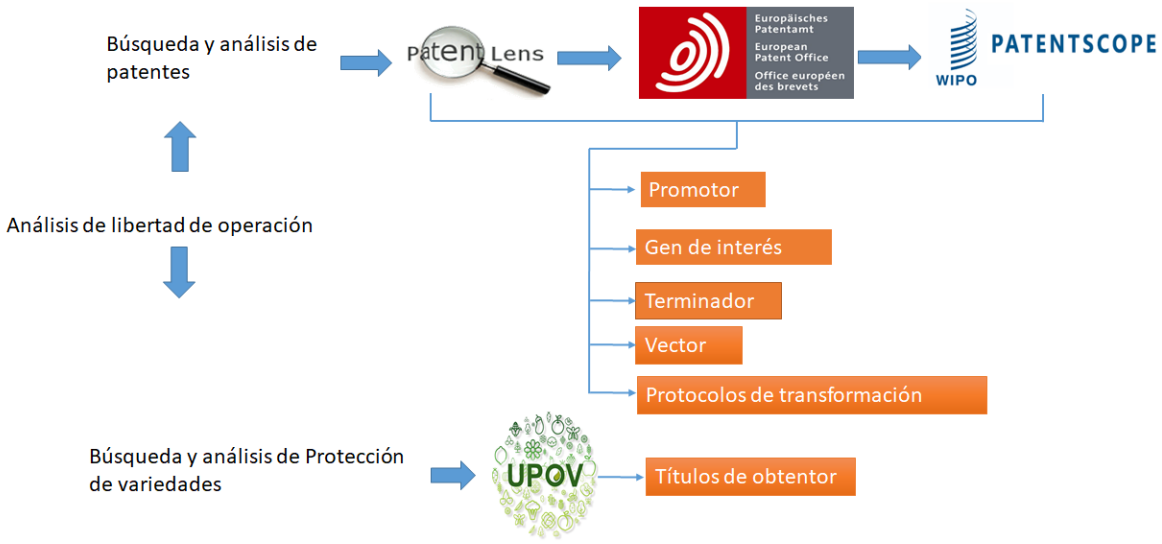


Figura 2-4. Diseño del ELO en desarrollo de plantas GM. El esquema indica el análisis básico de bases de datos de patentes y elementos del producto biotecnológico a tener en cuenta.

2.4. Generalidades de los polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres producidos naturalmente en forma de gránulos por un amplio rango de microrganismos; se caracterizan por ser termoestables, insolubles en agua, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables (Stuart, et al., 1998); (Muneer et al., 2020). Los PHAs están conformados por cadenas lineales de ácidos R-3 hidroxicarboxílicos (R-HA) producidos por bacterias cuando existe un desequilibrio nutricional, con altas concentraciones de fuente de carbono y limitación de los elementos esenciales N, azufre (S), oxigeno (O), fosforo (P) y magnesio (Mg), entre otros. Son acumulados en forma de gránulos intracelulares representando hasta el 80 % del peso seco de la célula, usado como estrategia de supervivencia por parte de las bacterias al

usarlas como fuente de energía cuando las condiciones del ambiente son adversas (Sruamsiri et al., 2020)

En bacterias como *Azotobacter sp*. y *Bacillus sp*. y en bacterias fijadoras de N, los gránulos de PHAs actúan como fuente de carbono para el proceso de enquistamiento y en la esporulación para la protección del complejo nitogenasa (Mohanrasu et al., 2020; Shze Mok et al., 2021). El primer PHA en ser estudiado fue el 3R-polihidroxibutirato (PHB) aislado en *B. megaterium* por el bacteriólogo Francés Maurice Lemoigne, quien inicialmente lo describió como un material lipídico (Lemoigne et al., 1945).

En el año de 1950 se logró determinar la naturaleza poliéster de este compuesto, en 1958 fue identificada la función del PHB por Macrae y Wikilson (Macrae & Wilkinson, 1958). En el año de 1974, Wallen y Rohwdder aislaron tres nuevos PHAS, 3Rhidroxivalerato, 3R-hidroxihexanoato y 3R-hidroxiheptanoico en aguas residuales a partir de la extracción de compuesto por cloroformo (Wallen & Rohwedder, 1974). En 1983 se evaluó la producción de 3R-hidroxioctanoato y 3Rhidrohexanoato en un culltivo de *P. olevorans* sobre n-octano (De Smet et al., 1983).

Hasta la fecha se han descrito más de 160 PHAs saturados, insaturados, halógenos, aromáticos entre otros en más de 300 especies de microorganismos, principalmente en bacterias y Archeas (Taguchi & Matsumoto, 2021). Entre las bacterias Gram negativas productoras de PHAS se encuentran *Cupriavidus necátor* (antes *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes eutrophus*, *A. latus*, *Paracoccus denitrificans*, *P. acidophila*, *P. oleovorans* y *A. vinelandii*, *Acinetobacter spp*., entre otras, siendo estudiadas con respecto a las rutas metabólicas y los genes codificantes de las enzimas involucradas en su biosíntesis (Aremu et al., 2021; Semeniuk et al., 2020; Gupta et al., 2021). En las bacterias Gram positivas, se han encontrado varias especies productoras de PHAs en el género *Bacillus* (Chang et al., 2021; Mohanrasu et al., 2020).

Debido a que estos PHAs pueden ser sintetizados a partir de diferentes fuentes de carbono como ácidos grasos, alcoholes, carbohidratos y proteína, esta característica permite que este material sea producido a partir de compuestos renovables y pueda ser degradado completamente por procesos metabólicos mediados por los mismos microorganismos, siendo estas propiedades importantes para el desarrollo de aplicaciones de estos

biomateriales en industrias altamente contaminantes como la producción de plásticos y de combustibles (Muneer et al., 2020).

2.4.1. Características fisicoquímicas de los polihidroxialcanoatos

Las propiedades físicas que caracterizan un PHA como termoestabilidad, rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea, entre otros, son determinadas por la longitud de las cadenas laterales de los monómeros que conforman la cadena del polímero y la proporción final en la que se encuentre un monómero en el polímero (Volova et al., 2013). Estos polímeros pueden estar conformados por monómeros de igual naturaleza (homopolímeros), o estar constituidos por más de una clase de monómero (heteropolímero o copolímero) (Volova et al., 2021). De acuerdo con la longitud de las cadenas laterales, los PHAs se han clasificado en:

- monómeros de cadena de corta (scl-PHA) conformados por cadenas de monómeros que contienen de 4 a 5 átomos de carbono.
- Polímeros de cadena media (mcl-PHA) conformadas por cadenas de monómeros que contienen de 6 a 14 átomos de carbono.
- Polímeros conformados por cadenas de monómeros que contienen más de 16 átomos de carbono.

Los polímeros scl-PHA se caracterizan por formar plásticos rígidos con porcentajes de elongación bajos 5 %, altamente cristalinos, con temperaturas de transición vítrea de 97ºC; mientras que los polímeros de mcl-PHA, se caracterizan por formar plásticos altamente elásticos, con porcentajes de elongación de 300 %, bajas temperaturas de transición vítrea de -37ºC, y cristalinidad baja (Tabla 2-1) (Sharma et al., 2021; Volova et al., 2013).

Tabla 2-1. Propiedades físicas de PHAs. Modificado de (Rehm, 2007).

Propiedades	PHA scl	PHAmcl	PoliPropileno
Temperatura cristalización	177	61	176
Temperatura de transición vítrea	2	-36	-10
Cristalinidad %	70	30	60
Elongación %	5	300	400

Por otro lado, la composición química de las cadenas laterales de los PHAs con presencia de grupos halogenados, carboxil, hidroxil, cianofenoxin, ó fenoxim metilester, determinan la naturaleza de cadenas saturadas, insaturadas, aromáticas, halogénicas, esto influye en la manipulación y modificación de los biopolímeros producidos (Tabla 2-2) (Sharma et al., 2021; Laycock et al., 2013).

Tabla 2-2. Clasificación de PHA dependiendo de la longitud de la cadena lateral (Rehm, 2007).

Clase de PHA	Longitud	Tipos	Abreviación
scl-PHA (cadena corta)	3-5 átomos de carbono	3-hidroxipropionato o β-hidroxipropionato 3-hidroxibutirato o β-hidroxibutirato 3-hidroxivalerato o β-hidroxivalerato 4-hidroxibutirato	3HP o HP 3HB o βHB 3HV o βHV 4HB
mcl-PHA (cadena media)	6-14 átomos de carbono	3-hidroxihexanoato o β-hidroxihexanoato 3-hidroxioctoato o β-hidroxioctoato	3HH o βHH 3HO o βHO
lcl-PHA (cadena larga)	>C14	3-hidroxioctadecanoato o β-hidroxioctadecanoato	3HD o βHD

2.4.2. Síntesis y degradación de los polihidroxialcanoatos

Para la síntesis de PHAs se requiere de intermediarios enzimáticos que hidrolizan, catabolizan y descondensan los sustratos empleados para su biosíntesis, entre las que se encuentran enzimas implicadas en la degradación de acetil-CoA como β-cetotiolasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhaB), PHA sintasa (PhaC), enzimas implicadas en síntesis de ácidos grasos como 3HA-ACP:CoA transacilasa (PhaG), enoil-CoA hidratasa (PhaJ), 3-cetoacil-CoA tiolasa (FadA), 3HA-CoA dehidrogenasa (FadB), acil-CoA sintetasa (FadD) y acil-CoA dehidrogenasa (FadE), enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos como: β-cetotoacil-ACP reductasa (FadB), acil-CoA sintetasa (FadD) y acil-CoA dehidrogenasa (FadE); enzimas involucradas en la degradación de PHAs como depolimerasa (PhaZ), y proteínas asociadas a la formación de gránulos de PHA (PhaF, PhaI, PhaP, PhaM*)* (Mezzina & Pettinari, 2016; Możejko-Ciesielska et al., 2018; Choi et al., 2020).

Las enzimas PhaA, PhaB y PhaC sintasa, son las enzimas mejor descritas y estudiadas en la bacteria *C. necátor*. La estructura de la enzima PhaA está conformada por un tetrámero, el cual contiene dos dominios, un dominio principal y un dominio en forma de bucle (Figura 2-5). El dominio principal se divide en un extremo N-terminal y C-terminal, en medio de sus extremos se encuentra el dominio del bucle (L-dominio). El extremo N y C-terminal contienen una combinación de α hélices y hojas β, plegamientos típicos de la familia de las enzimas tiolasas. El L-dominio está compuesto por cuatro α hélices y tres hojas β corta, las cuales forman un triángulo (Kim & Kim, 2014). El sitio catalítico de la enzima está formado por residuos Cys88, Cys379 e His349, este sitio se encuentra ubicado entre el extremo N y C-terminal del dominio principal. Las Cys funcionan como catalizador covalente y la cercanía de His349 con Cys88 indica que su función podría ser un segundo nucleófilo (Kim & Kim, 2014). La reacción inicial para la biosíntesis de PHB, involucra la actividad de la enzima β-cetotiolasa para condensación de dos moléculas de acetil-CoA. Este proceso se realiza en dos pasos, el primero es una catálisis covalente, que se genera cuando la primera molécula de acetil-CoA ingresa al sitio activo, en dónde el grupo tiol de Cys88 rompe el puente éster del acetil-CoA formando un enlace tioester entre Cys88 y el grupo acetilo. El segundo paso es la condensación que se produce cuando Cys379 rompe el enlace tioester acetilado y se condensa el grupo acetilo del primer sustrato al segundo sustrato acetil-CoA formando acetoacetil-CoA (Figura 2-5 (Kim & Kim, 2014; Sagong H.-Y et al., 2018).

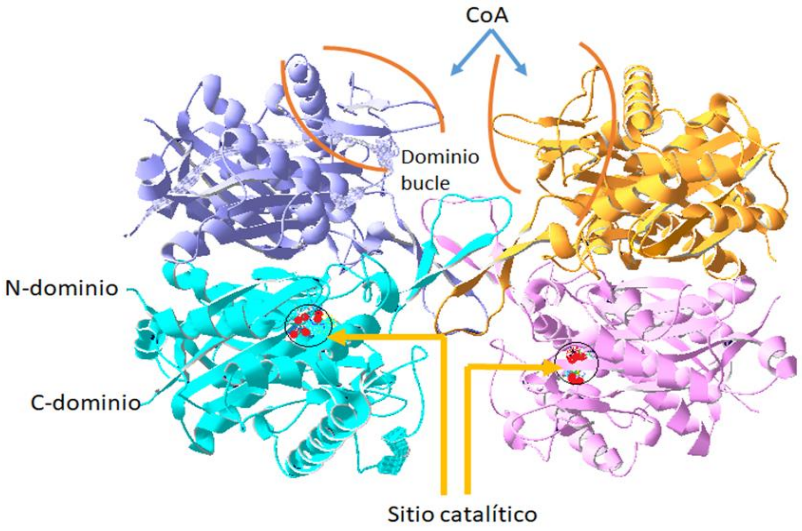


Figura 2-5. Estructura de la enzima PhaA. El tetrámero de la enzima contiene cuatro polipéptidos (morado, azul, amarillo y violeta). Las flechas azules indican el sitio de unión

de la molécula de CoA. Las flechas amarillas indican el sitio catalítico de la enzima. Modificado de (Kim & Kim, 2014).

C. necátor la bacteria más conocida y estudiada en la biosíntesis de PHAs posee dos tiolosas que median la misma reacción sobre acetil-CoA, la β-cetotiolosa (PhaA) y la enzima β-cetotiolasa B (BktB). La enzima PhaA solo puede catalizar la condensación de dos acetil-CoA, mientras que BktB cataliza la condensación de la reacción de acetil-CoA y acil-CoAs de cadenas de carbono de diferentes longitudes (Sagong et al., 2018). La estructura de la enzima BktB es tetrámerica, está conformada por tres dominios, dos dominios principales y un dominio en forma de bucle. Los dos dominios principales, contienen un extremo N y C- terminal y el dominio en forma de bucle está localizado entre los dos dominios principales (L-dominio). El extremo N-terminal está conformado por seis láminas β y cuatro hélices que cubren las láminas β. El extremo C-terminal está compuesto por cuatro láminas β cubiertas por cuatro α-hélices. El dominio en bucle fue compuesto de cuatro α-hélices y tres láminas-β (Kim et al., 2014). La enzima BktB, al igual que la enzima PhaA, contiene un sitio catalítico conformado por los residuos Cys90 ubicado en el extremo N- terminal de uno de los dominios principales, Cys380 ubicado en el extremo C-terminal y un residuo His348 cerca de Cys90. BktB tiene un sitio activo con amplio que la enzima PhaA que le permite condensar cadenas carbonadas de diferentes longitudes como grupos propionilo y butirilo (Kim et al., 2014; Sagong et al., 2018).

La estructura de la enzima PhaB está compuesta por un pliegue de Rossman y un dominio pinza (Figura 2-6). El pliegue de Rosman está constituido por una hoja β torcida, cubierta por siete hebras β flanqueadas por ocho α-hélices. El dominio pinza está conformado por cinco α-hélices. Esta enzima es dependiente de NADPHA como cofactor, el cual se encuentra unido al pliegue Rossman en una región que contiene cinco bucles formados por la interacción entre láminas β y α-hélices. El sitio catalítico de la enzima PhaB, está compuesto por residuos Asn112, Tyr153 y Lys157. Lys157 reduce el pKa de Tyr153 y este protón es transferido al grupo carbonil de acetotacetil-CoA y el hidruro es transferido del anillo nicotinamida al carbonilo de acetoacetil-CoA, y el protón de nuevo se transfiere desde la ribosa 20-OH de NADPH, Lys157 reduciendo el sustrato a (R)-3-HB-CoA (Kim et al., 2014). Posteriormente el protón de nuevo se transfiere desde la ribosa 20-OH de NADPH, Lys157 y agua, mientras que los residuos catalíticos regresan a su estado natural.

El residuo Asn112 favorece el posicionamiento de Lys157 y permite estabilizar el agua participando en la transferencia de protón, mientras Ser140 estabiliza el acetoacetilo sobrante (Filling et al., 2002; Sagong et al., 2018).

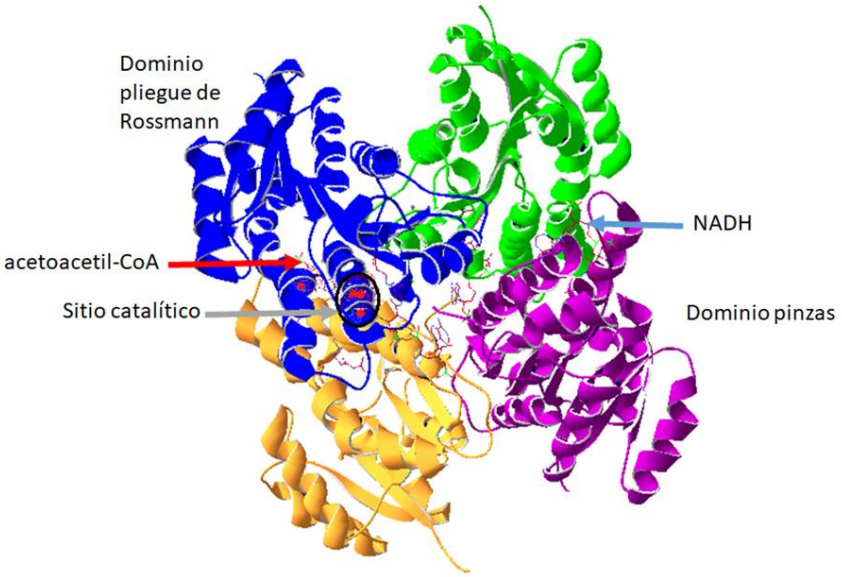


Figura 2-6. Estructura de PhaB. Estructura tetramérica conformado por cuatro polipetidos diferenciado por colores (Azul, amarillo, verde y morado). La flecha roja indica la simulación del sitio de unión con acetoacetil-CoA. Flecha gris indica el sitio activo de la enzima. La flecha azul señala la simulación del sitio de unión con NADH. Modificado de (Filling et al., 2002).

La enzima PhaC es la enzima fundamental para la polimerización de PHAs, es la enzima más importante en su biosíntesis, su actividad de polimerización depende de su afinidad por la longitud de la cadena carbonada que conforman los monómeros. La estructura de la enzima PhaC aún no ha sido definida con exactitud, sin embargo, se han realizado algunas aproximaciones para delucidar su estructura secundaria en *C. necátor*. La enzima está conformada por dos subdominios principales con un pliegue hidrolasa convencional y un subdominio de dimerización. Los subdominios principales están conformados por dos dominios N-terminal (Met1-Arg192) y un dominio C-terminal (Gly193-Ala589) (Wittenborn et al., 2016; Kim et al., 2017). El sitio catalítico se encuentra en uno de los subdominios principales y está conformado por Cys319, Asp480 y His508, estos residuos funcionan como un nucleófilo covalente, una base y un donador de electrones, respectivamente (Figura 2-7).

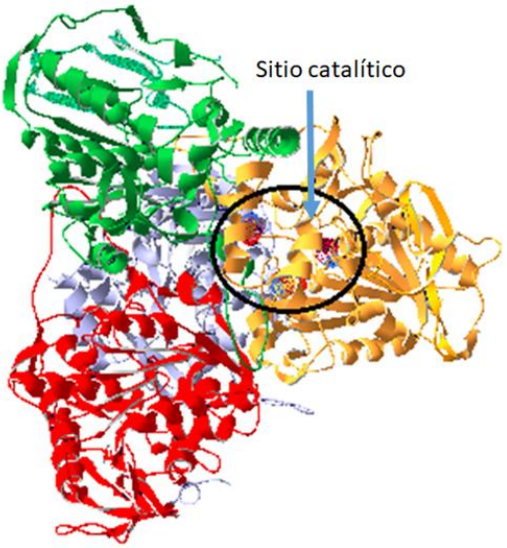


Figura 2-7. Estructura de PhaC. Estructura tetramérica conformado por cuatro polipétidos diferenciado por colores (rojo, morado, verde y amarillo). La flecha azul indica el sitio activo de la enzima. Modificado de (Wittenborn et al., 2016).

Se han descrito diversas propuestas sobre el mecanismo de polimerización de los monómeros de R-3-hidroxiacil butirato (R-3-HB). Una de ellas indica que la polimerización se produce cuando R-3-HB-CoA ingresa al sitio activo y es degradado por el residuo Cys319, el cual es previamente desprotonado por His508, formando el primer intermediario tetrahedral, esto genera una unión covalente de R-3-HB con el sitio activo. El segundo sustrato R-3-HB-CoA ingresa al sitio activo y su grupo hidroxilo terminal es desprotonado por la carga generada entre Asp480, His508 y el grupo hidroxilo terminal. El grupo hidroxilo desprotonado degrada el grupo carbonilo del 3-HB, formando el segundo intermediario tetrahedral, el 3-HB-2-CoA que se forma con el segundo intermediario sale del sitio activo y se repite el ciclo cuando ingresa un nuevo R-3-HB-CoA, para producir 3-HB-Cys, pero esta vez el residuo 3-HB-2-CoA también ingresa al sitio activo para producir 3-HB-3-CoA. Este ciclo se repite 10 veces; en la décima reacción de polimerización el PHBn ingresa al sitio de activo como un sustrato secundario para degradar los 3-HB-3-Cys y producir PHBn+1 (Wittenborn et al., 2016).

Otra de las propuestas del mecanismo de polimerización de la enzima PhaC sugiere que el sustrato R-3-HB-CoA ingresa al sitio activo y el polímero en crecimiento es elongado a

través de una ruta de salida separada hacia la superficie de la proteína. La formación inicial de la unión covalente del R-3-HB-CoA es igual a la descrita en la propuesta descrita previamente, una vez ingresa el segundo sustrato y empuja al primer intermediario 3-HB-Cys acercándolo hacia el túnel de salida. El grupo hidroxilo de R-3-HB-CoA rompe el enlace tióester Cys de 3-HB, y junto con el grupo hidroxilo del resto de 3-HB se genera la liberación del Cys y el intermedio 3-HB-2-CoA, el cual es desagradado por el Cys libre para producir 3-HB-2-Cys. El ciclo se repite 10 veces y en la décima reacción de polimerización, el polímero PHBn se une por un enlace covalente al residuo Cys. El grupo hidroxilo del R3-HB-CoA que ingresa rompe el enlace tioester del polímero PHBn-Cys y el Cys libre rompe el enlace tioester del PHBn+1-CoA para producir PHBn+1-Cys (Kim et al., 2016; Sagong et al., 2018).

Debido a que los monómeros que conforman los PHAs son hidrofóbicos y poco solubles en soluciones acuosas, se forman gránulos para favorecen la solubilidad en medios acuosos. Aunque el modelo sobre la formación del granulo aun no es claro, se ha sugerido que las cadenas de monómeros que se van formando se aglomeran y forman estructuras similares a micelas en el citoplasma y las proteínas PhaC se unen a la superficie de estas micelas; cuando se genera esta interacción participan enzimas asociadas a gránulos de PHA que se unen al granulo en crecimiento (Jendrossek & Pfeiffer, 2013). Dentro de las proteínas asociadas a gránulos de PHA se encuentra la enzima PhaM que funciona como activador de la enzima PhaC; esta proteína se encuentra unida en su extremo C-terminal con PhaC formando un complejo PhaC/PhaM. Las fasinas son proteínas asociadas a gránulos de PHA, encargadas de regular el número, tamaño y distribución de los gránulos de PHA y promueve la acumulación de PHAs. Se ha descrito la estructura de una fasina de *Aeromonas hydrophila,* la cual está conformada por un tetrámero compuesto por 8 α-hélices formando una estructura de boina enrollada. Las hélices son anfipáticas, característica que puede estar asociada con la interacción con polímeros y otras proteínas asociadas a gránulos (Pfeiffer & Jendrossek, 2014) .

Otra enzima importante en la síntesis de PHAs es la enzima depolimerasa PhaZ que tiene como función degradar los PHAs. Las PhaZ son de la familia de las α/β hidrolasas. Su estructura está conformada por un sitio activo con tres o cuatro subsitios para la unión de monómero. El sitio catalítico está compuesto por residuos de Ser, Asp e His; en este sitio se une el PHA una vez se genera esta unión el residuo de Ser es desprotonado y degrada

el grupo carbonilo del PHA, formando una enzima acyl tetrahedral covalente. Esta enzima es hidrolizada por una molécula de agua activada por His (Sagong et al., 2018).

Los gránulos de PHAs están conformados por una capa lipídica donde se encuentran ancladas proteínas implicadas en la biosíntesis de PHAs denominados proteínas asociadas a los gránulos (GAP) (Sagong et al.,2018; Mezzina & Pettinari , 2016). En la biosíntesis del PHAs de cadena corta y media se han identificado dos proteínas pertenecientes a la familia de las GAP: polimerasas y despolimerasas de PHA implicadas en la síntesis y degradación de los biopolímeros. La enzima polimerasa facilita el acoplamiento de los monómeros que conforman el PHA, y es esencial en la determinación de la longitud de la cadena lateral del polímero resultante debido a la especificidad que tiene por el número de carbonos del sustrato usado para la síntesis de PHAs (Chek et al., 2019).

De acuerdo con la especificidad de la polimerasa por la fuente de carbono usada para la síntesis de los PHAs se han clasificado en cuatro clases:

- Las PHAs polimerasas clase I compuestas por una sola subunidad y actúan sobre tioésteres CoA de sustratos conformados por 4 – 5 átomos de C para la síntesis de scl-PHAs. La PHA sintasa codificada por el gen *phaC* de *C. necátor* pertenece a esta familia (Jia et al., 2016; Priyadarshi et al., 2014).
- Las PHAs polimerasas clase II están conformadas por una sola subunidad y presentan actividad sobre tioésteres CoA de sustratos con 6 -14 átomos de carbonos para la síntesis de mcl-pha. A esta clase pertenecen los PHAs sintasas codificadas por los genes *phaC1* y *phaC2* de bacterias del género *Pseudomonas* (Jia et al., 2016).
- Los PHAs polimerasas clase III están conformados por dos subunidades, presentando actividad sobre tioesteres CoA de sustratos con 4-5 átomos de carbonos para la síntesis de scl-PHA. La PHA sintasa codificado por los genes *phac* y *phae de Chromatium vinosum* (Jia et al.,2016).
- Las PHAs polimerasas clase IV están conformados por dos subunidades y se caracterizan por presentar actividad sobre tioesteres CoA para la síntesis de sclPHA. A esta clase pertenecen los PHAs sintasas codificadas por los genes *phaC* y *phaR* de *B. megatherium* (Tsuge, Hyakutake, & Mizuno, 2015).

Por otro lado las despolimerasas involucradas en la degradación de PHAs, pueden ser sintetizadas por el mismo microorganismo productor de PHAs o por otros microorganismos, estas enzimas son carboxilesterasas e hidrolasas encargadas de romper los enlaces de los monómeros que conforman los PHAs y liberar energía a partir de la hidrólisis de los PHAs a oligómeros solubles en agua que posteriormente son transformados en agua, dióxido o metano (Martinez-Tobón et al., 2018; Amara & Moawad, 2011). Dentro de las despolimerasas más estudiadas se encuentran $PhaAz_{af}$ de *Alcaliginus faecalis*, PhaZ1, PhaZ2 and PhaZ3 caracterizados en *C. necátor*. Las depolimerasas son estables a pH y temperaturas altas, tiene un peso menor a 70 kDa y contienen enlaces disulfuro de Ser hidrolasa, posee tres aminoácidos conservados: Ser, Asp e His. El aminoácido Ser es esencial en la actividad biológica de las despolimerasas, hace parte de la caja lipasa pentapeptido Gly-Xaa1-Ser-Xaa2-Gly; en esta región se genera la hidrolisis de los puentes éster de los PHAs (Martinez-Tobón et al., 2018).

2.4.3. Rutas para la síntesis de los polihidroxialcanoatos

La variedad de PHAs depende del tipo de sustrato que se suministre para su producción, la especificidad de polimerización y las diferentes rutas metabólicas que conllevan a la formación de los monómeros. Se han descrito tres rutas metabólicas principales, asociadas en la síntesis de PHAs que son: la degradación de azúcares, degradación de ácidos grasos (B-oxidación) y la biosíntesis de novo de ácidos grasos (Chek et al., 2019).

A partir de la vía de la glicolisis y la degradación de ácidos grasos, microorganismos como *C. necátor* sintetizan polímeros de SCL como PHB. En la biosíntesis de PHB están involucradas tres enzimas encargadas de catalizar las reacciones. Estas enzimas están codificadas por genes organizados en un operón conocido como *phaCBA* (Gupta et al., 2021; Jeon et al., 2014).

En este proceso dos moléculas de Acetil-CoA producidas a partir de la degradación de la fuente de carbono suministrada son condensadas a acetoacil-CoA por la acción de la B-tiolasa codificada por el gen *phaA*. Posteriormente la molécula de acetoacil-CoA es reducida en la posición 3 por la acetoacil-CoA reductasa NADH dependiente, codificada por el gen *phaB* produciendo R-3-hidroxibutiril CoA, y finalmente son polimerizados los

monómeros de R3-hidroxibutiril-CoA por la enzima PHA sintasa codificada por el gen *phaC* como se describe en la Figura 2-8 (Gupta et al., 2021).

A través de la vía de degradación de ácidos grasos (β-oxidación), bacterias como *A. caviae* poseen la capacidad de sintetizar polihidroxihexanoatos (PHH), clasificados como PHAs mCL. La biosíntesis de PHH es mediada por las enzimas enoil CoA hidratasa codificada por el gen *phaJ* y PHA sintasa codificada por el gen *phaC*. La enzima enoil- CoA hidratasa media la hidratación del intermediario 2- trans-enoil CoA de la β-oxidación, a monómeros de 3-R-hidroacil CoA. La enzima PHA sintasa, polimeriza los monómeros a PHH (Arai et al., 2002).

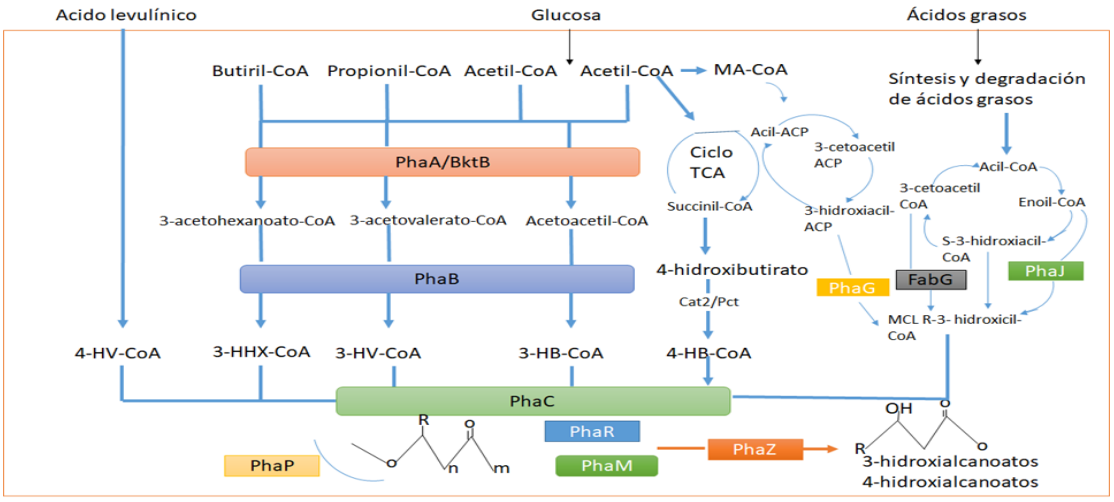


Figura 2-8. Rutas metabólicas usadas para la biosíntesis de PHAs en plantas. Modificado de (Sagong et al., 2018).

Los PHAs mSCL pueden ser sintetizado a partir del uso de sustratos intermediarios de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos y degradación de ácidos grasos, obteniendo PHAs con un número de carbonos similar al de los ácidos grasos usados como sustrato (Aremu et al., 2021; Rai et al., 2011).

En la vía de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, bacterias como *P. oleovorans* sintetizan PHAs a partir del intermediario Malonil-CoA, el cual es convertido a Maloti ACP por medio de la enzima de *P. oleovornas* malonil-CoA-ACP transacilasa codificada por el gen *fabD*. El malonil-CoA-ACP es hidrolizado a 3 R-hidroxiacil por la enzima 3-hidroxi- acil

AA-ACP transferasa codificada por el gen *phaG* y finalmente es polimerizado por la enzima PHA polimerasa tipo II (Aremu et al., 2021). Para la vía de la degradación de acidos grasos, la enzima PHA polimerasa tipo II de *P. olevorans*, debe competir por el sustrato con otras enzimas involucradas en la degradación de ácidos grasos y para obtener estos sustratos se requiere de tres enzimas presentes en la β-oxidación de acidos grasos: la enoil-CoA hidratasa codificada por el gen *phaj* selectiva para isómeros de tipo R, la enoil-epimerasa codificada por el gen *fadb* que media la conversión reversible de S-isomero a R-isomero y finalmente la enzima 3-cetoacil-CoA reductasa codificada por el gen *fad*, la cual media la reducción de los intermediarios 3-cetoacil-CoA de la β-oxidación a compuestos de tipo R-3 hidroxiacil CoA (Figura 2-9) (Rai et al., 2011).

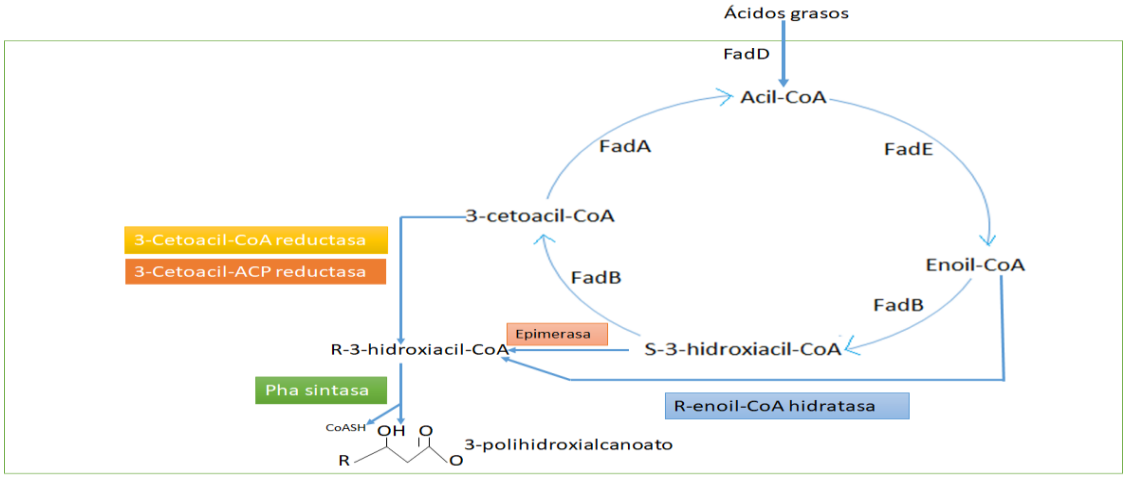


Figura 2-9. Biosíntesis de PHAs por la vía de la β-oxidación. Modificado de (Park, Park, & Lee, 2002).

2.4.4. Aeromonas caviae y polihidroxialcanoatos

A. caviae es una bacteria Gram negativa pertenece a la familia de *Aeromonadaceae* pertenece al grupo de las *Aeromonas* mesófilas móvil, anaerobio facultatitvo, oxidasa e indol positivos. Se encuentra adaptada a ambientes de agua salada, dulce y en el suelo, es la especie más predominante aislada en estuarios. Es considerado un patógeno oportunista causante de infecciones en humanos y peces (Sekizuka et al., 2019). Las afecciones en humanos ocasionadas por *A. caviae* son infecciones gastrointestinales y bacteriemias en pacientes inmunocomprometidos con tumores malignos, cirrosis hepática y neoplasias hemorrágicas (Kimura et al., 2013). Afecta peces de agua dulce como el bagre

africano, la trucha arcoíris, tambaqui y bagre plateado, causando hepatoesplenomegalia, lesiones cutáneas y el deterioro del metabolismo energético hepático, infecciones renales y septicemia hemorrágica (Baldissera et al., 2018).

Se ha identificado la capacidad de *A. caviae* para sintetizar PHAs cuando es cultivada en ácidos grasos, o en medios con fuente de carbono a base de aceite. La enzima PHA sintasa de *A. caviae* es una polimerasa tipo I que posee una especificidad para polimerizar un amplio rango de sustratos que contienen monómeros de 4 a 7 carbonos (Mifune et al., 2010). Se ha evidenciado que debido a la capacidad de la enzima PHA sintasa esta bacteria produce copolímeros de poli-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato P(3HB-co-3HHX) a partir de monómeros derivados de aceite, que tiene mayor versatilidad para el desarrollo de plásticos de diversos usos, sin embargo, su eficiencia en la síntesis de PHAs no es superior a otras bacterias (Harada et al., 2021). A través de ADN recombinante se ha insertado el gen $phaC_{A.c}$ codificante de la enzima PHA sintasa en *C. necátor* para mejorar la producción de P(3HB-co-3HHX) (Kahar et al., 2004). Así mismo se han evaluado estrategias para mejorar la síntesis de P-3HHX que conforma el copolímero como aumentar la expresión de la enzima enoil-CoA hidratasa que provee precursores de R-3-hidroxiacil-CoA para la síntesis de PHA a partir del ciclo de la β-oxidación (Arikawa et al., 2016). Otro de los enfoques consiste en suprimir el suministro del monómero 3HB a través de la eliminación del gen *phaB* (Budde et al., 2011). De igual forma se han realizado mutaciones (Asp149, Asp171, Val214 y Phe518), para mejorar la capacidad de polimerización de 3HHx (Tsuge et al., 2009).

2.5. Polihidroxialcanoatos en plantas

La producción de PHAs en plantas es menos costosa que en bacterias o levaduras, debido a que solo se requiere de agua, nutrientes del suelo, CO_2 atmosférico y luz solar, además la producción de PHA permite dar un valor adicional a los cultivos. En las plantas la síntesis de PHA puede ser metabolizada en diferentes compartimentos subcelulares, debido a la síntesis acetyl CoA en las diferentes vías metabólicas llevadas a cabo en el citosol, plastidios, mitocondrias y peroxisomas (Baidurah, 2022; Manoj et al., 2022). En algunas plantas se ha logrado sintetizar PHAs, tal es el caso de la produccion de PHB en el citosol de *A. thaliana* (Poirier et al., 1992) en plastidios de *N. tabacum* (Lössl, et al., 2005) y en peroxisomas de *Saccharum officinarum* (McQualter et al., 2015).

2.5.1. Síntesis de de los polihidroxialcanoatos en el citosol

La primera aproximación en la producción de biopolímeros en plantas fue realizada en 1992 mediante inserción de los genes codificantes de las enzimas acetil-CoA cetotiolasa (*phaA*), acetil-CoA reductasa (*phaB*) y acetil-CoA sintasa (*phaC*) de *C. necátor* bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV) en *A. thaliana*. La producción de PHB en la planta causó una fuerte reducción en el crecimiento y retraso en el desarrollo de la semilla (Poirier et al., 1992). Entre los años 1994 a 2002 se continuó realizando la transformación de tabaco con los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* de *C. necátor* y el gen *phaC* de *A. caviae* en algodón (*Gossypium herbaceum*), *B. rapa*, *Z. mays* y *N. tabacum* evidenciándose efectos deletéreos en las plantas (Hahn et al.,1997; Nakashita et al., 1999). La expresión de PHA sintasa se perdía con el tiempo afectando la síntesis del biopolímero. Estos resultados permitieron concluir que la biosíntesis de PHB en el citosol producía el secuestro total de acetil-CoA afectando la biosíntesis de hormonas de crecimiento por deficiencia de este sustrato, además los niveles de expresión de PHBs estaban asociados a la baja concentración de acetil-CoA presente en el citosol (Nawrath et al., 1994; Hahn et al.,1997; Nakashita et al.,1999).

Entre los años 2005 a 2015 se realizaron transformaciones genéticas en varias especies de plantas para producir PHB usando diferentes estrategias para mejorar la expresión y la salud de las plantas. Una de las estrategias usada fue insertar en *A. thaliana*, un gen *phaC* de *A. caviae* mutado N149S y D171G, esta condición aumentó de ocho a diez veces la síntesis del copolimero poli (3- hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (Matsumoto et al., 2005). A través de biobalística, fueron introducidos en palma de aceite los tres genes involucrados en la biosíntesis de PHB de *C. necátor* (*phaA*, *phaB* y *phaC*) y el gen codificante treonina dehidratasa de *E. coli*. La expresión de la enzima treonina dehidratasa favoreció la síntesis de PHB en la planta, sin embargo, la producción fue menor a la reportada en otros ensayos (Paveez et al., 2008; Ismail et al., 2010; Parveez et al., 2008).

2.5.2. Síntesis de los polihidroxialcanoatos en plastidios

A partir de los primeros resultados obtenidos en la producción de PHB en el citosol de *A. thaliana*, en 1994 se desarrollaron nuevas aproximaciones dirigiendo la expresión de PHB en plastidios, partiendo de la disponibilidad de altas concentraciones de acetil-CoA existentes en este compartimento subcelular, producto de la biosíntesis de ácidos grasos

que permitiría un suministro adecuado para la biosíntesis de PHAs. En este primer ensayo, los genes fueron insertados individualmente en el genoma vegetal, lo cual afectó la co-segregación y su estabilidad en las siguientes generaciones (Nawrath et al., 1994). Entre los años 2000 y 2005 se realizaron ensayos en *A. thaliana*, *Z. mays*, alfalfa (*Medicago sativa*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y *N. tabacum*, insertando los genes en construcciones poliscistrónicas y dirigiendo su expresión hacia los cloroplastos, leucoplastos y amiloplastos (Mittendorf et al., 1998; Slater et al., 1999; Poirier Yves, 2002; Lössl et al., 2003; Lössl et al., 2005). En 2009 fueron introducidos en plastididos de *A. thaliana* los genes *phaA* y *phaB* de *Pseudomonas sp*. y dos genes mutados, el primero codificante de la enzima 3- cetoacil-acil ACP sintasa III (FabH) y el gen *phaC1*, los genes *fabH* y *phaC1* favorecieron la síntesis de copolimeros y no se reportaron efectos deletéreos (Matsumoto et al., 2009). Posteriormente se determinó que en plastidios se mejoraban los niveles de expresión de los PHBs, aunque los efectos deletéreos persistían debido al secuestro del acetil-CoA requerido para la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos esenciales para los procesos metabólicos de la planta (Bohmert-Tatarev et al., 2011).

2.5.3. Síntesis de los polihidroxialcanoatos en peroxisomas

En los glioxisomas existe un alto contenido de acetil-CoA y acil-CoA, y contiene compuestos intermediarios de R-3-hidroxibutiril-CoA, R-3-hidroxivaleril-CoA, acetil CoA y enzimas que también se encuentran presentes microorganismos, implicados en la biosíntesis de PHAs como 2-enoil-CoA hidratasa y 2-enoli-CoA epimerasa, que pueden ser usados como precursores y mediadores de la síntesis de PHAs en este compartimento subcelular por lo tanto solo con la inserción del gen *phaC* de las bacterias productoras de PHAs se pueden producir en los peroxisomas de plantas. En este contexto, en 1998, se llevó a cabo la primera transformación y síntesis de PHAs en los peroxisomas y glioxisomas de de *A. thaliana* a través de la inserción del gen *phaC1* de *P. aeruginosa* y dirigiendo la enzima hacia peroxisomas con un péptido de tránsito, no se observaron efectos adversos en el crecimiento. Los peroxisomas fueron sustancialmente más grandes en tamaño en las plantas GM y los PHAs acumulados en ellos se componían de 14 diferentes monómeros saturados e insaturados de 6 a 16 átomos de carbono. Estos monómeros podrían estar claramente relacionados con el correspondiente 3-hydroxyacyl-CoA generado por la β-oxidación de ácidos grasos (Mittendorf et al., 1998). En 1999, se logró sintetizar PHB en maíz negro a partir de la inserción de los tres genes *phaA, phaB* y *phaC*, dirigiendo las

enzimas hacia peroxisomas por medio de un péptido de tránsito, obteniendo niveles de producción de 2 % en peso fresco (Hahn et al., 1999). En el año 2002 se insertó en *A. thaliana* el gen *phaC* de *A. caviae*, dirigiendo la proteína hacia peroxisomas logrando producir el copolimero HB-co-HHX y sin generar efectos adversos en el desarrollo de la planta (Arai et al., 2002). En el año 2015, se insertaron en caña de azúcar los genes *npht7*, codificante de la enzima acetoacetil-CoA sintasa en *Streptomyces sp*., *phaB* y *phaC*, y a estos genes se les realizó una optimización de uso codónico para incrementar el rendimiento de PHB en células mesófilas de la caña de azúcar. La enzima acetoacetil-Coa sintasa de *Streptomyces sp* fue más efectiva para capturar el acetil-CoA que la enzima cetotiolasa de *C. necátor* (PhaA*)* (McQualter et al., 2015)

3. Materiales y métodos

3.1. Análisis del estado de propiedad intelectual para Colombia de una línea genéticamente modificada de tabaco productora de polihidroxialcanoatos

Se realizó una búsqueda en bases de datos de patentes de acceso público con el objetivo de identificar patentes que protegen elementos utilizados en el diseño de una línea de tabaco GM que expresa el gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae*, para realizar un análisis del estado de patente de esta tecnología. Se utilizaron las bases de datos The Lens (The Lens-Free and Open Patent and Scholarly search, 2021), Espacenet (Oficina Europea de Patentes, 2021) y Google Patent (Google Patent). También se tomaron en consideración las patentes solicitadas a través del PCT, dirigido por la OMPI. Asimismo, se realizó una búsqueda de títulos de obtentor de variedades de *N. tabacum* en la base de datos PLUTO de la UPOV (https://www.upov.int/pluto/en/).

Para llevar a cabo el objetivo se realizó una búsqueda utilizando los siguientes términos para identificar los símbolos de clasificación apropiados del código internacional de patentes (IPC): "phaA gene", "phaB gene", "phaCA.c gene", "PHAC synthase from Aeromonas caviae", "CaMV35S promoter", "CaMV35 promoter enhancer", "T-Nos terminator", "Target in malate synthase signal", "Transgenic producer of polyhydroxyalkanoates", "Production of polyhydroxyalkanoates in tobacco", "Polyhydroxyalkanoates" and "PHA Copolymer". Los datos de solicitudes de patente recopilados consistieron en familias de solicitudes de patentes, donde una familia corresponde a documentos de patente solicitados en varios países que protegen la misma invención. Se consideró su estatus legal, fecha de prioridad, cobertura geográfica y reivindicaciones. La búsqueda se realizó desde abril de 2019 hasta diciembre de 2021.

3.2. Diseño *in silico* de casetes de expresión codificantes de PHA sintasa para la síntesis de polihidroxialcanoatos

Se diseñaron dos casetes de expresión. El primer casete está regulado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV), la secuencia codificante del gen *phaC* de *A. caviae* (accesión D88825.1), una secuencia señal (péptido de tránsito) para translocar la enzima phaC sintasa hacia peroxisomas, este péptido de tránsito codifica los 10 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la enzima glicolato oxidasa de espinaca y un terminador T-nos, gen codificante de nopalin sintasa de *A. tumefaciens* (Arai, et al., 2002). El segundo casete de expresión está regulado por el p35S de CAMV duplicado, el marco abierto de lectura del gen *phaC* de *A.caviae* con ajuste de uso codónico, y la secuencias del péptido de tránsito y terminador descritos en el primer casete de expresión diseñado.

A la secuencia codificante del gen *phaC*, se le realizó una optimización del uso codónico teniendo en cuenta la preferencia de codones de *N. tabacum* obtenida de la base de datos de Kazusa (Nakamura et al., 2000), en el proceso se usó el software Visual Gene Developer (VGD) 1.3 (Jung & McDonald, 2011) que permite realizar esta optimización del uso codónico basado en el algoritmo de Monte Carlo, donde la escogencia de cada codón es un evento probabilístico independiente. Para escoger la mejor versión del gen se tuvo en cuenta el valor CAI y % GC que más se acerque a la preferencia codónica de *N. tabacum* de acuerdo con la base de datos de Kazusa. Adicionalmente, se realizaron modificaciones silenciosas del gen para eliminar secuencias potenciales de poliadenilación y sitios de corte y empalme críticos que pueden afectar la expresión en el genoma vegetal, usando el software VDG. A cada uno de los constructos se les introdujo sitios de restricción en los extremos 5’ y 3’ para permitir su manipulación. Se realizó un mapa de restricción de los constructos con el fin de seleccionar sitios de restricción que no se encuentren dentro de las secuencias y que se encuentren dentro del sitio de multiclonación.

Los casetes de expresión fueron clonados en el vector de transformación pCAMBIA2301 que contiene un gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina para la selección de colonias de *A. tumefaciens* y para la selección de las plantas GM. La síntesis de los

constructos de expresión diseñados se contrató con la empresa Shangai Generay Biotech Co. Ltda (China).

3.3. Cultivo de tejidos y transfCAormación de *Nicotiana tabacum* con casete sde expresión codificantes de PHA sintasa

Se evaluaron cuatro protocolos de regeneración para la transformación genética de *N. tabacum* (Tabla 3-1**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), con el fin de stablecer el mejor protocolo para la regeneración de las variedades que se usaran en este trabajo.

Tabla 3-1. Protocolos para la regeneración de brotes de *N. tabacum*

Protocolo	Composición	Referencia
P 0	Sales Ms+Vit B5+ Sacarosa 30 g/L+ Bacto	Control
P1	Sales MS+Vit B5+ Sacarosa 30 g/L+ Bacto agar 8g/L + BAP 1mg/ml	(Gubiš et al., 2007)
P2	Sales MS+Vit B5+ sacarosa 30 g/L+ Bacto agar 8g/L + BAP 1,0 mg/ml + ANA 0,2 mg/ml	(Joshi, 2009)
P3	Sales MS+Vit B5+ Sacarosa 30 g/L+ Bactoagar 8g/L + BAP 2,0 mg/ml + ANA 0,5 mg/ml	(Teixeira da Silva, 2005)
P4	Sales Ms+Vit B5+ sacarosa 30 g/L+ Bacto	(Mohan et al., 2013) modificado

Ms: Murashige & Skooge, Vit: vitaminas, BAP: Benzil-amino purina, ANA: ácido naftalenoacetico, AIA: ácido indol acético.

Se evaluaron cuatro concentraciones de antibiótico (50, 100, 150 y 200 mg/mL) con el fin de determinar la concentración adecuada para realizar la selección de las plántulas potencialmente transgénicas.

En los ensayos de regeneración y de selección se escogieron hojas verdes de semillas germinadas *in vitro*, evitando las hojas jóvenes y senescentes, se realizaron cortes de 0.6

-0.8 cm sin bordes y nervadura central. Los explantes fueron sembrados con el lado adaxial en contacto con el medio sólido de regeneración y fueron incubados a temperatura de 28°C y fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad y humedad relativa de 60 %. Para los ensayos de regeneración y selección se usaron en total 35 explantes por protocolo con dos réplicas en el tiempo y en los ensayos de transformación se usaron 50 explantes en total.

Para la transformación genética se realizó la inducción de *A. tumefaciens* en 10 mL de medió LB suplementado con 500 µL de sacarosa al 10 % y 10 µL de kanamicina (stock 50mg/mL), la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores que contienen los casetes de expresión a 28°C y en agitación constante a 150 rpm, posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en 20 mL de medio LB suplementado con 1000 µL de sacarosa 10 % y 20 µL de kanamicina y 20 µL de acetosiringona (stock 20mg/mL), se incubaron a 28°C y agitación constante hasta alcanzar una DO de 0.7 a 1 a 600 nm.

La transformación genética se realizó con la inducción de *A. tumefaciens* LBA4404 en 10 mL de medio LB suplementado con 500 µL de sacarosa 10 % y 10 µL de kanamicina (stock 50 mg/mL). Las células electrocompetentes se lograron con lavados en glicerol estéril al 10 % en frío, que fueron alicuotadas por 50 µL y conservadas a -80°C. La transformación se hizo por electroporación con MicroPulserTM (BioRad) con 1 pulso de 2,20 kV. Las células electrotransformadas se cultivaron en LB con kanamicina (50 mg/ml) por tres días al cabo de lo cual se individualizaron para verificación. La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 transformada con los vectores que contienen los casetes de expresión se crecieron a 28°C y agitación a 150 rpm, posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en 20 mL de medio LB suplementado con 1000 µL de sacarosa 10 %, 20 µL de kanamicina y 20 µL de acetosiringona (stock 20 mg/mL), y se incubaron a 28°C y agitación constante hasta alcanzar D.O. de 0.7 a 1.0 a 600 nm.

Cortes de 0.6-0.8 cm sin bordes y nervadura central de hojas 4-5 de semanas fueron sumergidas dentro de la suspensión bacteriana durante 30 min (cocultivo), posteriormente los explantes fueron secados con toallas absorbentes y transferidos a medio de co-cultivo sólido que contiene 200 µM de acetosiringona, se incubaron a 28°C durante dos días en oscuridad. Los explantes fueron lavados cinco veces en medio líquido de regeneración

(Sales MS+Vit B5+ Sacarosa 30 g/L+ Bacto agar 8g/L + BAP 2,0 mg/ml + ANA 0,5 mg/ml + 400 mg/mL de cefotaxime para eliminar la bacteria), finalmente los explantes se secaron con papel absorbente estéril y sembrados en medio de regeneración suplementados con kanamicina.400 mg/ml de cefotaxime y 250 mg/ml de carbenicilina, y fueron mantenidas bajo las condiciones controladas de temperatura, humedad relativo y fotoperiodo, descritas anteriormente. Cada dos semanas se realizaron cambios de medio. Después de seis semanas los explantes regenerados que tienen brotes con longitudes entre 20-30 mm, fueron cortados y transferidos a un medio de elongación (sales MS 1X, vitaminas B5 1X, sacarosa 30 g/L, cefotaxima 400 mg/ml y 250 mg/ml de carbenicilina). De los explantes que regeneraron en medio de selección se seleccionó un brote por explante para transferir a medio de elongación (sales MS 1X, vitaminas B5 1X, sacarosa 30 g/L y cefotaxima 400 mg/mL y 250 mg/mL de carbenicilina) (Figura 3-1)

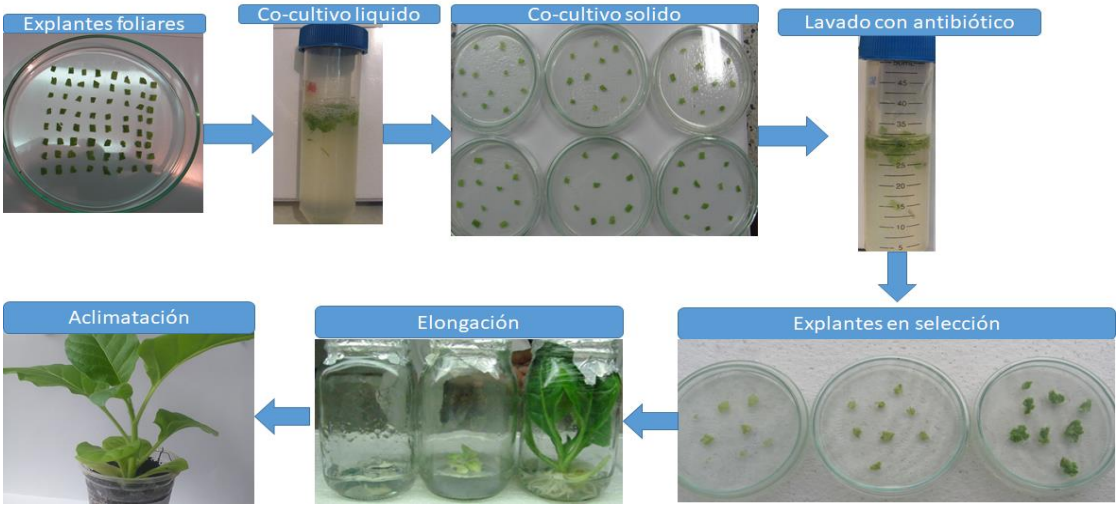


Figura 3-1. Esquema de proceso de transformación. Los explantes fueron transferidos a medio co-cultivo líquido, después de 15 min fueron transferidos a medio co-cultivo sólido, después de tres días los explantes fueron lavados en medio liquido de regeneracion más cefotaxime para eliminar rastros de *A. tumefaciens* y fueron sembrados en medio de selección, una vez los explantes regeneraron brotes, un brote por explante fue transferido a medio de elongación, una vez los explantes elongaron y produjeron raíces fueron aclimatados.

En todos los ensayos de transformación se usaron como control absoluto explantes sin transformar sobre medio de regeneración y como control negativo explantes sin

transformar, sobre medio de selección y como control de transformación se usaron explantes sometidos a transformación con el vector pCAMBIA sin los casetes de expresión.

3.4. Caracterización de los eventos de transformación obtenidos en *Nicotiana tabacum* con el casete de expresión codificante de PHA sintasa

Las plantas potencialmente transgénicas que regeneraron en medio de selección se les realizó la extraccion de ADN con el kit DNesasy® plant mini kit (Qiagen) y fueron analizadas con reacciones de PCR con el fin de determinar la presencia o ausencia del transgen. Para ello se usaron oligonucleótidos diseñados con el programa Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000), tanto para el transgén con uso codónico modificado y para el gen sin uso codónico modificado, el amplicón esperado fue de 613 pb, y las plantas transformadas con el vector sin el transgén fueron analizadas por PCR usando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 300 pb del p35S de CAMV. Las reacciones se realizaron en el equipo MyCycler-ThermalCycler (BIORAD), el programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 seg, hibridación a 56°C por 15 seg y extensión a 72°C por 30 seg. Al final se hizo una extra-extensión a 72°C durante 5 min. Los productos se analizaron en geles de agarosa 1 % teñidos con bromuro de etidio y usando el GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher-Scientific). Se realizó el análisis cuantitativo de expresión de genes en plantas PCR y GUS positivas a través de RT-qPCR. ARN total fue extraído con el kit de extracción Plant/Fungi RNA extraction (Norgen Biotek). Un 1 µg de ARN extraido de cada planta fue tratado con DNasa I (Thermo Scientific). La síntesis de ADNc se realizó con el kit First Strand cDNA synthesis (ThermoFisher Scientific), usando 1 µg de ARN y 100 µM de primers oligoD. La reacción se incubó a 65ºC por 5 min y se agregó buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DTT), 20X de RiboLock inhibidor de RNasa, 10 mM de dNTP mix, y 2 U/µL de M-MulV transcriptasa reversa. Para la reacción de qPCR se usó el kit Luna® Universal qPCR Mix (New England Biolabs) en el equipo LightCycler® 96 (Roche). La reacción de qPCR fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 1 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 62°C por 30 seg, 72°C por 10 seg. Se utilizaron 1.2 µM de

los oligonucleótidos para el transgen, que fueron diseñados con primer3 (https://primer3.ut.ee/). Los oligonucleótidos amplifican el transgén con uso codónico modificado y el transgén con uso codónico sin modificar, los cuales amplifican un fragmento de 103 pb y 120 pb respectivamente. La expresion relativa de los genes en las plantas GM fue normalizada con oligonucleótidos para medir la expresión del gen constitutivo factor de elongación 1α (ef1α), y para el gen de la proteína auxina independiente 1 (AXI1) usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Shmittgen, 2001) de la siguiente manera:

$$\Delta Ct \text{ transgen} = Ct \text{ transgen} - (Ct \text{ ef1}\alpha - Ct \text{ AXI1})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ transgen} - \Delta Ct \text{ control (plantas sin transformar) para los genes normalizadores}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ transgen} - \Delta Ct \text{ control (AX1 de la planta transformada) para los casetes de expresión}$$

$$\text{Expresion} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los datos de la medición relativa de la expresión fueron realizados por triplicado y la expresion relativa fue determinada con respecto al gen control, Los oligonucleótidos se presentan en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR convencional y de qPCR.

Gen	Orientación	Secuencia	Longitud amplicón (pb)
phaC modificado	Directo Reverso	5’- GACGCTCGAGAGTGATGGA-3’ 5’-AGCAGCAATAATCGGCTCATG-3’	613
phaC sin modificar	Directo Reverso	5’-ATGAGCCAACCATCTTATGGC-3’ 5’-TCGAAGGCGGATTCGTCGGT-3’	613
Promotor 35S CAMV	Directo Reverso	5'- CAGAACTCGCCGTAAAGACT-3' 5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTG-3'	300
phaC modificado qPCR	Directo Reverso	5´-GTCGACGATCATATAGCTCTTTGGC-3' 5´-TTATTTGCTGCGGGTGGGTTAATTA-3´	103
phaC sin modificar qPCR	Directo Reverso	5´-ATCTTCATCCACGAGCCCATCATAG-3´ 5´-GGTAGCTGTCGATGTAGTAGTTCCA-3´	120
ef1α qPCR	Directo Reverso	5´-CTGGTAAGGAGATTGAGAAGGAGCC-3´ 5´-GGTAGCTGTCGATGTAGTAGTTCCA-3´	67

AXI1 qPCR	Directo Reverso	5´-ATGAAGAGGAGAAAACAACGC-3´ 5´- AGGAAGGAGGTGGTGAATAC-3´	108

El ensayo de la expresión GUS se realizó con 50 mg de X-Gluc se disuelven en 1 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO). Esta mezcla se adicionó a 100 mL de tampón de reacción (NaH_2PO_4 100 mM, Na_2EDTA 10 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0,5 mM, Triton X-100 0.1 %, X.Gluc 50 mg/mL 1mM). En esta solución se sumergieron hojas sanas de plántulas aclimatadas y permanecieron allí durante 24 h en total oscuridad a 37°C. Transcurrido este tiempo se sumergieron las hojas en etanol al 70 % durante 24 h. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada, se transfirieron a glicerol (50 %) y se visualizaron en un estereoscopio.

La extracción y caracterización del PHA producido se realizó a partir de hojas de plantas GM, el material vegetal fue congelado con N líquido, se maceró y se liofilizó. Los lípidos se removieron por lavados con n-hexano a 65ºC por 24 h con un mínimo de tres cambios del solvente hasta que quedó claro. El material restante se lavó con metanol al 50 % de a 65ºC por 24 h con un mínimo de tres cambios de solvente. El material insoluble en este solvente fue liofilizado, y posteriormente se realizaron extracciones con cloroformo en 65ºC por 48 h. El extracto fue filtrado a través de una fibra de vidrio para eliminar el material vegetal restante. El extracto incubado con cloroformo fue etanolizado con 250 µL de $CHCl_3$, 100 µL de HCl y 850 µL de etanol a 100ºC por 4 h, las muestras fueron recuperadas en hexano (Mittendorf et al, 1998). La presencia del PHA fue determinada por espectrometría UV-VIS (Perkin Elmer lambda 35), operado en el rango de longitud de onda de 250-350 nm. El polímero fue mezclado con 10 mL de H_2SO_4 puro y se incubó a 100°C durante 10 min. Para identificar los grupos funcionales del polímero, se realizó una espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) (Jasco FTIR 615), en un rango espectral de 4000-400 cm^{-1}, empleando 32 escaneos, a una resolución de 4 cm^{-1}, corregido con espectro de fondo de aire. Previamente el polímero fue transesterificado a través de etanólisis acida, mezclando y calentando 0,25 mL de muestra con 0,85 mL de etanol y 0,1 mL de HCL, a 100°C durante 4 h, transcurrido este tiempo la reacción se enfrió. Se realizó un análisis calorimétrico diferencial de barrido (TA DSC Q-2000), purgando con N (80 mL min^{-1}) a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. El sistema se equilibró a -30°C por 5 min. Las condiciones de los calentamientos 1-3 desde -30°C hasta 200°C a una velocidad

de calentamiento de 10°C/min. Primer enfriamiento desde 200 - 30°C a 100°C/min y el segundo desde 200 - 30°C a 10°C/min.

Se realizó una identificación de los gránulos de PHAs en el tejido vegetal. Las muestras se fijaron durante 12 h en glutaraldehido 2.5 %. Después de la fijación, se realizaron cuatro lavados con agua destilada para posteriormente realizar la post-fijación en tetróxido de osmio por 2 h. Luego para la deshidratación, se sumergió la muestra en soluciones de etanol al 70 %, 90 %, 100 % y óxido de propileno dejándola por 30 min en cada solución. A continuación, las muestras deshidratadas fueron puestas en resina (EPON 812+ DDSA) por 2 h. La resina se polimerizó con DPM-30 y se vertió en un molde donde se incorporaron las muestras. Después de 16 h a 68°C a los bloques de resina endurecida con la muestra embebida en ella, se le realizaron cortes ultrafinos (100-150 nm) utilizando una hoja de diamante en un ultramicrótomo (Leica EM UC7), los cuales se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo 4 % y con citrato de plomo 3 %. El análisis de la ultraestructura de las muestras se realizó por medio de un detector de electrones transmitidos (R-STEM) acoplado a un microscopio de barrido de electrones (SEM marca Tescan, modelo Lyra 3), a un voltaje de aceleración de 30kV”.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis del estado de propiedad para Colombia de una línea genéticamente modificada de tabaco productora de polihidroxialcanoatos

Para el desarrollo de una línea GM de *N. tabacum*, se debe inicialmente establecer un protocolo de cultivo de tejidos y un método de transformación genética. La transformación mediada por la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* se logra utilizando fragmentos de hojas como explantes que generan nuevas plántulas por organogénesis directa. Se identificaron seis familias de patentes solicitadas por PCT, que protegen el uso de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* en métodos de transformación genética dicotiledóneas y monocotiledóneas de manera estable o transitoria. La solicitud de patente WO1999010512 protege transformación estable de plantas dicotiledóneas a través de agro-infección con la cepa LBA4404. La solicitud prioritaria de patente WO2004082368 protege un método optimizado de transformación genética basado en transformación de *B. juncea* mediada por *A. tumefaciens* sin determinar la cepa, fue otorgada en Australia,los USA y los países de la UE, mientras que la solicitud prioritaria WO2013149726 protege un proceso de transformación transitoria de hojas por medio de la cepa LBA4404, esta solicitud fue registrada en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Japón, México, los USA y los países de la UE (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Patentes relacionadas con el diseño de tabaco GM que expresa en peroxisomas el gen *phaC*$_{A.c}$ de *A. caviae.*

Elemento	Prioridad de aplicación	Publicación o numero de aplicación	Aplicación por PCT	Propietario	Familia de patentes	País	Clasificación internacional	Fecha de aplicación	Fecha de expiración
Cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*	US 45548203 US 2004008268 US 80513504	US 2004268434	WO 2004082368	University Rutgers Pioneer Hi-bred International Inc	AU 2004222243 EP 1615491	Australia EU UE	C12N15	17/03/2003	16/03/2023
	US 14196708	US 8334429	WO 2010078445	Dow Agrosciences Llc Nomad Bioscience	CA 2745465 AU 2009334507 CN 102282262	Canada Australia China EU	A01H1 C12N1 C12N15	30/12/2008	Lapsed 2017
	US 36896510	US 9617551	WO 2012016222	Dow Agrosciences Llc Merlo Donald J Russell Sean M Narvva Kenneth E	CA 2805263 AU 2011283689 CO 6650932 MX 2013001191 CN 103269577 JP 2013537412 KR 20130132405 CL 2013000270 ZA 2013003330 RU 2013108769 NZ 605584 BR 112013002189	Brasil Canada China Japón EU Mexico Corea Chile Colombia Rusia Nueva Zelanda	A01H15 C12N1 C12N15	28/07/2010	27/07/2030
	EP 12002402	EP 2834362	WO 2013149726	Nomad Bioscience Gmbh	AR 090575 AU 2013243042 CA 2869336 CN 104334730 MX 2014011896 JP 2015512641 BR 112014024608 ES 2674674 US 20150052638	Mexico UE Argentina Brasil China Japón España Canada EU Australia	C12N15	02/04/2012	01/04/2032

Transformacion de plantas mediadapor *Agrobacterium*	EP 97114654	US 6323396	WO 1999010512	Nunhens Zaden Bv Dirks Rob Peeters Roger	AU 1998092647 EP 1009844 CN 1268184 AU 736349 JP 2001514009 AT 269411 DE 69824605 CN 1188525	Australia EU China Japón Alemania UE	C12N1 A01H1 C12N15	24/08/1997	23/08/2017
Transformacion de plantas mediadapor *Agrobacterium*	EP 11151190	US 10472644	WO 2012098119	Philip Morris Products	CA 2824152 SG 192022 CN 103403170 EP 2665818 KR 20140034139 JP 2014512802 DK 2665818 BR 112013018130 PT 2665818 ES 2637825 RU 2711936	Canada España China Japón Corea Dinamarca Brasil Rusia EU	C07K14 C12N15	16/01/2011	15/01/2031
	RU 2002128414	US 7947871	WO 2004038023	Shemyakin And Ovchinnikov Institute Of Bioorganic Chemistry Russian Academy Of Sciences	CA 2503224 AU 2003277759 EP 1577392 RU 2261275	Canada Australia Rusia España UE EU	A01H5 C12N15	3/10/2002	22/10/2022
Promotor *CAMV35S*	US 45841483	US 5352605	Ninguno	Monsanto	US5530196 US6255560	EU	C07K14 C12N15	16/01/1983	15/01/2003
Promotor duplicado *CAMV35S*	US 278087	US 5164316	Ninguno	Monsanto	Ninguno	EU	C12N15	12/01/1987	11/01/2007
Terminador nopalin sintasa	US 45841483	US 5034322	Ninguno	Monsanto	Ninguno	EU	C07K14	16/01/1983	15/01/2003
Vector pCAMBIA2301	US 90892807	US 20090075358	Ninguno	CAMBIA	Ninguno	EU	C12N15	29/03/2007	29/03/2027
Gen *PhaC* de *A. caviae*	US 9685398	US 6593116	WO 2000011188	Metabolix Inc	CA 2339421 AU 1999056761 EP 1105499 KR 20010082176 MX PAO AT319835 DE 69930276	Canada Australia UE Corea México Alemania EU	C12N15 C12N1 C12N9 C12P7 C12R1	17/08/1998	16/08/2018
	US 23587599	US 7455999	WO 2000043523	Metabolix Inc	CA 2360801 AU 2000026231 EP 1208208 JP 2002534981 AT 434045 DE	Australia Canada Japón Alemania UE España EU	C12N9 A01H5 C12N1 C12P7 C12R1	21/01/1999	20/01/2019

					60042413 ES 2344000				
	US 49275606	US 7384766	Ninguno	Kaneka Corp	Ninguno	EU	C12N1 C12P21	25/07/2006	24/07/2026
	US 26016409	US 20130017583	WO 2011060048	Massachusetts Institute of Technology	AU 2010319594 EP 2499235 KR 20120103621 CN 102822349 JP 2013510572	Canada Australia Corea España China Japón EU	C12N1	10/11/2009	01/10/2029
	JP 2014067674	US 10519473	WO 2015146195	Kaneka Corporation,	EP 1208208 JP 2020058391	Alemania UE Japón EU	C12P7 C12N9	27/03/2014	26/03/2034
	US 9800083	EP 1044278	WO 1999035278	Monsanto Poirier Yves Mittendorf Volker	AU 1998059071	Australia UE	C12N9 C12N15 C12P7	04/01/1998	03/01/2018
Péptido de tránsito ARL	US 23587599	US 7504556	WO 2000043523	Metabolix Inc	CA 2360801 AU 2000026231 US 20020040485 EP 1208208 AT 434045 ES 2344000 JP 4986325	Canada Australia EU UE España Japón	A01H5 C12N1 C12N15 C12R1 C12P7	21/01/2003	20/01/2023
	AU 2008906035	AU 2008906035	WO 2010057271	Sugar Industry Innovation	Ninguno	Australia	C12N15 A01H5	20/11/2008	19/11/2028
6 His tag		AU087290	Ninguno	Innogenetics NV	Ninguno	Australia	C12N15	25/06/1998	25/06/2018

La solicitud prioritaria de patente WO2010078445 protege un método de transformación y regeneración de células vegetales mediada por cepa auxotróficas de *A. tumefaciens* (LBA4404, EHA101, C58, EHA105, AGL1, o GV3101) que contienen una mutación en el gen *thyA*, condición que impide crecimiento en medios de cultivo con ausencia de timidina.

La solicitud prioritaria WO2012098119, protege un método de transformación transitoria para *N. tabacum* a través del uso de la cepa LBA4404 para producir proteínas recombinantes, el método propuesto para el desarrollo de una línea GM de *N. tabacum* que exprese el gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* implica un cocultivo de fragmentos de hojas con *A. tumefaciens* sin aplicación de infiltración por presión de vacío, y la expresión es estable, no transitoria. Por tanto, la metodología propuesta para el desarrollo de la línea GM expuesta en este trabajo no está protegida en las reivindicaciones de la patente WO2012098119. La solicitud de patente WO2004038023 cubre un método mejorado de

transformación de *A. tumefaciens* a través de un intervalo de tiempo entre la etapa de preparación, inoculación y co-cultivo.

La solicitud WO199010512 cumplió su tiempo de protección en el año 2017, mientras que las solicitudes prioritarias de patente WO2004038023, WO2004082368, WO2012016222 WO2012098119 y WO2013149726 tienen vigencia hasta 2022, 2023, 2030, 2031, 2032 respectivamente, la solicitud WO2010078445 según la fecha de aplicación su vigencia es hasta el 2028 sin embargo, de acuerdo con la información recuperada en la base de datos de Lens, no se ha registrado ningún pago de mantenimiento desde 2016, por lo tanto perdió vigencia antes de completar 20 años de protección .

Teniendo en cuenta que la solicitud de patente concedida por PCT WO2004038023, WO2012098119 y WO2013149726, fueron otorgadas en Argentina, Brasil y México; considerando la importancia de producir plantas GM con baja carga de DPI en América Latina, es probable que se requieran licencias para la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* en Argentina, Brasil y México. No hay solicitudes de patentes en Colombia, Chile y Perú, por lo tanto las licencias no son necesarias para su uso comercial en estas regiones.

El gen *phaC* proviene de un huésped procariota por lo tanto, para que se pueda expresar en un organismo eucariota, se requiere proporcionar un promotor y una región terminadora adecuada para su expresión en plantas, en este caso el gen *phaC* requiere ser rediseñado y ensamblada la secuencia codificante con un promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CAMV) y un terminador de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-nos), promotor y terminador que han demostrado ser funcionales en la expresión de genes foráneos introducidos en plantas. De acuerdo con la recuperación de información de las bases de datos consultadas, fue identificada una familia de patentes que protegen el promotor 35S CAMV. La solicitud priorizada de patente US5352605A, protege el promotor 35S CAMV y el promotor 19s CAMV como parte de construcciones de expresión y vectores de transformación de plantas en dicotiledóneas usando construcciones quiméricas. Existe una versión del promotor 35S CAMV que tiene una región duplicada para potenciar regulación de la expresión, generando específicamente sobreexpresión del gen. Una familia de patentes protege esta versión, la solicitud prioritaria US5164316 protege una secuencia de inicio de la transcripción formada por secuencias en tándem del

promotor 35S CAMV y cubre su uso en transformación genética de plantas. Las solicitudes de patentes que cubren uso del promotor 35S de CAMV, cumplieron su periodo de protección de 20 años en 2013 y 2015; por tanto, este promotor ya es de dominio público.

La secuencia de terminación de la construcción de expresión de T-nos está protegida por la solicitud de US5034322 que comprende la protección de genes quiméricos que contienen el promotor de nopalina sintasa (*A. tumefaciens*) y la región 3' no traducida del gen codificante de la nopalina sintasa como secuencia de terminación de la transcripción, esta patente expiró en 2003.

Las construcciones de expresión que contienen la región codificante del gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* ensamblada con el promotor 35S CAMV y el terminador T-nos se deben clonar en un vector de expresión para plantas, en este caso se puede clonar en el vector pCAMBIA2301. Teniendo en cuenta esto, se identificó la patente US20090075358 en esta patente, se cubren dos familias de vectores; la primera protege los vectores que contienen el constructo para expresar el gen reportero GUS y la segunda familia que cubre los vectores que no contienen el gen GUS¸ en las dos familias de vectores se protege su uso en la transformación de plantas a través de *A. tumefaciens*. La patente tiene una fecha de vencimiento en 2029, sin embargo, cabe señalar que la institución propietaria de la innovación (vector) ha generado un tratado de código abierto en el que su uso no genera pago de regalías para instituciones con fines de lucro investigativo, académico o no motivacional, así como para países en desarrollo (Tabla 4-1).

Al gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* lo protegen cuatro familias de patentes asignadas por PCT (WO2000043523, WO2011060048, WO2015146195 y WO2000011188) (Tabla 4-1) y una solicitud de patente individual (US7384766); La solicitud prioritaria de patente WO2000043523 cubre un método para producir plantas GM productoras de PHA a partir de la inserción de un gen codificante de la enzima PHA sintasa proveniente de *A. caviae*, *Comamonas testosteroni* y *Thiocapsia pfenigii*, entre otros. Esta solicitud de patente perdió su protección en 2017 porque no se evidenció el pago de la tasa de mantenimiento en el año anterior.

La patente WO2011060048 protege una bacteria recombinante de *C. necátor*, que alberga el gen $phaC_{A.c.}$ de *A. caviae* para producción del copolímero de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato); esta patente fue concedida en China, Japón, Corea, Australia, los USA y en los países de la UE y tiene una vigencia hasta 2033. La solicitud de patente WO2015146195, concedida en los países de la UE, los USA, Australia y Japón, cubre un método para mejorar la producción de copolímero PHA por medio de la capacidad de síntesis de *Aeromonas* que alberga un gen *phaC*, y un gen que codifica una PHA sintasa diferente para producir dos o más PHA con diversos puntos de fusión; esta patente es válida hasta 2035, en los países en los que fue solicitada y concedida. La solicitud de patente WO200011188 comprende cepas recombinantes de microorganismos que tienen genes implicados en biosíntesis de PHA, donde el gen que codifica la PHA sintasa se obtuvo de *A. caviae*; esta patente perdió vigencia en 2018.

La patente US7384766 fue otorgada en los USA, protege una cepa microbiana GM que contiene un gen que codifica la PHA sintasa de *A. cavi*ae, para producir un copolímero de PHA constituido por unidades monoméricas de ácido 3-hidroxibutírico, ácido 3-hidroxihexanoico, ácido 3-hidroxiheptanoico, ácido 3-hidroxiheptanoico, ácido 3-hidroxidocanoico; esta patente tiene vigencia hasta 2028 en los USA (Tabla 4-1).

Los estudios que se han realizado en *N. tabacum* para producir PHA, dirigiendo su biosíntesis hacia los cloroplastos y a nivel nuclear, han generado efectos deletéreos en la planta como clorosis y retraso en el desarrollo (Nakashita et al., 1999; Lössl et al., 2003; Matsumoto et al., 2011). En experiencias reportadas en otras especies, como *Arabidopsis* y caña de azúcar, donde la síntesis de biopolímeros está dirigida hacia peroxisomas, no se observaron efectos que afecten el crecimiento y desarrollo de la planta (Matsumoto et al., 2006; Tilbrook et al., 2011; Anderson et al., 2011). Teniendo en cuenta estas experiencias, al constructo de expresión del gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* en *N. tabacum* se le debe insertar una secuencia que codifica un péptido de tránsito ARL en el extremo C-terminal para dirigir la enzima hacia peroxisomas. El péptido de tránsito ARL está cubierto por tres familias de patentes asignadas por medio de PCT, WO1999035278, WO2000043523 y WO2010057271 registradas en Australia, Japón y la UE. Estas solicitudes cubren la expresión de una enzima PHA sintasa y su orientación a peroxisomas de plantas a través de tripéptidos como como ARM, SRM, SKL, ARL, SRL, PSI o PRM. La

patente WO1999035278 perdió su vigencia en 2018, mientras que las patentes WO2000043523 y WO2010057271 son válidas hasta 2023 y 2028 respectivamente (Tabla 4-1).

Con el fin de generar una etiqueta, el constructo de expresión se insertó una etiqueta His tag. Este elemento está protegido por la solicitud de patente AU087290, el cual fue concedido en Australia y cumplió su tiempo de protección en el año 2018.

Se identificaron 18 familias de patentes y dos solicitudes de patentes relacionadas con los elementos que se requieren para el desarrollo de una línea GM de *N. tabacum* que expresa el gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae*. Se encuentra que USA es la región geográfica con mayor registro de patentes (11 patentes vigentes), seguido de Australia y los países de la UE (7 patentes vigentes), Japón (4 patentes vigentes), Canadá (3 patentes vigentes), Brasil, Argentina, México, Corea del sur (2 patentes vigentes), China y Rusia (1 patente vigente) (Figura 4-1).

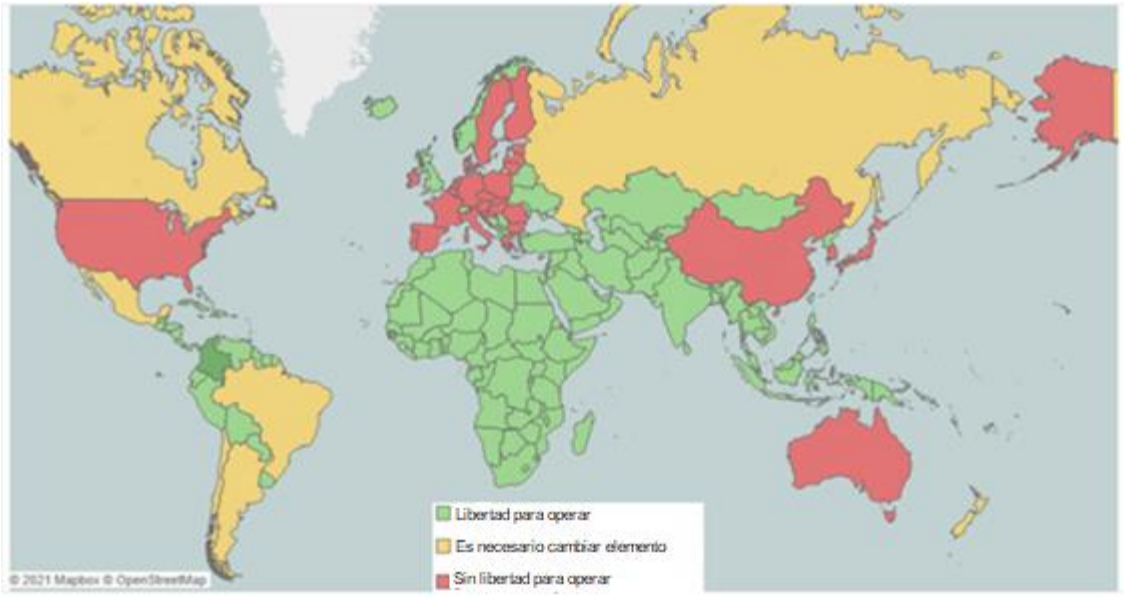


Figura 4-1. Estado de libertad de operación de los componentes del constructo de expresión y el método de transformación para el desarrollo de una línea de tabaco que expresa el gen *phaCA.c* de *A. caviae* para síntesis de PHAs en peroxisomas. Diseñado en MapBox open (c) StreetMap

El análisis de las diferentes patentes relacionadas con desarrollo de la línea de *N. tabacum* GM que expresa el gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae* muestra que las patentes ya no protegen algunos de los elementos. En la mayoría de los casos por vencimiento del plazo de protección (por tanto, son de uso público). En otros casos los componentes están actualmente protegidos por patentes, como el caso del método de transformación mediado por *A. tumefaciens* LBA4404, el péptido de tránsito y del gen $phaC_{A.c}$ de *A. caviae*, por lo que es necesario llegar a acuerdos con los propietarios de las patentes para hacer uso de estos elementos, sin embargo, es importante resaltar que el patentamiento es jurisdiccional, es decir que tiene vigencia en los países en donde fueron solicitados y concedidos. De acuerdo con lo anterior, a la fecha de este análisis, los elementos requeridos para el desarrollo de esta línea GM, no están registrados en países de América Latina, como Colombia, Chile y Perú, por lo tanto, existe libertad para operar y se sugiere el uso de estos para desarrollar una línea con baja carga de DPI de tabaco GM que produzca PHAs con jurisdicción nacional.

Se identificaron registros de PBR para *N. tabacum* en los USA, Canadá, México, Argentina, Colombia, los países de la UE, Rusia, Corea del Sur y China. Los USA y Bulgaria fueron los países con más registros de PBR para esta especie desde 1950 hasta febrero de 2022. Se identificaron 96 variedades, de las cuales 22 de ellas aún tienen protección vigente. Algunas de las variedades que están vigentes son: KF109 (Corea del Sur), KB111LC (Corea del Sur), Wan6513 (China), Guang Yang (China), Vector 21-41 (Canadá), Speight 22 (EE.UU.), AOB176 (EE. UU), MB47 (Argentina) y MB411 (Argentina).

4.2. Diseño del modelo de transformación genética de *Nicotiana tabacum* para producir polihidroxialcanoatos

De acuerdo al estudio de las patentes relacionadas con los elementos implicados en el desarrollo de la planta GM de *N. tabacum* que expresa el gen *phaC* de *A. caviae* para síntesis de PHA y a estudios previos de patentes en el desarrollo de plantas GM tolerantes a sequía y glifosato (Rojas-Arias et a., 2017; Carreño-Venegas et al., 2017) existen algunos elementos genéticos que se encuentran libres de patentes y pueden ser usados en el

desarrollo de plantas GM sin infringir derechos a terceros, garantizando libertad de operación en el desarrollo de líneas GM con baja carga de patentes, disminuir el pago de regalías para uso de los elementos genéticos, reducir costos y facilitar liberación al mercado, para que el tiempo y la capacidad técnica e intelectual invertida en el desarrollo de la planta GM no tenga complicaciones futuras en la liberación comercial, como se evidenció con el desarrollo de una línea GM de papa que expresa el gen *cry1Ac*, la cual no se pudo comercializar porque el acuerdo de transferencia del casete de expresión (suscrito con la Universidad de Ottawa), contenía las cláusulas de uso exclusivo para investigación y prohibición de comercialización (Hincapie & Chaparro-Giraldo, 2014).

En este trabajo se establece un modelo para desarrollar una línea transgénica de *N. tabacum* que expresa el gen *phaC de A. caviae* para síntesis de PHAs, proporcionando una guía del paso a paso teniendo en cuenta el análisis previo al desarrollo de la línea que implica el ELO de los elementos genéticos, métodos y variedades vegetales, y posteriormente el desarrollo de la línea GM. Este paso a paso que incluye un análisis de ELO permite generar una planta GM de tabaco productora de PHAs con posibilidades de comercialización, bajo una aproximación al esquema de “genéricos” similar al desarrollo de medicamentos obtenidos a partir de ingredientes activos que ya no están protegidos por DPI (Kaló, 2015).

Teniendo en cuenta el ELO se decidió usar los elementos libres de patentes para el diseño de los casetes de expresión, como el promotor 35S de CAMV, terminador T-nos y His tag, cuyas patentes caducaron y son de dominio público; de igual forma se usó el vector de clonación y expresión en plantas pCAMBIA2301 porque la empresa propietaria de estos vectores, CAMBIA, tiene como fin proporcionar innovación a la sociedad y el acceso común a dicha innovación a países en vía de desarrollo para promover el desarrollo tecnológico. Las patentes solicitadas por CAMBIA tienen la cláusula de uso libre de sus invenciones para académicos y países en vía de desarrollo (CAMBIA, 2022).

La cepa LBA4404 de *A. tumefaciens,* aunque cuenta con cuatro patentes vigentes (WO2004038023, WO2004082368, WO2012098119 y WO2013149726), la patente que cubre su uso para transformación estable en plantas (WO199010512) no se encuentra vigente, por lo cual es posible usar la cepa sin requerir el pago de regalías.

La variedad de tabaco Samsun no cuentan con título de obtentor vigente según estudio realizado en la base de datos PLUTO de UPOV (variedad Samsun Canik NLI 10821). Así mismo los casetes de expresión fueron sintetizados con una empresa que permite realizar la transferencia de material sin ninguna restricción de uso, incluso comercial.

El desarrollo de la línea GM que expresa el gen *phaC* de *A. caviae* en *N. tabacum* para síntesis de PHAs en peroxisomas, a partir del análisis de ELO, permite aproximarse a un producto “agrobiogenerico”, con el propósito de brindar a la población interesada semillas con baja carga de patentes (Figura 4-2). Un “agrobiogénerico” se constituiría en un desarrollo de una planta GM a partir del uso de elementos genéticos, variedades y tecnologías que ya no se encuentran protegidos por DPI y son de dominio público. Este término surgió cuando se vencieron las primeras patentes que cubrían plantas GM en el año 2015, abriendo la posibilidad de una industria de “agrobiogenéricos” (Rüdelsheim et al., 2018).

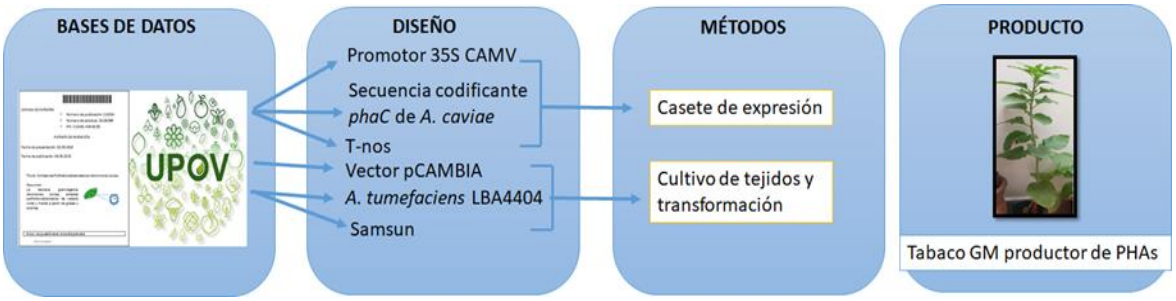


Figura 4-2. Esquema basado en ELO para desarrollar una línea GM con baja carga de DPI de tabaco productora de PHAs.

Cuando se desarrolla un producto “agrobiogenérico” el interesado debe enfrentarse al desafío de la regulación para obtener aprobación de liberación comercial, esta situación es compleja debido a que no existe una armonización en la regulación entre países (Jefferson et al., 2015a; Jefferson et al., 2015b). La regulación de plantas GM tiene variaciones dependiendo si el evento es de primera, segunda o tercera generación. Los cultivos de primera generación tienen propiedades como tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos, los de segunda generación tiene propiedades de mejora de la calidad de alimentos y piensos, y los de tercera generación producen proteínas

recombinantes de interés industrial (farmacéuticos, plásticos biodegradables; etc) (Spök et al., 2008; Spök et al., 2008). La regulación en los países que aprueban el uso de plantas GM se basa en el protocolo de Cartagena sobre la bioseguridad de la biotecnología (Ley 740 de 2002). Se requieren diferentes enfoques normativos para la aprobación de las plantas GM según su destino, como la importación o exportación, ó si es para siembra destinada a consumo humano o piensos (Turnbull et al., 2021). Para plantas GM de primera y segunda generación destinada para la siembra de piensos la regulación exige estudios de equivalencia sustancial que consiste en una comparación del GM con su contraparte convencional, en la que se incluye pruebas de evaluación agronómica y de posibles efectos adversos sobre el medio ambiente (McHughen, 2016). Para los cultivos GM destinados para consumo humano se exigen pruebas que evalúen posibles efectos adversos sobre la salud humano (alérgenos y toxicidad) (NASEM, 2016). Para plantas GM de tercera generación se debe además de realizar evaluaciones agronómicas, ambientales y de seguridad para salud humana, se debe proporcionar una estrategia de liberación comercial ambiental confinada para garantizar que no exista contaminación con semillas destinadas a alimentación humana y animal (Spök et al., 2008). En algunos países la normativa se centra en el cultivo de GM para consumo humano y piensos; mientras que en otros está enfocada en la importación de alimentos derivados de cultivos GM para alimentación. En USA se regulan los cultivos GM (USDA APHIS, 2022). En Canadá la normatividad para el cultivo de GM y consumo está basado en un rasgo novedoso, no en la forma en que se introdujo, se clasifica la planta con características novedosas y no como GM (CFIA, 2022). En la UE la normatividad está enfocada en alimentos GM importados más que en cultivos GM (Eriksson, et al., 2020). En América Latina la regulación se está intentando armonizar para cultivos y productos GM realizando una evaluación de caso por caso en aquellos países en los que se aprueba su cultivo y uso como Brasil, Argentina, Colombia, Costa Rica, Honduras, Paraguay y Uruguay (Benítez et al., 2020).

Para que el desarrollo de un “agrobiogenérico” logre la aprobación de liberación comercial, su desarrollador cuenta con dos escenarios posibles. En el primero depende del paquete de datos globales que contiene las pruebas realizadas por el titular de la patente ya vencida que presentó para su aprobación en los países en los que el titular quiso comercializar su cultivo o importación del GM (Rüdelsheim et al., 2018). En los Estados Unidos, una vez se desregula un GM, es considerado un producto de comercialización libre y no hay necesidad

de realizar nuevas solicitudes de aprobación a no ser que sea introducidas nuevas propiedades, o existan modificaciones en el evento (USDA APHIS, 2022). Sin embargo, en otros países como China, los países de la UE y Corea del Sur, las aprobaciones expiran, y se debe solicitar una extensión de la aprobación suministrando datos actualizados y en algunos casos se exige informes periódicos. En este sentido, si un titular que ya no cuenta con protección de su producto, no desea mantener actualizada su aprobación, el desarrollador de un "agrobiogenérico" no podría comercializar su producto en esos países, puesto que el titular es el autor de las evaluaciones y en las oficina regulatorias se cuenta con un acuerdo de confidencialidad que protege esta información, la alternativa en este caso consiste en que el interesado llegue a un acuerdo o licencia con el titular del evento GM (Rüdelsheim et al., 2018). El segundo escenario consiste en que el desarrollador del "agrobiogenérico" debe iniciar el proceso con datos propios, realizando evaluaciones adaptadas a la regiones donde desea la liberación comercial, además es importante resaltar que si el interesado generó un nuevo evento debe suministrar nuevos estudios del sitio de inserción y su efecto de la inserción en las características agronómicas, sin embargo para reducir costos en las evaluaciones puede llegar acuerdos con los titulares para tener acceso a información general que puede ser válida para varios eventos (origen del transgén, secuencia de nucleótidos, proteína, rasgo genético, alergenicidad y toxicidad, etc) (Rüdelsheim et al., 2018).

4.3. Aspectos relevantes en el diseño de un casete de expresión

Un casete de expresión es una construcción de ADN sintético constituida por una secuencia reguladora, un marco abierto de lectura y una región 3´ no traducida; en eucariotas esta región 3´ no traducida contiene un sitio de poliadenilación. Este casete de expresión está diseñado para producir ARN y proteínas en una célula transfectada; el casete es insertado en un vector de expresión y este se usa para transferir el casete a una célula huésped. Un casete de expresión puede ser transfectado y expresado en bacterias, levaduras, plantas y células mamíferas siempre y cuando se usen las secuencias reguladoras adecuadas para cada organismo (Agarwal et al., 2014).

Para mejorar la expresión de genes heterólogos se deben tener en cuenta algunos aspectos en el casete de expresión como: % GC, índice de adaptación de codones (CAI), numero efectivo de codones (Nc), abundancia de ARN de transferencia (ARNt), sitios prematuros de polyA y sitios crípticos de corte y empalme (Anwara et al., 2021).

El % GC es una característica del genoma única de cada organismo, y puede ser utilizado para clasificar organismos en taxonomía. En organismos procariotas el % GC es más alto que en organismos eucariotas; así mismo entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, existe una variación del % GC notoria en la última base de cada codón, siendo mayor él % GC en monocotiledóneas que en dicotiledóneas (Zhang et al., 2018). Por lo tanto, cuando se desea insertar un gen originario de un organismo procariota a uno eucariota, o entre especies del mismo reino, se puede realizar el ajuste del % GC del gen al organismo huésped. Lie et al., 2013, modificaron el % GC del gen *cry1Ah* desde 37 % a 48, 55 y 63 %, mejorando su expresión en tabaco GM y la resistencia de la planta a insectos (Li et al., 2013). El CAI mide el grado en el que se adaptan los codones de un gen a las frecuencias de uso de codones de un determinado organismo. Esta medición se realiza basada en un conjunto de genes de referencia altamente expresados de un determinado organismo para evaluar el peso relativo de cada codón y su valor oscila entre 0 y 1.0, un CAI de 1.0 indica que el gen utiliza, para cada aminoácido, el codón más frecuente en el conjunto de referencia (Sharp & Li, 1987). El CAI predice el nivel de expresión de una proteína, cuanto más cercano a 1.0 mejor será los niveles de expresión, sin embargo no es recomendable ajustar el CAI de un gen a 1.0 porque se generará un agotamiento de los ARNt frecuentes, ocasionando un patrón de uso codónico sesgado y mayores errores de traducción, además el uso codónico rígido impide la flexibilidad en la selección de codones generando elementos repetitivos y estructuras de ARNm secundarias en el gen (Sahoo et al., 2019). De acuerdo con lo expuesto, se evaluó el efecto de la optimización de uso codónico sobre la expresión del gen *bar* en tabaco y determinaron que porcentajes entre 63.9 a 93.9 % de codones optimizados no generan una ganancia en la expresión del gen, pero reducen el porcentaje de codones optimizados a 54 % lo que generó una pérdida de la expresión del gen, por lo que se evidenció que se debe establecer un porcentaje de codones optimizados suficiente para lograr altos niveles de expresión (Agarwal et al., 2019).

Teniendo en cuenta que están disponibles genomas completos de muchos organismos, se han creado tablas de preferencia de uso codónico para muchas especies, lo cual ha permitido realizar las optimizaciones de uso codónico *in silico*, acoplando la tabla a un software especializado, que permite realizar modificaciones sinónimas en la secuencia de nucleótidos de los genes para mejorar su expresión en sistemas heterólogos. En el 2019, se optimizó el uso codónico de genes *pat* para *Hordeum vulgare, Z. mays ssp. mexicana,* un hibrido entre *Sorghum bicolor*/*Oryza sativa* y *S.bicolor*, usando la función de retrotranscripcion de Vector NTI Software Advanced (Invitrogen) que permitió ajustar el CAI de acuerdo a las tablas de preferencia de uso codónico para cada especie. Los genes *pat* optimizados adicionalmente tenían modificaciones adicionales como presentar promotores dobles que mejoran la transcripcion, presencia o ausencia de un intron entre el promotor y la secuencia codificante. Las plantas transformadas con los casetes optimizados presentaron mejores niveles expresión que los casetes sin optimizar sin embargo en las plantas transformadas con los casetes optimizados que además tenían un promotor doble y un intron no presentaron diferencias en la exprescion con respecto a las plantas transformadas con casetes sin optimizar (Sivamani et al., 2019).

El Nc mide el grado de sesgo codónico, es decir determina la combinación de codones posibles para codificar un mismo aminoácido, este rango va entre 20 a 61, donde 20 indica un patrón de uso de codones menor entre los codones sinónimos y 61 indica un patrón de uso de codones igual entre los codones sinónimos sin preferencia (Fulgsang, 2004). En tabaco se ha reportado un Nc de 58.31, esto indica que existe una preferencia codonica aleatoria con un sesgo codónico débil, el Nc es inversamente proporcional al % GC y directamente proporcional a % AT, es decir que cuando hay un Nc alto, el % GC es bajo y el % AT es alto (Anwara et al., 2021).

La preferencia codónica en cada organismo depende de la abundancia de ARNt y de la afinidad de los codones con los ARNt. La abundancia de ARNt se determina con predicciones en los genes de referencia altamente expresados (Deng et al., 2015). Se ha evidenciado la modificación de adenosina inosina en la posición del anticodón de ARNt (I34) por adenosina deaminasa (ADATs) en organismos eucariotas y esta modificación está asociada con la preferencia de uso de codones y la abundancia de determinado grupo de ARNt. En 2020 se realizó el silenciamiento de adat2 en *Neurospora crassa* perjudicando

los niveles de ARNt relacionados con ADAT, generando una reprogramación de la traducción, cinética y de elongación de los codones y la inducción de diferentes ARNm (Lyu et al., 2020).

Existen algunos elementos presentes en los genes de origen procariota que pueden afectar la transcripcion del ARNm cuando los genes son insertados y expresados en células eucariotas, estos elementos son: las secuencias ricas en A –T presentes en el gen procariota pueden causar terminación prematura de la transcripción y menos cantidad de ARNm en las células eucariotas, por lo que se sugiere realizar una eliminación de sitios potenciales de colas polyA en el gen procariota. Así mismo se requiere eliminar sitios putativos de corte y empalme que puedan afectar la expresión en el organismo eucariota al incrementar o reducir el tamaño del ARNm y tamaño de la proteína alterando el marco abierto de lectura y en algunas ocasiones remover dominios esenciales de la proteína, afectando su función (Watts et al., 2021). Por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa Aequorea, es usada como marcador de selección en plantas, sin embargo, su expresión era baja debido a la presencia de una secuencia similar a un intron en plantas y sus niveles de expresión aumentaron con la eliminación de sitios críticos de corte y empalme (Haseloff et al., 1997).

4.3.1. Diseño *in silico* casetes de expresión codificante de PHA sintasa para la síntesis de polihidroxialcanoatos

La versión del casete de expresión que contiene la secuencia codificante del gen $phaC_{A.c}$ sin modificar y la versión del casete de expresión con la secuencia codificante del gen $phaC_{A.c}$ con optimización de uso codónico fueron diseñados para mejorar la inserción en el genoma de *N. tabacum*, aumentar la probabilidad de eventos transgénicos, garantizar su expresión y dirigir la enzima hacia peroxisomas.

El casete de expresión que contiene la secuencia codificante del gen $phaC_{A.c}$ sin modificar se denominó $PHAC_{A.c.}$, este casete tiene un tamaño de 2642 pb (Tabla 4-2). El casete de expresión que contiene la secuencia codificante del gen $phaC_{A.c}$ con optimización del uso codónico se denominó $PHAC_{AC}MOD$, este casete tiene un tamaño de 2891 pb (Tabla 4-2 y Figura 4-3).

Tabla 4-2. Componentes de los casetes de expresión *phaC*.

Nombre	Promotor	Etiqueta	Gen	Secuencia señal	Terminador	Tamaño de la secuencia codificante (pb)	Tamaño del constructo de expresión (pb)
$PHAC_{A.c}$	CAMV35S	His tag	*phaC* de *Aeromonas caviae*	10 a.a C-terminal Malato sintasa de *Cucúrbita máxima*	Nopalin sintasa *Agrobacterium tumefaciens*	1839	2642
$PHAC_{AC}MOD$	CAMV35S duplicado	His tag	*phaC* de *Aeromonas cavie* optimizado	10 a.a C-terminal Malato sintasa de *Cucúrbita máxima*	Nopalin sintasa *Agrobacterium tumefaciens*	1839	2891

Figura 4-3. Esquema del diseño estándar de los casetes de expresión para los genes *phaC* de *A. caviae*.

El gen *phaC* es de origen bacteriano por lo tanto el % GC es más alto que el reportado en genomas vegetales (Sahoo, Satyabrata; Das , Shib Sankar; Rakshit, Ria, 2019), teniendo en cuenta esto se realizó la optimización del uso codónico para el casete de expresión *$PHAC_{AC}MOD$,* reduciendo el contenido de GC en el primer codón a 44.725 %, en el segundo a 57.239 % y en el tercer codón a 35,90 %, en este último fue en el que se generó un mayor cambio puesto que el gen nativo contenía un 90 % de GC (Tabla 4-3). De acuerdo con la tabla de uso codónico de Kazusa para *N. tabacum* el % GC en el primer codón es de 50.91, en el segundo codón de 39.69 % y para el tercero de 39,53 % y un índice de preferencia codónico (CAI) entre 0.5-0.8 (Tabla 4-4). Tras las modificaciones en el % GC, se logró obtener un valor CAI de 0.733 (Tabla 4-4).

Tabla 4-3. Valores de referencia del uso codónico para *N. tabacum* según la base de datos Kazusa Japón. Fuente: (Kazusa, 2020).

N.tabacum	**% GC total**	**% GC codón 1**	**% GC codón 2**	**% GC codón 3**	**Ref CAI**
	43.38	50.91	39.69	39.53	0.5-0.8

Tabla 4-4. Optimización uso codónico gen *phaC*.

GEN	CAI	Nc	% GC total	% GC Codón 1	% GC Codón 2	% GC Codón 3
PhaC$_{A.c}$	0.525	25.001	65.824	65.824	41.245	90.404
PHAC$_{AC}$*MOD*	0.733	49.411	44.725	57.239	41.245	35.690

El valor CAI obtenido se encuentra dentro del rango permitido para *N. tabacum*, como ha sido evidenciado en otras aproximaciones en donde se han evaluado de forma exitosa la optimización de la expresión de genes en *N. tabacum* con un CAI similar al obtenido en este estudio. Por ejemplo, se demostró la eficiencia de la traducción del gen codificante del factor de crecimiento de plaquetas humanas BB en *N. tabacum*, al gen se le realizó un ajuste de uso codónico logrando un gen optimizado con un CAI de 0.85 (Mohammadzadeh et al., 2014), y en 2013 fue reportado la alta producción de la proteína de core del virus de la hepatitis C en *N. tabacum*, atribuido a la optimización del gen a partir del ajuste de uso codónico con un CAI entre 0.65-0.80 (Deepa et al., 2013). En otro estudio se reporta la expresión óptima en tabaco de una versión del gen proquimosina con optimización de uso codónico, el valor del CAI del gen fue de 0.929, este gen en su versión original presentaba un valor CAI de 0.628, y no había logrado expresarse en la planta (Azizi-Dargahlou et al., 2022).

El Nc de *PHAC*$_{AC}$*MOD* es de 49.41 y la versión original tenía un Nc muy sesgado de 25, las modificaciones permitieron aumentar el Nc, esta condición podría generar mayor flexibilidad al proceso de traducción. La optimización de uso codónico subiendo el Nc del gen codificante del péptido Mambalgina-1, molécula con actividad anticancerígena, el % GC y la eliminación de sitio crípticos de corte y empalme favoreció el incremento de la expresión de la proteína de 30.3 a 39.2 (Khezri et al., 2020).

Se modificaron 368 bases nitrogenadas y 123 codones de la secuencia codificante del constructo *phaC*$_{A.c.}$, producto del ajuste de uso codónico a *N. tabacum.* Al constructo *PHAC*$_{AC}$*MOD* también se le eliminaron 21 sitios prematuros de poliadenilación y 23 sitios críticos de corte y empalme de la secuencia codificante. La Figura 4-4 indica los

alineamientos de la secuencia nativa de la región codificante del gen *phaC* y la versión optimizada. Se ha reportado la optimización del uso codónico del gen *cry1Ah1* para álamo, ajustando el % GC y rediseñando regiones ricas de A-T que se asemejan a intrones en plantas, secuencias potenciales de polyA y secuencias ATTTA que desestabiliza en ARNm en organismos eucariotas, estas modificaciones fueron realizadas con el software CodonPoplar (http://120.79.60.226:8080/u/chen/w/codonpoplar). Esta optimización incrementó la expresión de la proteína Cry1Ah1, y la resistencia del álamo GM a *Hyphantria cunea* (Xu et al., 2019).

```
D88825.1       ATGAGCCAACCATCTTATGGCCCGCTGTTCGAGGCCCTGGCCCACTACAATGACAAGCTG 60
PHACACMOD      ATGAGTCAACCCTCATATGGGCCACTATTCGAAGCTCTTGCTCATTATAACGATAAGCTT 60
               ***** *****.**:***** **.**.*****.** ** ** ** ** ** ** ** *****

D88825.1       CTGGCCATGGCCAAGGCCCAGACAGAGCGCACCGCCCAGGCGCTGCTGCAGACCAATCTG 120
PHACACMOD      CTTGCAATGGCAAAAGCTCAAACAGAGCGAACTGCGCAAGCTCTCTTACAGACAAACCTG 120
               ** **.*****.**.** **.********.** ** **.** **  *.*****.** ***

D88825.1       GACGATCTGGGCCAGGTGCTGGAGCAGGGCAGCCAGCAACCCTGGCAGCTGATCCAGGCC 180
PHACACMOD      GATGACCTTGGGCAAGTGCTTGAGCAAGGTTCACAACAGCCATGGCAATTAATCCAGGCT 180
               ** ** ** ** **.***** *****.** : .**.**.**.*****. *.********

D88825.1       CAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCAAGCTGATGCAGCACACCCTGCTCAAAAGCGCA 240
PHACACMOD      CAGATGAACTGGTGGCAAGATCAGTTGAAACTTATGCAGCATACTCTTCTTAAATCAGCA 240
               *****************.****** * **.** ******** ** ** ** ***: .***

D88825.1       GGCCAGCCGAGCGAGCCGGTGATCACCCCGGAGCGCAGCGATCGCCGCTTCAAGGCCGAG 300
PHACACMOD      GGGCAACCAAGCGAGCCCGTTATTACACCCGAGAGAAGCGATAGACGCTTTAAAGCTGAA 300
               ** **.**.******** ** ** **.** ***.*.******.*.***** **.** **.

D88825.1       GCCTGGAGCGAACAACCCATCTATGACTACCTCAAGCAGTCCTACCTGCTCACCGCCAGG 360
PHACACMOD      GCTTGGTCAGAACAGCCTATTTATGACTATCTTAAACAGTCCTACCTCCTAACAGCTAGA 360
               ** ***: .*****.** ** ******** ** **.*********** **.**.** **.

D88825.1       CACCTGCTGGCCTCGGTGGATGCCCTGGAGGGCGTCCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTG 420
PHACACMOD      CATTTGTTAGCTTCTGTAGACGCTCTAGAAGGTGTACCGCAGAAATCCAGGGAAAGACTC 420
               **  ** *.** ** **.** ** **.**.** **.** *****.: *.****..*.**

D88825.1       CGTTTCTTCACCCGCCAGTACGTCAACGCCATGGCCCCCAGCAACTTCCTGGCCACCAAC 480
PHACACMOD      AGATTTTTTACAAGGCAGTATGTGAATGCTATGGCTCCATCCAATTTTCTAGCTACTAAT 480
               .*:** ** **..* ***** ** ** ** ***** **.: *** ** **.** ** **

D88825.1       CCCGAGCTGCTCAAGCTGACCCTGGAGTCCGACGGCCAGAACCTGGTGCGCGGACTGGCC 540
PHACACMOD      CCTGAATTGTTGAAATTGACGCTCGAGAGTGATGGACAAAATCTGGTAAGGGGTTTAGCT 540
               ** **. ** * **. **** ** ***:  ** **.**.** *****..* **: *.**

D88825.1       CTCTTGGCCGAGGATCTGGAGCGCAGCGCCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAA 600
PHACACMOD      TTGTTAGCTGAAGATTTGGAACGTAGCGCCGATCAATTGAACATTAGACTCACTGACGAA 600
                * **.** **.*** ****.** ***********. * ***** .*.** ** ******

D88825.1       TCCGCCTTCGAGCTCGGGCGGGATCTGGCCCTGACCCCGGGCCGGGTGGTGCAGCGCACC 660
PHACACMOD      TCAGCCTTCGAACTTGGTCGCGATCTCGCTCTTACTCCTGGGAGGGTTGTTCAACGGACT 660
               **.********.** ** ** ***** ** ** ** ** ** .**** ** **.** **

D88825.1       GAGCTCTATGAGCTCATTCAGTACAGCCCGACTACCGAGACGGTGGGCAAGACACCTGTG 720
PHACACMOD      GAACTCTATGAGTTAATACAGTACAGTCCAACTACTGAGACTGTAGGTAAAACACCTGTC 720
               **.********* *.**:******** **.***** ***** **.** **.********
```

```
D88825.1       CTGATAGTGCCGCCCTTCATCAACAAGTACTACATCATGGACATGCGGCCCCAGAACTCC 780
PHACACMOD      CTTATAGTTCCACCGTTTATTAACAAATATTATATTATGGATATGCGTCCTCAAAATAGT 780
               ** ***** **.** ** ** *****.** ** ** ***** ***** ** **.** :

D88825.1       CTGGTCGCCTGGCTGGTCGCCCAGGGCCAGACGGTATTCATGATCTCCTGGCGCAACCCG 840
PHACACMOD      CTTGTAGCATGGCTTGTTGCTCAGGGTCAAACAGTTTTTATGATCAGTTGGAGAAATCCA 840
               ** **.**.***** ** ** ***** **.**.**:** ******:  ***.*.** **.

D88825.1       GGCGTGGCCCAGGCCCAAATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGATGGCGTCATCGCCGCC 900
PHACACMOD      GGTGTAGCACAAGCACAGATTGACCTAGATGACTATGTGGTAGATGGAGTTATTGCAGCT 900
               ** **.**.**.**.** ** **.** ***** *****.*****.** ** **.**

D88825.1       CTGGACGGCGTGGAGGCGGCCACCGGCGAGCGGGAGGTGCACGGCATCGGCTACTGCATC 960
PHACACMOD      TTGGACGGGGTTGAAGCTGCCACGGGGGAGAGGGAAGTTCACGGCATCGGTTATTGTATC 960
                ******* ** **.** ***** ** ***.****.** *********** ** ** ***

D88825.1       GGCGGCACCGCCCTGTCGCTCGCCATGGGCTGGCTGGCGGCGCGGCGCCAGAAGCAGCGG 1020
PHACACMOD      GGTGGAACCGCATTGTCATTGGCTATGGGATGGCTCGCCGCCCGGAGACAAAAACAAAGA 1020
               ** **.*****. ****. * ** *****.***** ** ** ***.*.**.**.**..*.

D88825.1       GTGCGCACCGCCACCCTGTTCACTACCCTGCTGGACTTCTCCCAGCCCGGGGAGCTTGGC 1080
PHACACMOD      GTGCGCACTGCTACTTTATTCACTACACTTTTGGATTTTTCCCAGCCTGGTGAGTTAGGA 1080
               ******** ** **  *.********.**  **** ** ******** ** *** *:**.

D88825.1       ATCTTCATCCACGAGCCCATCATAGCGGCGCTCGAGGCGCAAAATGAGGCCAAGGGCATC 1140
PHACACMOD      ATTTTTATTCATGAGCCGATTATTGCTGCTTTAGAAGCGCAAAATGAAGCTAAAGGAATT 1140
               ** ** ** ** ***** ** **:** **  *.**.***********.** **.**.**
```

Figura 4-4. Alineamiento secuencia nativa del gen codificante *phaC*$_{A.c}$ y la versión optimizada

Para determinar si las modificaciones en la secuencia codificante del casete de expresión *PHAC*$_{AC}$*MOD* y el ensamblaje con la región promotora, el péptido de tránsito y la región terminadora no afectaron el marco abierto de lectura del gen *phaC* original, se usó la herramienta ORF Finder del NCBI con la cual se evidenció que los casetes de expresión poseen una secuencia proteica de 612 aminoácidos (Figura 4-5).

A. PHAC A.C

```
MHHHHHHMSQPSYGPLFEALAHYNDKLLAMAKAQTERTAQALLQTNLDDL
GQVLEQGSQQPWQLIQAQMNWWQDQLKLMQHTLLKSAGQPSEPVITPERS
DRRFKAEAWSEQPIYDYLKQSYLLTARHLLASVDALEGVPQKSRERLRFF
TRQYVNAMAPSNFLATNPELLKLTLESDGQNLVRGLALLAEDLERSADQL
NIRLTDESAFELGRDLALTPGRVVQRTELYELIQYSPTTETVGKTPVLIV
PPFINKYYIMDMRPQNSLVAWLVAQGQTVFMISWRNPGVAQAQIDLDDYV
VDGVIAALDGVEAATGEREVHGIGYCIGGTALSLAMGWLAARRQKQRVRT
ATLFTTLLDFSQPGELGIFIHEPIIAALEAQNEAKGIMDGRQLAVSFSLL
RENSLYWNYYIDSYLKGQSPVAFDLLHWNSDSTNVAGKTHNSLLRRLYLE
NQLVKGELKIRNTRIDLGKVKTPVLLVSAVDDHIALWQGTWQGMKLFGGE
QRFLLAESGHIAGIINPPAANKYGFWHNGAEAESPESWLAGATHQGGSWW
PEMMGFIQNRDEGSEPVPARVPEEGLAPAPGHYVKVRLNPVFACPTEEDA
AIIHHPRELARL
```

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt | aa)
ORF2	**+**	**2**	**545**	**2383**	**1839 | 612**
ORF1	+	2	8	436	429 | 142
ORF8	+	3	1449	1670	222 | 73
ORF9	+	3	1689	1907	219 | 72
ORF17	-	3	1707	1516	192 | 63
ORF7	+	3	888	1064	177 | 58
ORF6	+	3	582	737	156 | 51
ORF13	-	2	307	170	138 | 45
ORF12	-	2	2359	2234	126 | 41
ORF4	+	3	336	458	123 | 40

B. PHAC$_{AC}$MOD

```
MHHHHHHMSQPSYGPLFEALAHYNDKLLAMAKAQTERTAQALLQTNLDDL
GQVLEQGSQQPWQLIQAQMNWWQDQLKLMQHTLLKSAGQPSEPVITPERS
DRRFKAEAWSEQPIYDYLKQSYLLTARHLLASVDALEGVPQKSRERLRFF
TRQYVNAMAPSNFLATNPELLKLTLESDGQNLVRGLALLAEDLERSADQL
NIRLTDESAFELGRDLALTPGRVVQRTELYELIQYSPTTETVGKTPVLIV
PPFINKYYIMDMRPQNSLVAWLVAQGQTVFMISWRNPGVAQAQIDLDDYV
VDGVIAALDGVEAATGEREVHGIGYCIGGTALSLAMGWLAARRQKQRVRT
ATLFTTLLDFSQPGELGIFIHEPIIAALEAQNEAKGIMDGRQLAVSFSLL
RENSLYWNYYIDSYLKGQSPVAFDLLHWNSDSTNVAGKTHNSLLRRLYLE
NQLVKGELKIRNTRIDLGKVKTPVLLVSAVDDHIALWQGTWQGMKLFGGE
QRFLLAESGHIAGIINPPAANKYGFWHNGAEAESPESWLAGATHQGGSWW
PEMMGFIQNRDEGSEPVPARVPEEGLAPAPGHYVKVRLNPVFACPTEEDA
AIIHHPRELARL
```

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt | aa)
ORF4	**+**	**2**	**788**	**2626**	**1839 | 612**
ORF14	-	2	808	470	339 | 112
ORF15	-	2	460	143	318 | 105
ORF12	-	1	971	714	258 | 85
ORF18	-	3	570	367	204 | 67
ORF7	+	3	1692	1886	195 | 64
ORF9	+	3	2469	2657	189 | 62
ORF13	-	2	2602	2429	174 | 57
ORF6	+	3	825	980	156 | 51
ORF2	+	2	272	409	138 | 45

Figura 4-5. Traducción *in silico* de los casetes de expresión *PHAC$_{A.C}$* y *PHAC$_{AC}$MOD*.

Se realizó un alineamiento pareado con el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) (Needleman & Wunsch, 1970) y se demostró un 95 % de identidad, entre la proteína original (accesión BAA21815.1) y la proteína esperada de los casetes de expresión, comprobándose que los casetes de expresión codifican para la enzima PHA sintasa de *A caviae*. Las diferencias corresponden a la secuencia His tag en el extremo N-terminal y del péptido de tránsito del gen *PH$_{Ac}$MOD* (Figura 4-6).

```
BAA21815.1      -------MSQPSYGPLFEALAHYNDKLLAMAKAQTERTAQALLQTNLDDLGQVLEQGSQQ 53
PHAcMOD         MHHHHHHMSQPSYGPLFEALAHYNDKLLAMAKAQTERTAQALLQTNLDDLGQVLEQGSQQ 60
                       ***************************************************

BAA21815.1      PWQLIQAQMNWWQDQLKLMQHTLLKSAGQPSEPVITPERSDRRFKAEAWSEQPIYDYLKQ 113
PHAcMOD         PWQLIQAQMNWWQDQLKLMQHTLLKSAGQPSEPVITPERSDRRFKAEAWSEQPIYDYLKQ 120
                ************************************************************

BAA21815.1      SYLLTARHLLASVDALEGVPQKSRERLRFFTRQYVNAMAPSNFLATNPELLKLTLESDGQ 173
PHAcMOD         SYLLTARHLLASVDALEGVPQKSRERLRFFTRQYVNAMAPSNFLATNPELLKLTLESDGQ 180
                ************************************************************

BAA21815.1      NLVRGLALLAEDLERSADQLNIRLTDESAFELGRDLALTPGRVVQRTELYELIQYSPTTE 233
PHAcMOD         NLVRGLALLAEDLERSADQLNIRLTDESAFELGRDLALTPGRVVQRTELYELIQYSPTTE 240
                ************************************************************
```

```
BAA21815.1      TVGKTPVLIVPPFINKYYIMDMRPQNSLVAWLVAQGQTVFMISWRNPGVAQAQIDLDDYV 293
PHAcMOD         TVGKTPVLIVPPFINKYYIMDMRPQNSLVAWLVAQGQTVFMISWRNPGVAQAQIDLDDYV 300
                ************************************************************

BAA21815.1      VDGVIAALDGVEAATGEREVHGIGYCIGGTALSLAMGWLAARRQKQRVRTATLFTTLLDF 353
PHAcMOD         VDGVIAALDGVEAATGEREVHGIGYCIGGTALSLAMGWLAARRQKQRVRTATLFTTLLDF 360
                ************************************************************

BAA21815.1      SQPGELGIFIHEPIIAALEAQNEAKGIMDGRQLAVSFSLLRENSLYWNYYIDSYLKGQSP 413
PHAcMOD         SQPGELGIFIHEPIIAALEAQNEAKGIMDGRQLAVSFSLLRENSLYWNYYIDSYLKGQSP 420
                ************************************************************

BAA21815.1      VAFDLLHWNSDSTNVAGKTHNSLLRRLYLENQLVKGELKIRNTRIDLGKVKTPVLLVSAV 473
PHAcMOD         VAFDLLHWNSDSTNVAGKTHNSLLRRLYLENQLVKGELKIRNTRIDLGKVKTPVLLVSAV 480
                ************************************************************

BAA21815.1      DDHIALWQGTWQGMKLFGGEQRFLLAESGHIAGIINPPAANKYGFWHNGAEAESPESWLA 533
PHAcMOD         DDHIALWQGTWQGMKLFGGEQRFLLAESGHIAGIINPPAANKYGFWHNGAEAESPESWLA 540
                ************************************************************

BAA21815.1      GATHQGGSWWPEMMGFIQNRDEGSEPVPARVPEEGLAPAPGHYVKVRLNPVFACPTEEDA 593
PHAcMOD         GATHQGGSWWPEMMGFIQNRDEGSEPVPARVPEEGLAPAPGHYVKVRLNPVFACPTEEDA 600
                ************************************************************

BAA21815.1      A----------- 594
PHAcMOD         AIIHHPRELARL 612
                *
```

Figura 4-6. Alineamiento entre la proteína PHA sintasa (*A. caviae*) y la proteína $PHA_{AC}MOD$.

La enzima PHA sintasa de *A. caviae* es una enzima polimerasa tipo I de acuerdo a su conformación estructural, que tiene afinidad por monómeros de cadena corta, es decir que es capaz de polimerizar monómeros con cadenas que poseen entre 2 - 4 carbonos, sin embargo, de acuerdo con Fukui y Doi, esta enzima cuando está en contacto con monómeros provenientes de ácidos grasos tiene la capacidad de producir copolimeros de cadena corta y media (C4 - C7), por esta razón esta enzima es de gran interés en la industria para producción de biopolímeros (Fukui, 1997). En plantas GM se ha insertado el gen *phaCA.c* de *A. caviae*, dirigiendo la enzima hacia peroxisomas, con el fin de aprovechar los sustratos de ácidos grasos presentes en este compartimento subcelular y obtener copolímeros, como se ha reportado en caña de azúcar y A. thaliana (Arai, et al., 2002; Tilbrook, et al., 2014).

Se ha evidenciado que las modificaciones de las secuencias codificantes de los genes involucrados en la síntesis de PHAs para mejorar su expresión dentro del genoma vegetal pueden tener una influencia directa en la producción de biopolímeros. En 2011 se insertaron en el genoma de *N. tabacum* un gen *phaB* y un gen *phaC* de *C. necátor*, con optimización de uso codónico, y evidenciaron que la expresión del gen *phaB* optimizado

generaba un aumento de dos veces el contenido de PHB, mientras que el *phaC* optimizado no exhibe un aparente efecto sobre la producción de PHB en la planta GM, el gen *phaC* no tuvo un efecto sobre la producción de PHB porque su optimización no influyó en su eficiencia transcripcional, es decir que sus niveles de expresión fueron similares al gen *phaC* sin optimización, sin embargo es importante tener en cuenta que no se evaluó el efecto de posición en el genoma, factor que puede tener un efecto sobre la expresión (Matsumoto et al., 2011). El gen *phaC* de *C. necator* optimizado contiene un % GC de 45 %, CAI de 0.8 y Nc de 32 regulado por el promotor CAMV 35S y T-nos. El gen nativo tenía un % GC de 66.54 %, valor CAI de 0.54 y Nc 32, en este caso el Nc no se modificó, aunque el % GC aumentó. En el gen $PHAC_{AC}MOD$ las modificaciones del uso codónico aumentaron el Nc al doble que el gen original, a diferencia del *phaC* optimizado de *C. necator*, este parámetro podría influir en la eficiencia de la traducción y podría ser una de las razones por las cuales no se evidenciaron diferencias en la expresión con respecto al gen original, puesto que se conservó el sesgo codónico en los dos genes. Como se mencionó previamente en el Nc reportado para *N. tabacum* para favorecer la eficiencia de la traducción es de 58.31 (Anwar et al., 2021). Con respecto al % GC y CAI del gen $PHAC_{AC}MOD$ son similares a los del *phaC* optimizado de *C. necator*.

El gen $PHAC_{AC}MOD$ fue optimizado de acuerdo con los parámetros recomendados para la expresión de genes heterologos, los resultados de la optimización son similares a los reportados en otras experiencias, este gen contiene además un promotor duplicado CAMV 35S que genera una expresión fuerte de los genes que regula. La capacidad de obtener un patrón de expresion adecuado es clave para la eficiencia de la transformación genética de plantas, este punto puede ser controlado con un promotor que sea efectivo en el sistema de transformación. En el caso de *N. tabacum* promotores constitutivos han sido efectivos como el 35S de CAMV generando niveles altos de expresión de genes en diferentes tejidos de la planta (Matsumoto et al., 2011; Bohmert-Tatarev et al., 2011) y el doble promotor 35S de CAMV potencia la expresión de transgenes en plantas (Varchenko et al., 2021), es necesario evaluar el efecto de la optimización en la expresión y producción de PHAs en *N. tabacum* en futuros experimentos.

4.4. Cultivo de tejidos y transformación de *Nicotiana tabacum* con el casete de expresión codificante de PHA sintasa

4.4.1. Establecimiento del protocolo de regeneración

Se realizaron los ensayos en la variedad Samsun con el fin establecer un modelo para la transformación genética. Para desarrollar una línea GM a través de la transformación con *A. tumefaciens*, es necesario establecer previamente un sistema de regeneración de explantes en cultivo de tejidos *in vitro*, y un sistema de selección que permita caracterizar fenotípicamente los brotes potencialmente transgénicos (Krishna et al., 2013).

Para el establecimiento de protocolo de regeneración en la variedad Samsun se determinó la normalidad de los datos a través del test de Shapiro-Wilk, con valor *p* de 0.01488, este valor es menor de a 0.05 % con un intervalo de confianza de 95 %, por lo tanto, no hay normalidad. Teniendo en cuenta que los datos no se ajustan a la distribución normal se procedió a analizar los resultados con la prueba no paramétrica Kruskall-Wallis. El análisis estadístico se basó en la validación de las siguientes hipótesis para las dos variedades:

H0: no existen diferencias entre protocolos
HA: existen diferencias significativas entre protocolos
H0: P0= P1=P2=P3=P4
HA: P0≠P1≠P2≠P3≠P4
Valor α: 0.05

El análisis estadístico mostró que en la variedad Samsun existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre protocolos con respecto a las variables número de explantes con brotes ($p=0.01488$) y media de numero de brotes por explante ($p=0.02134$). De acuerdo con los resultados en el protocolo P1 todos los explantes evaluados desarrollaron regeneración de brotes (100 %), en el protocolo P2, 24 explantes regeneraron brotes (98.9 %), para P3, 26 explantes regeneraron (99 %), y en el protocolo P4 nueve explantes regeneraron (36 %) (Tabla 4-5). El promedio de brotes por explantes en la variedad Samsun fue de 11.34 con el protocolo P3, 9.6 con el protocolo P1, 8.6 con el protocolo P2 y 0.89 con el protocolo P4 (Figura 4-7).

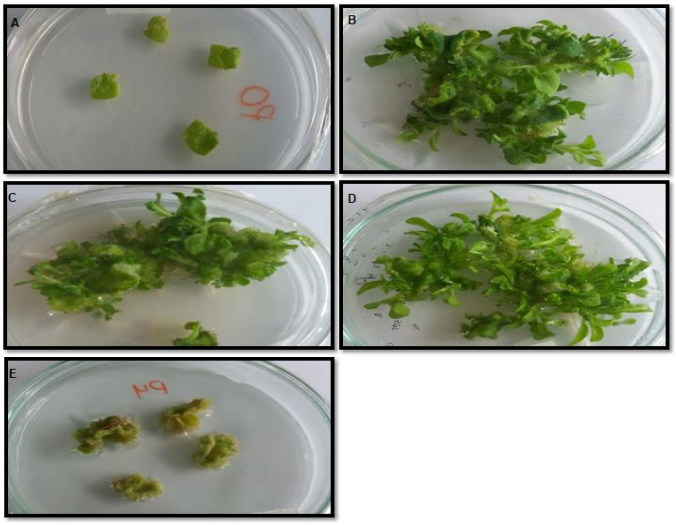


Figura 4-7. Protocolos de regeneración de *N. tabacum* variedad Samsun. A: Control P0. B: protocolo P1. C: protocolo P2. D: protocolo P3. E: protocolo P4.

Con el fin de determinar las diferencias significativas entre los protocolos se realizó el Test de Nemenyi, una prueba no paramétrica que permite realizar comparaciones entre tratamientos, y de esta forma definir cuál es el tratamiento adecuado para la variedad Samsun. De acuerdo con los datos obtenidos se evidenció que para el número de explantes con brotes el protocolo P1 con un valor p de 0.049 tiene diferencias significativas con respecto al control y los demás protocolos, en este protocolo el porcentaje de regeneración fue del 100 %.

En el análisis de datos de la variable promedio de explantes con brotes, se determinó que el protocolo P3 tiene un valor *p* de 0.029, lo cual demuestra que este tratamiento es significativamente diferente con respecto al protocolo control y a los demás protocolos y fue el protocolo en el que se obtuvo un promedio mayor de brotes por explante. Teniendo en cuenta que en la transformación genética la regeneración y el promedio de brotes por explante favorecen la eficiencia, se determinó que el protocolo P3 es adecuado para regeneración de explantes foliares de la variedad Samsun (Tabla 4-5) (Figura 4-8).

Tabla 4-5. Protocolos de regeneración de *N. tabacum* variedad Samsun.

Protocolo	Número total de explantes	Número de explantes con brotes	P-valor	Promedio de explantes con brotes	P-valor	Porcentaje de regeneración
P0	25	0	0.15	0	1	0
P1	25	25	0.049	9.6	0.151	100
P2	25	24	0.123	8.6	0.183	98.66
P3	25	25	0.151	11.34	0.029	93.33
P4	25	9	0.924	0.89	0.924	36

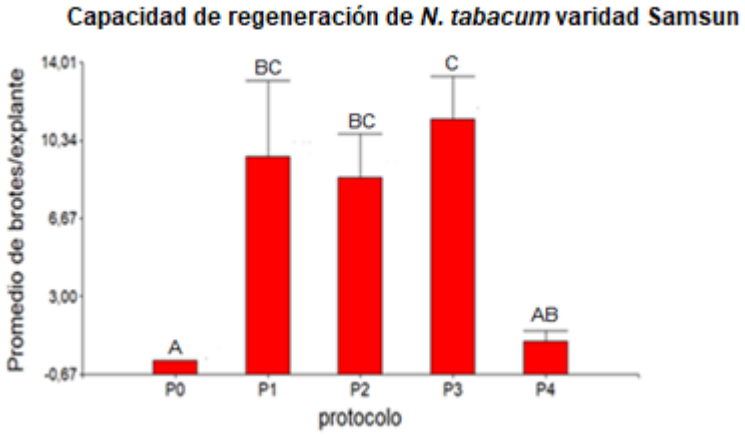


Figura 4-8. Regeneración de *N. tabacum* variedad Samsun. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$)

Con el fin de usar kanamicina como agente de selección, se evaluó la capacidad regenerativa de la variedad Samsun cuando está expuesta a este agente. En todas las concentraciones no se evidenció la presencia de brotes, como se observó en el control, por tal razón se tomó en cuenta como variable respuesta los explantes que después de cuatro semanas conservaban su pigmentación verde (Figura 4-9).

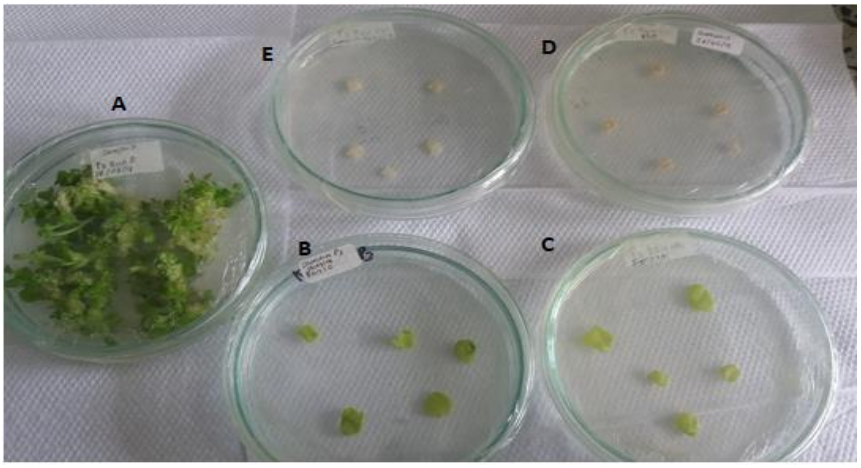


Figura 4-9. Respuesta fenotípica de *N. tabacum* variedad Samsun al agente de selección. A: Control. B: 50 mg/mL de kanamicina. C: 100 mg/mL de kanamicina. D: 150 mg/mL de kanamicina. E: 200 mg/mL

El análisis con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis determinó que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.0159$; $p<0.05$), el tratamiento de 200 mg/mL presenta diferencias significativas con respecto al control (0 mg/mL de kanamicina) y con respecto al tratamiento de 50 mg/mL, sin embargo, teniendo en cuenta la presión de selección sobre los explantes con esta concentración de 200 mg/mL presenta un numero promedio de explantes verdes de cinco, por lo que se consideró inadecuada para ser usada como concentración de selección en los explantes transformantes, y se eligió la concentración de 100 mg/mL como la concentración óptima para la selección con un promedio de explantes verdes de 20 (Figura 4-10).

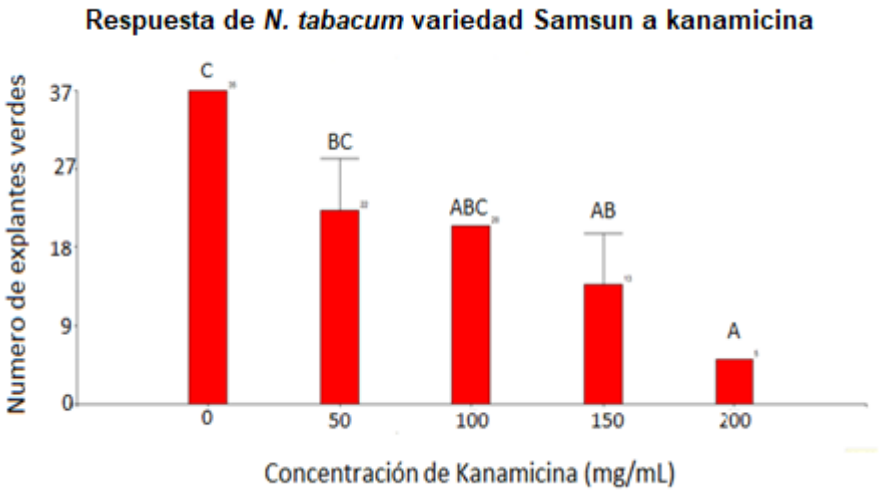


Figura 4-10. Respuesta de *N. tabacum* variedad Samsun al agente de selección. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$)

El promedio de brotes obtenido en este estudio fue mayor, en comparación con el protocolo reportado por Texeira en 2005, quien determinó un promedio de brotes de 0.93 a 1.35 en explantes de la variedad de tabaco Samsun sometidos a transformación con la cepa *A. tumefaciens* LBA4404. Este autor indica que la regeneración de explantes se ve afectada por el proceso de transformación debido al uso de un agente de selección y la infección medidada por *A. tumefaciens,* sin embargo, considera que el éxito requiere de la selección de plantas no quiméricas y su regeneración efectiva, por lo que considera que un promedio de brotes bajo después de la transformación asegura la alta eficiencia. Además, Texeira, 2005 reportó que una concentración de 100 mg/mL no permitió la regeneración de los explantes, por lo que indicó que la mejor concentración para obtener regenerantes y reducir los escapes es de 50 mg/mL (Teixeira da Silva, 2005). La concentración de 100 mg/mL de kanamicina para selección de transformantes fue igual a la reportada en el 2006 por Luo *et al*. quienes evaluaron el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina y el gen *Knotted1* de maíz como marcadores de selección de explantes de *N. tabacum* transformados. La sobreexpresión de *Knotted1* genera alteraciones fenotípicas en las hojas de las plantas, perdida de la dominancia apical y producción de meristemas ectópicos en hojas, la eficiencia de transformación fue tres veces mayor que con el gen *nptII* (Luo, et al., 2006).

4.4.2. Transformación de *Nicotiana tabacum* variedad Samsun con *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 fue transformada con el vector pCAMBIA2301, con el casete de expresión $PHAC_{A.c.}$ y con el casete de expresión $PHAC_{AC}MOD$. Después de tres días se evidenció crecimiento de colonias en medio de cultivo LB con 50 mg/mL de kanamicina y 50 mg/mL de rifampicina. De las células bacterianas que fueron transformadas, se evidenció crecimiento de 2.1 x 10^5 UFC, de las cuales al 10 % de UFC fueron analizadas por PCR evidenciándose un amplificado de 613 pb que corresponde al tamaño del amplificado para los casetes de expresión, y de 300 pb que corresponde al tamaño del amplificado del promotor 35S presente en el vector (Figura 4-11).

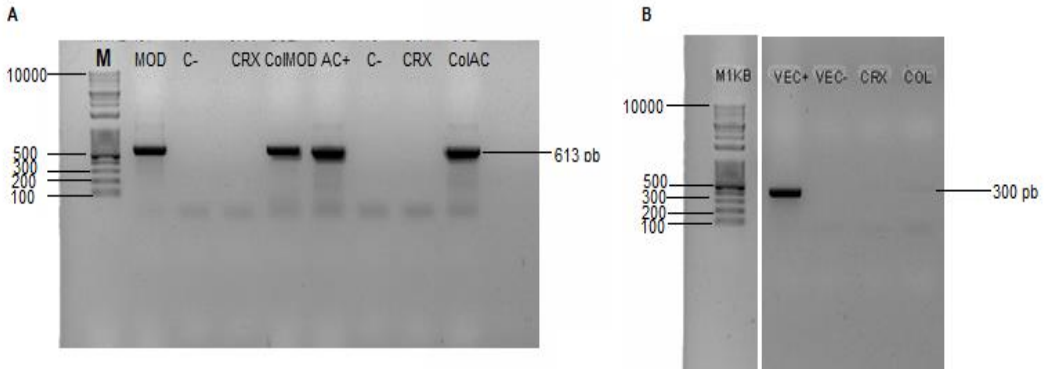


Figura 4-11. Electroforesis en agarosa 1 % con amplificación de contructos *PHACA.c* y $PHA_{AC}MOD$ y promotor 35S en colonia de *A. tumefaciens*. M: marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. MOD: $PHAC_{AC}MOD$. C-: colonia sin transformar. CRX: Amplificacion solo reactivos. ColMOD: Colonia transformada con el casete $PHAC_{AC}MOD$. AC+: casete $PHAC_{A.c.}$ ColAC: colonia transformada con el casete $PHAC_{A.c.}$

Después de siete semanas fueron obtenidas plántulas provenientes de explantes sometidos a transformación, regenerados en medio de selección y elongación para la variedad Samsun, los cuales fueron sometidos a transformación genética con el vector pCAMBIA2301 sin ningún casete de expresión, se usaron 64 explantes por repetición y se realizaron cuatro repeticiones en el tiempo. De estos explantes sembrados en medio de selección 320 brotes (5 brotes por explante) fueron obtenidos. Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (64 brotes), a partir de estos 64 brotes elongaron 50 plántulas.

Al igual que con el vector pCAMBIA2301, fueron sometidos a transformación 64 explantes por repetición con cuatro repeticiones en el tiempo para los casetes de expresión *PHAC*$_{A.c.}$ y *PHAC*$_{AC}$*MOD*. De los explantes sembrados en medio de selección que fueron sometidos a transformación con el transgén *PHAC*$_{A.c}$ se obtuvieron 72 brotes (tres brotes/explante). Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (48 brotes), 12 brotes lograron elongar. Los explantes foliares sometidos a transformación con el gen *PHAC*$_{AC}$*MOD* y se obtuvieron 28 brotes (un brote/explante), Solo un brote/explante fue transferido a medio de elongación (26 brotes), 12 brotes lograron elongar (Figura 4-12).

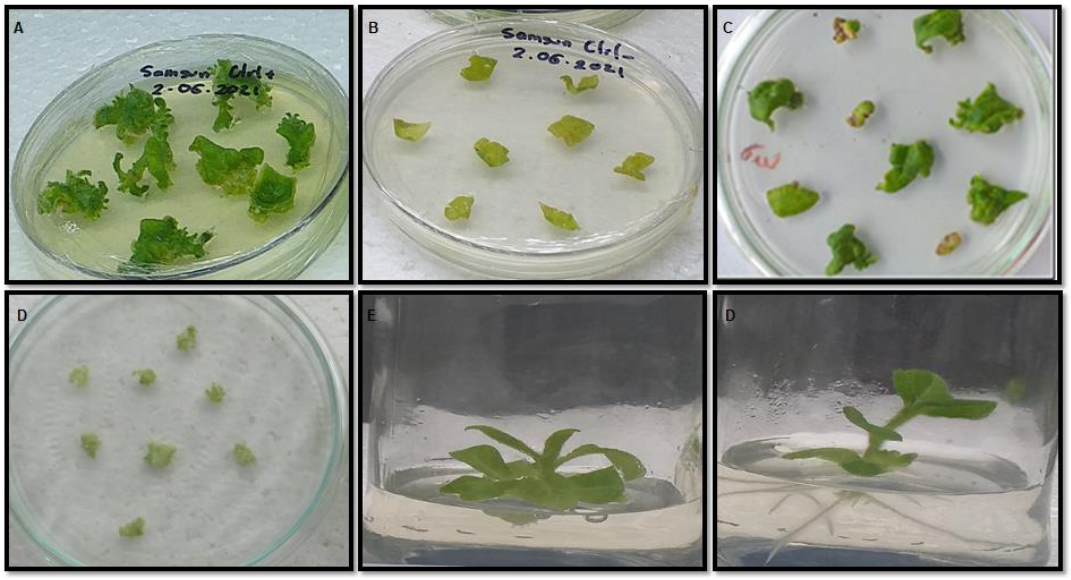


Figura 4-12. Explantes de *N. tabacum* variedad Samsun transformados con los casetes de expresión *PHAC*$_{A.c}$ y *PHAC*$_{AC}$*MOD*. A: control absoluto B: Control relativo (Explantes foliares en medio con 100 mg/mL de kanamicina). C: regeneración de brotes a partir de explantes foliares sometidos a transformación con *PHAC*$_{A.C}$ en medio de selección con 100mg/mL de kanamicina. D: regeneración de brotes a partir de explantes foliares sometidos a transformación con *PHAC*$_{AC}$*MOD* en medio de selección con 100mg/mL de kanamicina. E: brotes elongados provenientes de explantes transformados con el gen *PHAC*$_{A.C}$ en medio de elongación libre de hormonas de crecimiento vegetal y con 100 mg/mL de kanamicina. F: Brotes elongados provenientes de explantes transformados con el gen *PHAC*$_{AC}$*MOD* en medio de elongación libre de hormonas de crecimiento vegetal y con 100 mg/mL de kanamicina

Con el fin de determinar si existen diferencias en la regeneración de los explantes transformados con los dos casetes incluidos en el vector pCAMBIA2301, y los controles absoluto y relativo, se realizó un análisis estadístico teniendo en cuenta como variable respuesta porcentaje de elongación. Se determinó la normalidad de los datos a través del test de Shapiro-Wilk ($p<0.05$), por lo que se determinó que los datos no son homogéneos. Teniendo en cuenta esto se realizó un análisis de los datos con la prueba no paramética Kruskal Wallis que mostró que en la variedad Samsun existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre transformación con los casetes de expresión, el vector pCAMBIA2301 y los controles con respecto a la variable porcentaje de elongación. Para determinar las diferencias significativas entre los casetes de expresión se realizó el test de Dunn, una prueba no paramétrica que permite realizar comparaciones entre los casetes. De acuerdo con el análisis se evidenció que los explantes transformados con el casete de expresión $PHAC_{A.c}$ tienen diferencias significativas con respecto a los controles y los explantes transformados con el vector pCAMBIA2301, con un porcentaje de elongación de 9 %. Los explantes transformados con el casete $PHAC_{AC}MOD$ no presentan diferencias significativas con respecto a explantes transformados con el transgén $PHAC_{A.c}$ y el control relativo, con 5.5 % de explantes elongados, mientras que los explantes transformados con el vector pCAMBIA2301 tiene diferencias con respecto a los dos casetes de expresión, y su porcentaje de elongación fue de 15 % (Figura 4-13)

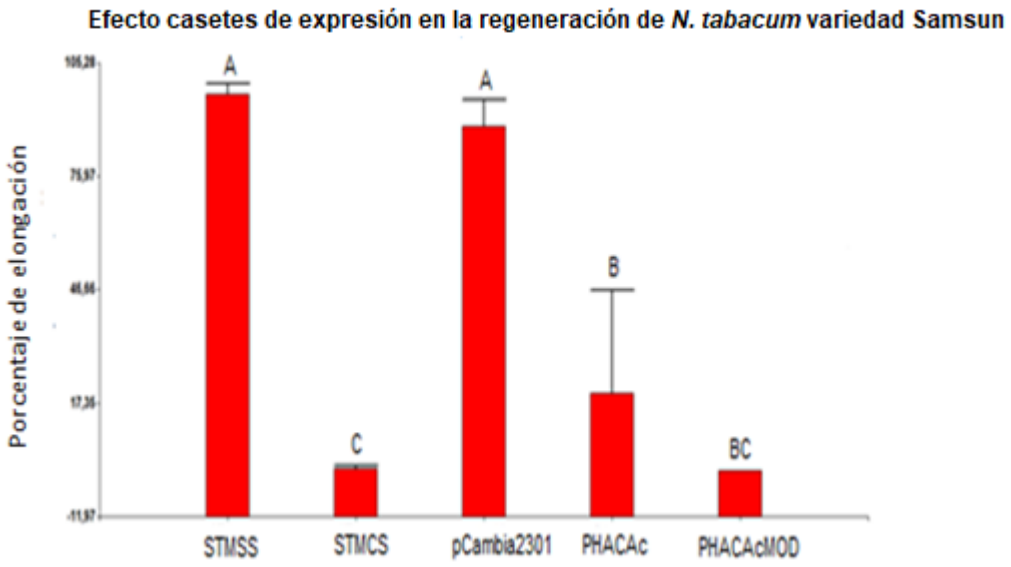


Figura 4-13. Efecto casetes de expresión sobre la regeneración de explantes en *N. tabacum* variedad Samsun.STMSS: plantas sin transformar en medio sin kanamicina. STMCS: plantas sin transformar con Kanamicina. pCambia2301: plantas transformadas con el vector vacío. PhaCAc: plantas transformadas con el casete $PHAC_{A.c.}$ PHACAcMOD: plantas transformadas con el casete $PHAC_{AC}MOD.$ Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Se realizaron ensayos de expresión del gen GUS en hojas de las plántulas obtenidas del proceso de transformación, cada ensayo se realizó por triplicado para las plantas transformadas con el vector pCAMBIA2301 y los casetes de expresión $PHAC_{A.c}$ y $PHAC_{AC}MOD$. De los explantes transformados con el vector pCAMBIA2301, 38 fueron GUS positivo; de las plántulas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión $PHAC_{A.c.}$13 fueron GUS positivo; de las plántulas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión $PHA_{AC}MOD,$ tres fueron positivos para GUS (Figura 4-14).

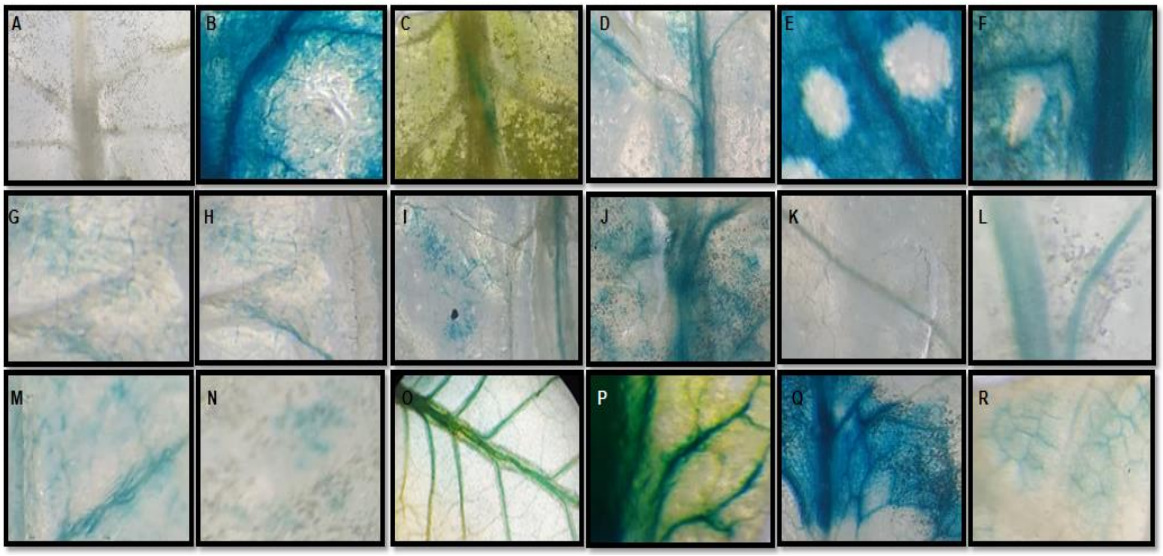


Figura 4-14. Expresión gen reportero GUS en hojas de plantas regeneradas de explantes variedad Samsun transformados con los casetes de expresión PHACA.c. y PHAACMOD. A: variedad Samsun sin transformar. B-N: plantas variedad Samsun transformadas con el casete de expresión $PHAC_{A.c}$ (SA8, SA20, SA21, SA24, SA27, SA28, SA37, SA39, SA41,

SA43, SA51, SA53, SA55). P-Q: plantas variedad Samsun transformadas con el casete *PHA$_{AC}$MOD* (SB1, SB3, SB5) R: planta variedad Samsun transformada con el vector pCAMBIA2301.

A las plántulas GUS positivo se les realizó amplificación por PCR de un fragmento de 300 pb para las transformadas con el vector pCAMBIA2301 vacio, y de 613 pb para las transformadas con cada casete de expresión. Para las plántulas transformadas con el vector pCAMBIA2301 vacio se obtuvieron 30 resultados de PCR positivo. Para las plantúlas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión *PHAC$_{A.c.}$,* 10 fueron PCR positivo (SA20, SA21, SA24, SA28, SA37, SA39, SA41, SA43, SA51, SA55) **(**Figura 4-15).

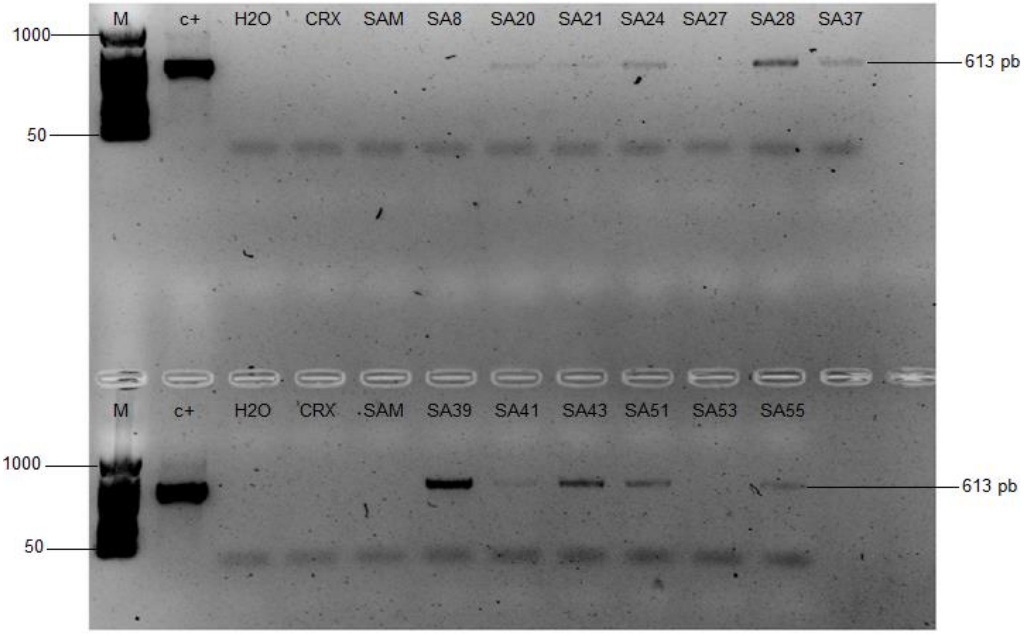


Figura 4-15**.** Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación de fragmento 613 pb correspondiente a *PHAC$_{A.c.}$* en plantas transformadas de la variedad Samsun. Marcador de peso 50 pb GeneRuler^{TM} DNA ladder Thermo Scientific. C+: vector pCAMBIA2301+ *PHAC$_{AC}$MOD.* CRX: control de reactivos. SAM: planta sin transformar. SA (20-55): plantas variedad Samsun transformadas con el casete *PHAC$_{A.c}$*

Para las plántulas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión *PHAC$_{AC}$MOD*, dos fueron PCR positivo (SB3 y SB5) (Figura 4-16).

Figura 4-16. Electroforesis en agarosa 1 % para amplificación de fragmento de 613 pb correspondiente a *PHAC$_{AC}$MOD* en plantas transformadas de la variedad Samsun. M: Marcador de peso GeneRuler^{TM} 1 kb Thermo Scientific. C+: vector pCAMBIA2301+ *PHAC$_{AC}$MOD.* CRX: control de reactivos. SAM: planta sin transformar. SB (1-5): plantas variedad Samsun transformadas con el casete *PHAC$_{AC}$MOD.*

Con el fin de comprobar que los amplificados provenían de la planta y no de contaminación con *A. tumefaciens* se realizó PCR para amplificar el gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* con ADN de las plantas (Figura 4-17).

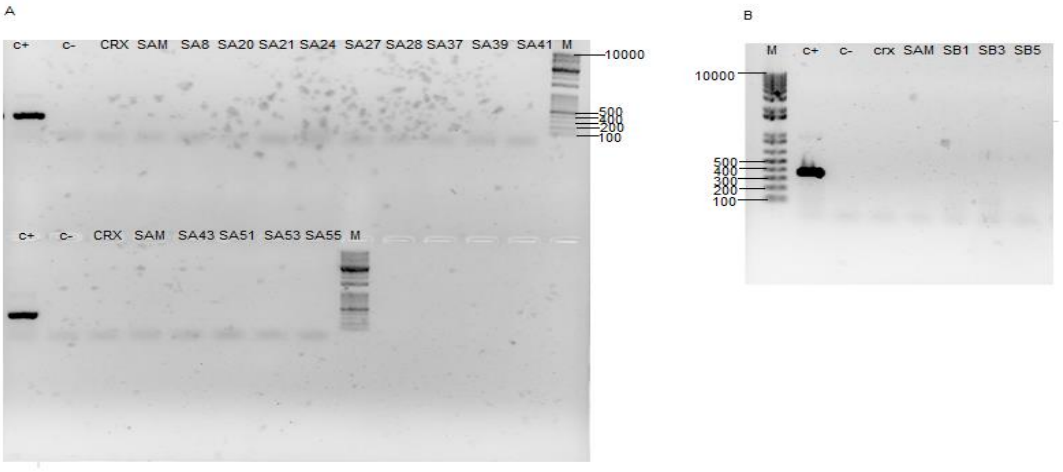


Figura 4-17. Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación de fragmento 369 pb correspondiente al gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* en plantas transformadas de la variedad Samsun. A. Plantas transformadas con el casete *PHAC$_{A.c.}$* B: Plantas transformadas con el casete *PHAC$_{AC}$MOD*. M: marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: Colonia *A. tumefaciens.* CRX: control de reactivos. SAM: planta sin transformar.

La frecuencia de transformación de la variedad Samsun con los transgenes se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$FT = \frac{No, de\ plantas\ PCR\ positivas}{No, de\ explantes\ transformados}\ X\ 100$$

La frecuencia de transformación de los explantes de Samsun con el transgén $PHAC_{A.c}$ fue de 3.9 %; con el transgén $PHAC_{AC}MOD$ la frecuencia de transformación fue de 0.78 % y con el vector pCAMBIA2301 fue de 11.78 %.

La infección mediada por *A. tumefaciens* es uno de los métodos más utilizado en la transformación genética de plantas, este método favorece la expresión estable de los genes insertados con menor número de copias (Basso et al,. 2020). La Frecuencia de transformación se puede reducir por el sistema de selección empleado, la capacidad de virulencia de la cepa de *A. tumefaciens* y el genotipo vegetal. La cepa *A. tumefaciens* LBA4404 usada en este estudio es una de las cepas más virulentas, y ha funcionado en la transformación de *N. tabacum*, Bahsh et al. confirmaron la eficiencia de *A. tumefaciens* LBA4404 en la transformación de *N. tabacum*, tras evaluar cinco cepas de la bacteria (LBA4404, GV2260, EHA105, C58C1 y AGL1) en explantes de *N. tabacum* (Bakshsh et al., 2014), demostrando que la mayor frecuencia de transformación se logró con la cepa *A. tumefaciens* LBA440 (20 %) seguido de EHA105, GV2260, C58C1 y AGL1. Se ha reportado alta Frecuencia de transformación de *N. benthamiana (*72.80 %), *N. tabacum* var. Samsun (84.57 %) y *N. tabacum* var. Xanti (93.33 %) (Japelaghi, 2018). De acuerdo con experiencias previas, la frecuencia de transformación obtenida en este estudio fue menor, uno de los factores que pudo afectar fue la presión de selección ejercida y los antibióticos adicionales, tales como timentina y cefotaxime, que pudieron afectar el desarrollo de los explantes en el medio de regeneración y elongación. La mayor pérdida de material vegetal se generó en la etapa de elongación, es posible que al ejercer una presión continua de selección a 100 mg/mL con los otros dos antibióticos impidió el desarrollo adecuado de muchos brotes, de acuerdo con Texeira, 2005 en la fase inicial de regeneración es necesario reducir la presión de selección y aumentarla en fases posteriores hasta 50 mg/mL (Teixeira da Silva, 2005).

El análisis de expresión por RT-qPCR, indicó que de las 10 plantas PCR positivas transformadas con el casete *PHAC*$_{A.c.}$, dos expresan el transgén (líneas SA21 y SA28). De las tres plantas transformadas con el casete *PHAC*$_{AC}$*MOD* con PCR positiva, dos expresan el transgén (eventos SB3 y SB5) (Figura 4-18). La expresión normalizada de los transgenes no presentó variaciones entre estas a excepción de la línea SA21 donde se observa menor expresión que en las demás con un 95 % de confianza estadística (p valor=0,075) (Figura 4-19).

A. **B.**

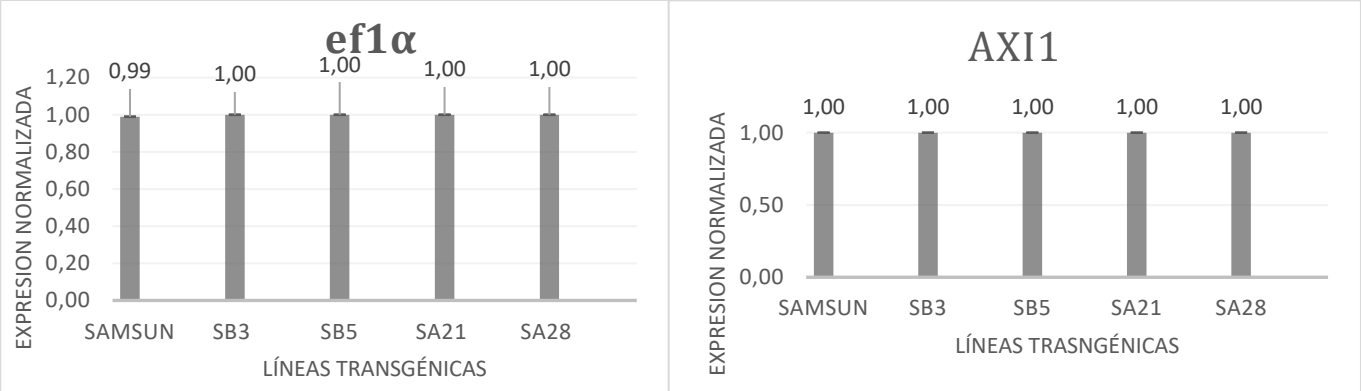
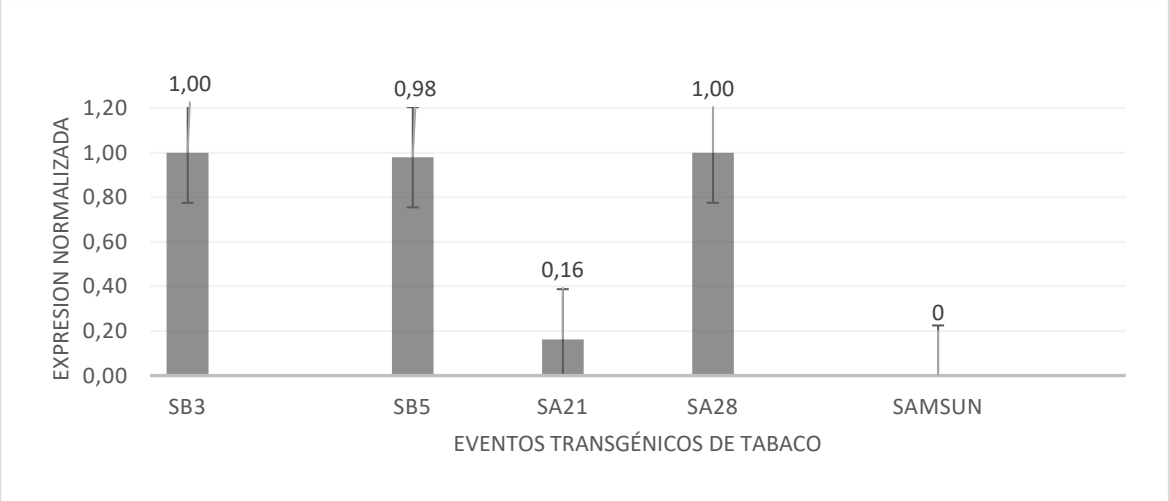


Figura 4-18. Expresión de los genes de referencia *ef1α* y *AXI1* en los eventos transgénicos de la variedad Samsun. A: Expresión gen de referencia *ef1α*. B: Expresión del gen de referencia *AXI1*.

A.



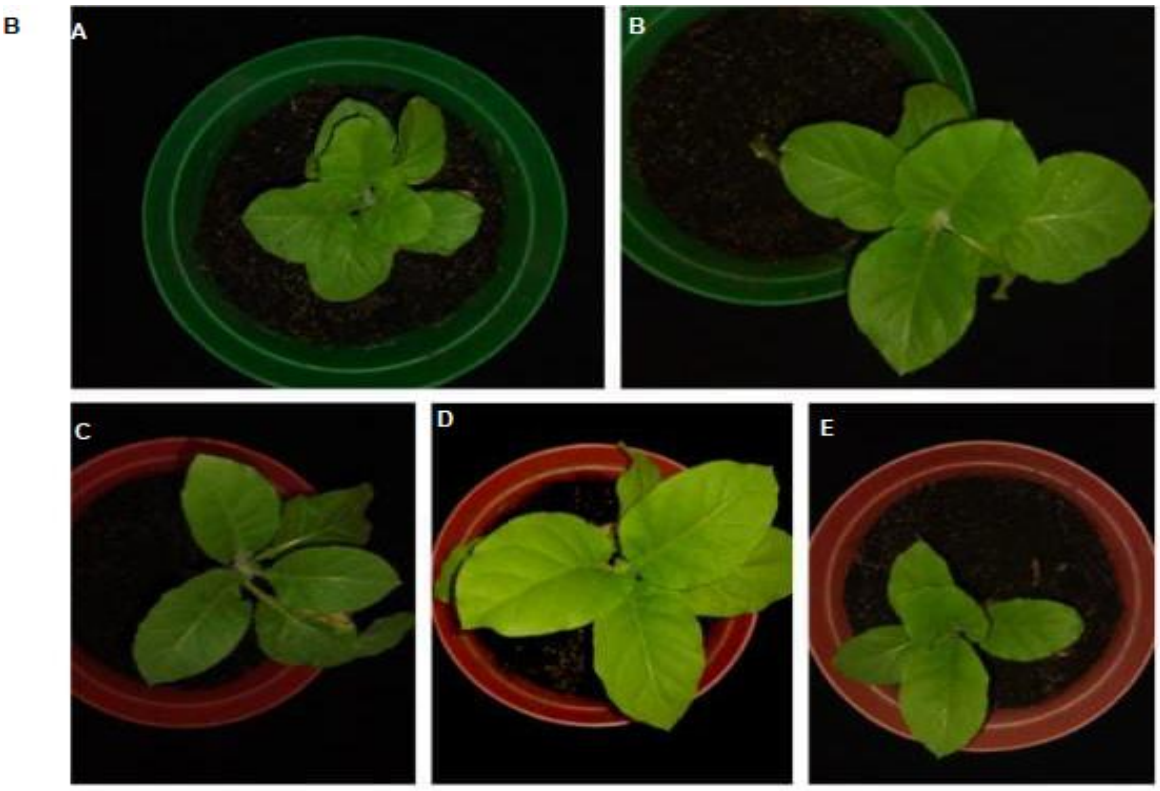


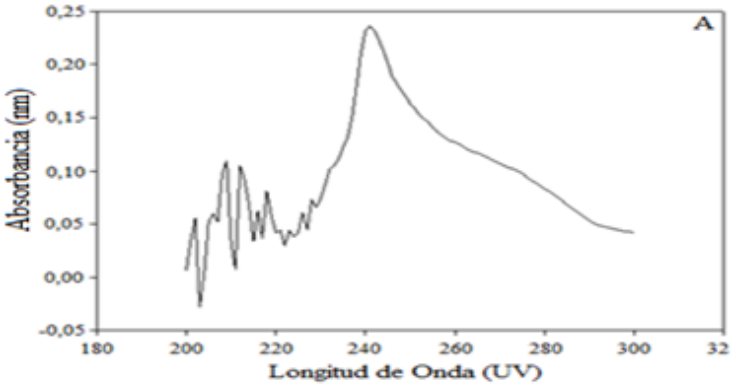
Figura 4-19. A.Expresión de las líneas GM de *N. tabacum* variedad Samsun que portan los constructos $PHAC_{AC}MOD$ y $PHAC_{A.c.}$.B-A. Plantas *N. tabacum* variedad Samsun sin transformar; B-B. SB3; B-C. SB5; B-D.SA21; B-E. SA28

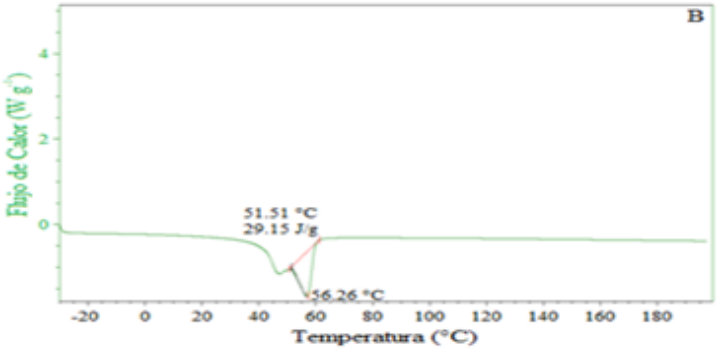
La expresión de un transgen en una planta GM depende de varios factores: diseño de la secuencia codificante, numero de copias, tipo y numero de promotores, sitios de unión de factores de transcripción, potenciadores, elementos cis silenciadores, regiones de fijación escalonadas (SAR) que se unen a la matriz nuclear del cromosoma, regiones 5’ y 3’ UTR, intrones, factores de transcripción, metilación o acetilación de ADN, entre otros (Bandopadhyay, 2010). En el caso de este trabajo, con los resultados obtenidos no se puede concluir cuales serían los factores asociados a la expresión. En un estudio similar en la que se realizó la comparación del gen *phaC* de *C. necátor* con el gen con ajuste codonico para *N. tabacum* var Samsun, se obtuvieron expresiones relativas en un rango de 0,38 a 33 del gen con ajuste codonico con respecto al gen sin modificación, los resultados sugirieron que la modificación del uso codonico no influenció la eficiencia transcripcional (149).

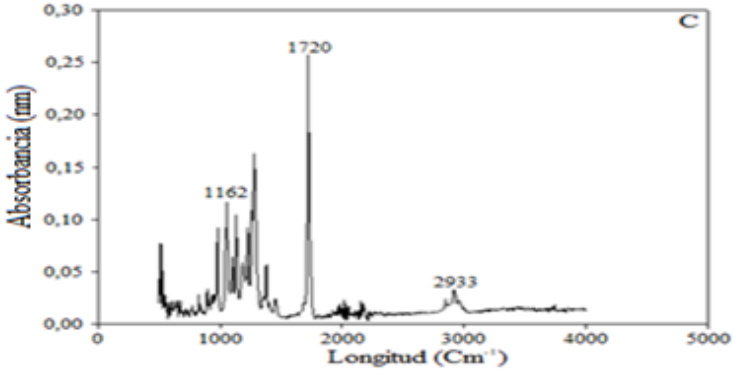
4.4.3. Caracterización polímero

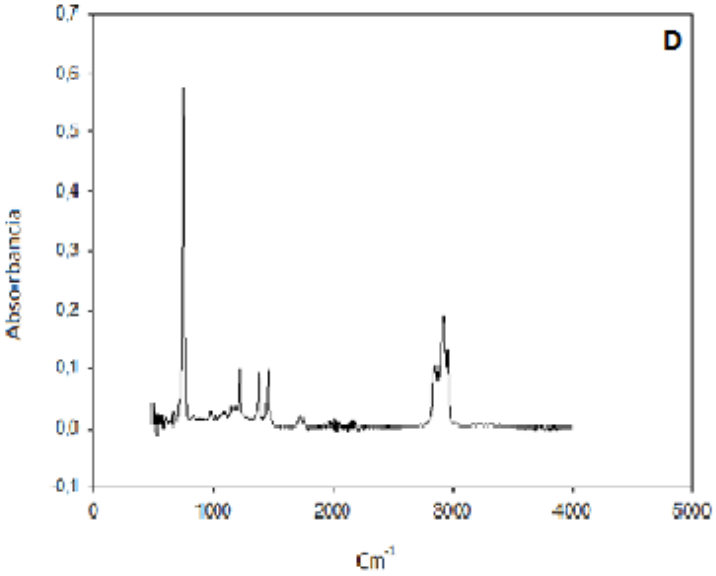
En el tejido vegetal de algunas plantas GM se identificó, a través de la espectrometría UV-VIS a una absorción máxima representada a través de un pico a longitud de onda (λmax) de 240 nm, lo cual sugiere que el polímero es un poli (R-hidroxibutirato) (Shah, 2014) producido por la planta en concentraciones aproximadas de 0.36 mg por peso seco (Figura 4-20).

Figura 4-20. Caracterización de PHA. A: espectrometría UV-VIS, rango entre 250-350 nm. B: Termograma de DSC homopolímeros. C: Espectro FT-IR, en rango espectral de 4000-400 cm^{-1} planta transgénica de tabaco transformada transgen PHAcMOD.D: Espectro FT-IR, en rango espectral de 4000-400 cm^{-1} en una planta sin transformar (Control).


A
Absorbancia (nm)
Longitud de Onda (UV)


B
Flujo de Calor (W g⁻¹)
51.51 °C
29.15 J/g
56.26 °C
Temperatura (°C)


C
Absorbancia (nm)
1720
1162
2933
Longitud (Cm⁻¹)


D
Absorbancia
Cm⁻¹

El polímero presenta una temperatura de fusión baja (tm: 51.51°C), una entalpia de fusión (ΔHm: 29.15 J/g) y una temperatura de transición vítrea (Tg) de 57.6°C, estas propiedades señalan que el polímero producido es muy elástico y poco cristalino, lo cual le confiere versatilidad para la fabricación de diversos elementos plásticos (Utsunomia, Ren, & Manfred, 2020; Keridou et al., 2019).

El espectro FTIR se caracterizó por presentar las absorciones descritas a continuación: a 2933 cm^{-1} fue evidente la presencia de tres picos de baja intensidad que son atribuidos a los grupos funcionales CH3, CH2 y CH; a 1720 cm^{-1}, se identificó un pico de alta intensidad característico de enlaces éster –C=O; a 1260 cm^{-1}, se observó un pico intenso que corresponde a tioéter (CH2-S); a 1162 cm^{-1} un pico de intensidad media indicativas de enlaces éter C-O. Los espectros FTIR del extracto puro obtenido de las plantas GM de *N. tabacum*, confirmaron la presencia de PHA que de acuerdo con el patrón de absorciones correspondería a unidades monoméricas de polihidroxibutirato (PHB) (Barbosa et al., 2005; Gumel , Annuar, & Chisti, 2012).

A partir de la caracterización del PHA por espectrometría UV se identificó un pico a 240 nm similar al reportado en 2014 por Shah, quien identificó la presencia de un pico entre 230- 240 nm correspondiente a un PHB, producido por una cepa bacteriana de *B. subtilis* G1S1 (Shah, 2014), y en este mismo año Kämpf et al. quienes lo identificaron en una cepa recombinante de *E. coli* (Kämpf et al., 2014). Esto sugiere que el PHA sintetizado por *N. tabacum* es un PHB y su concentración en el tejido vegetal fue de 0.36 mg de peso seco, menor que en la bacteria *B. subtilis* G1S, que fue de 1.4 g. La inserción de los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* de *C. necator* y *A. caviae* en el genoma de *G. herbaceum*, *B. rapa*, *Z. mays* y *N. tabacum* evidenció efectos deletéreos en las plantas que producían diferentes niveles de PHB (0.15-2.5 % de peso fresco), probablemente la biosíntesis de PHB en el citosol lleva a secuestro total de acetil-CoA afectando la biosíntesis de hormonas de crecimiento (Nawrath et al., 1994; Hahn et al., 1997; Nakashita et al., 1999). En otra experiencia, el uso de promotores inducibles para conducir la expresión en las etapas tardías del desarrollo de la planta permitió incrementar la síntesis de PHB hasta 14.3 % de peso seco (Kourtz et al., 2007). En el caso de la expresión de genes codificantes de las enzimas para síntesis de PHB en plastidios, aprovechando las altas concentraciones de acetil-CoA en este

compartimento subcelular producto de la biosíntesis de ácidos grasos, logrando hasta 14 % en peso fresco, aunque los individuos presentaban enanismo y clorosis en su tejido foliar (Nawrath et al., 1994). Para el caso de *A. thaliana*, *maiz*, alfalfa, remolacha y *N. tabacum*, dirigiendo la expresión de este tipo de genes hacia los cloroplastos, leucoplastos y amiloplastos se obtuvo concentración de PHBs y PHB-co-PHV entre 0.4-40 % de peso fresco, pero las plantas transformadas presentaban enanismo, clorosis o esterilidad (Mittendorf et al.,1998; Slater et al., 1999; Poirier Y, 2002; Lössl et al., 2003; Lössl et al., 2005). La expresión en plastidios, estabilizando la expresión con un operon *psbA*, conformado por los tres genes codificantes de las enzimas que participan en la biosíntesis del PHB, un gen de selección, con uso codónico y % GC similar al plastoma de tabaco, se logró mejoría significativa (18 % peso fresco) con respecto a los estudios previos y plantas de mayor biomasa de tejido foliar (Bohmert-Tatarev et al., 2011). Con la transformación y síntesis de PHAs en peroxisomas y glioxisomas de de *A. thaliana* a través de inserción del gen *phaC1* de *P. aeruginosa,* y dirigiendo la enzima hacia peroxisomas con un péptido de tránsito, se alcanzó niveles de producción de 0.4 % de peso fresco en peroxisomas, y no se observaron efectos adversos en el crecimiento (Mittendorf et al.,1998). Además, se ha descrito síntesis de PHB en maíz negro a partir de la inserción de los tres genes *phaA, phaB* y *phaC*, dirigiendo las enzimas hacia peroxisomas por medio de un péptido de tránsito, obteniendo niveles de producción de 2 % en peso fresco (Hahn J et al.,1999). También se ha descrito la producción de 0.2 mg de PHAs en hojas de tabaco que sintetizan estos polímeros en cloroplastos (Matsumoto et al., 2011), mientras que en peroxisomas se han reportado una acumulación de hasta 2.5 % (Anderson et al., 2011). En este estudio se puede notar que la concentración del polímero en *N. tabacum* es baja, además puede variar de acuerdo con la etapa de crecimiento de la planta, en este proyecto la caracterización se realizó en hojas jóvenes en dónde aún existe una actividad metabólica activa de síntesis de ácidos grasos, por lo cual la presencia de ácidos grasos libres para ser empleados como sustrato para la síntesis de PHA es menor (Saruul et al., 2002).

La temperatura de fusión del PHA de 51.51°C y entalpia de 29.15 J/g, estas propiedades, fueron similares a las obtenidos por Wang *et al.,* 2010 (Wang et al., 2010) quienes determinaron las propiedades térmicas de PHB, P4HB, PHV, PHH_X, PHH_P, producidas por cepas transformadas de *P. putida,* registrando una temperatura de fusión de 50.12° C y una entalpia de 29 J/g para el polímero P4HB y fueron similares a las reportadas en

Cupriavidus spp. en la síntesis de un copolimero P(3HB-co-4HB), en donde el 80 % era constituido por P4HB con una temperatura de fusión de 43°C pero con temperatura vítrea menor (27°C) por la combinación con el P3HB (Huong et al., 2017) (Tabla 4-6). Las características térmicas del P4HB señalan que este material es elástico y poco cristalino, es decir que es maleable y versátil para el desarrollo de diversos utensilios plásticos, además por su baja cristalinidad este biopolímero tiene mayor velocidad de hidrolisis que PHB y puede ser reabsorbido como acido 4- hidroxibutanoico por el cuerpo humano por lo cual es considerado biocompatible, por lo que tiene perspectivas como material para aplicaciones médicas (Williams et al., 2013).

Tabla 4-6. Características térmicas del P4HB.

Parámetro	Medida	Característica
Transición vítrea (Tg)	56.26° C	Baja cristalinidad
Temperatura de fusión (Tm)	51.51°C	Elasticidad
Entalpia (Hm)	29.15 J/g	Hidrolisis

En el espectro FTIR se identificaron absorciones a 2933 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} y 1162 cm^{-1} como se ha descrito en otros estudios, que describen las absorciones típicas de grupos funcionales como metilos CH3, enlaces éter C-O-C, enlaces éster C=O, que son característicos de la estructura lineal de un PHB $[-O-CH-CH_3-CH_2-(C=O)-]_n$, los picos registrados Los picos registrados en 1162, 1260 y 1720 cm^{-1}, corresponden a un estado amorfo que confirman la naturaleza del P4HB (Shah, 2014; Seoane et al., 2018).

4.4.4. Identificación de gránulos de polihidroxialcanoatos en peroxisomas de *Nicotiana tabacum* variedad Samsun

A través de microscopia de barrido de electrones se identificaron gránulos de PHAs en secciones de hojas de las líneas SA28 (transgén $PHAC_{A.c.}$) y SB3 (transgén $PHA_{AC}MOD$) de *N. tabacum* variedad Samsun que crecieron en medio de selección con kanamicina 100 mg/ml y que fueron positivas para el test de GUS, se aclimataron en invernadero y se llevaron a T1 por autofecundación. En material vegetal de estos individuos se identificaron estructuras esferoides bordeadas por una membrana y un tamaño que oscilaba entre 1-2 µm de diámetro, algunas contenían inclusiones amorfas o paracristalinas rodeadas por una

membrana delgada. En las hojas de la planta sin transformar no se evidenciaron estas inclusiones (Figura 4-21).

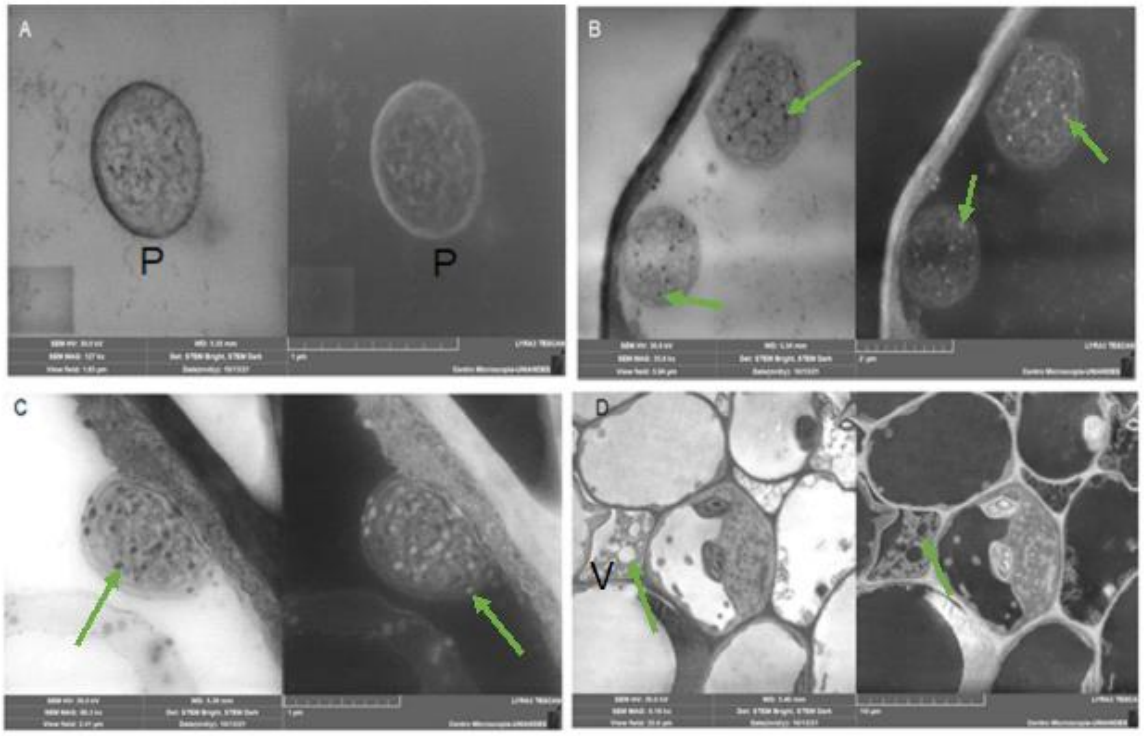


Figura 4-21. Microscopia electrónica de barrido de transmisión (STEM) para identificación de gránulos asociados con producción de PHAs. A: planta variedad Samsun sin transformar. B: Línea SA20. C: Línea SB1. D: Vacuola de la línea SB1. La letra P indica peroxisoma, la letra V indica vacuola. Las flechas verdes señalan los gránulos de PHAs

Las características esferoides y el diámetro de las estructuras identificadas señalan la morfología característica de los peroxisomas (Huang et al., 1983). Los gránulos observados son similares a los reportados en 2011 por Anderson et al. y Tilbrook et al. en caña de azúcar GM, quienes indican que estos gránulos son típicos de PHAs que contienen una membrana delgada y transparente, densa en electrones, con un diámetro de 0.1-0.2 µm, rodeada por fosfolípidos (Anderson et al., 2011; Tilbrook et al., 2011). Los gránulos fueron observados tanto en la vaina del haz cómo en el mesófilo, lo cual está de acuerdo con otros reportes, mientras que en 1990 Petrasovis et al. y en 2007 Purnell et al.

reportan la presencia de gránulos solo en la vaina del haz (Petrasovits et al., s/f ; Purnell et al., 2007).

4.5. Consideraciones de la transformación de *Nicotiana tabacum* con casetes de expresión codificantes de PHA sintasa basado en DPI

Dentro de los resultados de este trabajo se considera el aporte de un modelo de desarrollo de plantas GM para síntesis de PHAs basado en DPI, con las siguientes consideraciones:

- Análisis ELO para el diseño de un modelo basado en DPI para el desarrollo de plantas de tabaco GM variedad Samsun que expresen el gen codificante de PHA sintasa en peroxisomas, donde se contextualizan los elementos relevantes del proceso y las estrategías para obtener un producto de baja carga de DPI sin infringir derechos de terceros.
- Diseño de casetes de expresión, con y sin modificación de uso codónico adaptado a tabaco, que contienen el gen codificante de PHA sintasa de *A. caviae*, con adaptación de un péptido señal en las construcciones para su direccionamiento a peroxisomas.
- Estrategía de cultivo de tejidos y transformación con *A. tumefaciens* LBA4404, y posterior caracterización molecular, bioquímica y microscópica de las líneas obtenidas y del polímero resultante.

5. Perspectivas

5.1. Aplicación del modelo basado en Derechos de Propiedad Intelectual en desarrollo de tabaco genéticamente modificado para sintesis de polihidroxialcanoatos usando la variedad Virginia k326

5.1.1. Introducción

Se han generado variedades de *N. tabacum* clasificadas por la técnica de secado que se aplica según contenido de nicotina, N y azucares en hojas (Finagro, 2018). La variedad común que se conoce en el grupo Flue-cured se denomina Virginia, es la más cultivada en el mundo, su proceso de secado se produce en un recinto cerrado en el que se distribuye el calor generado por una estufa a través de chimeneas o tuberías, este curado dura aproximadamente una semana. La variedad Virginia fue obtenida en Virginia (USA), posee hojas con matices verdes mezclados con amarillo, su sabor es suave y un olor poco intenso, sus hojas tienen mayor contenido de azúcar y menor contenido de nicotina. Por fitomejoramiento, se han obtenido variedades Virginia resistentes a diferentes enfermedades por hongos y virus, y mejores rendimientos, algunas de ellas son: CC13, CC143, Virginia K326, K399, NC291, Speight 210, VA119 (Finagro, 2018; McMurtrey, 2017).

Las variedades curadas por aire son secadas en estructuras techadas pero con laterales abiertos de tal forma que se genere la circulación libre del aire, las hojas son colgadas en el techo y su secado dura dos meses. La variedad representativa en este grupo es Burley el cual se subdivide en ligero y negro. Esta variedad es la segunda más cultivada en el mundo; fue obtenida en Kentucky (USA), sus hojas cuando están en el proceso se curado

obtienen un color entre marrón suave a un tono oscuro o negro, su olor es fuerte parecido al chocolate oscuro, posee un alto contenido de nicotina y un bajo contenido de azúcar. Algunas variedades de Burley son: KY160, KY171, HB04PLC, TN90LC, KT215LC, NC7LC (Finagro, 2018; McMurtrey, 2017).

Las variedades curadas por fuego son exhibidas a fogones de leña para secar sus hojas, este tipo de curado se usa en mezclas de tabaco para pipa, rapé y tabaco para mascar. A este grupo pertenece el tabaco negro cubano, su sabor es fuerte, sus hojas poseen un alto contenido de nicotina y no contiene azúcares. Algunas variedades del tabaco negro son: Tom Rossom, DF 911, TN D950, KT D6LC (Finagro, 2018; McMurtrey, 2017).

El curado al sol de hojas de tabaco les proporciona a las variedades sometidas a este proceso robustez en su sabor, las variedades que hacen parte de este grupo son cultivadas en países desérticos, por las condiciones climáticas sus hojas son pequeñas y poseen poco contenido de nicotina y mayor contenido de azúcares, sin embargo, el contenido de azúcar es menor que la variedad Virginia. Los países en donde se siembra estas variedades orientales son Turquía, Grecia, Chipre y Macedonia. Las principales variedades de este grupo son: Izmir, Yenidje y samsoun (Finagro, 2018; McMurtrey, 2017).

Teniendo en cuenta las características particulares de las diferentes variedades de *N. tabacum*, se consideró relevante establecer la posibilidad de aplicar el modelo de generación de tabaco GM de este estudio basado en DPI a una variedad diferente a *N. tabacum* Samsun. Bajo esta premisa se procedió a la inserción de los casetes de expresión $PHAC_{A.c.}$ y $PHAC_{AC}MOD$ en la variedad Virginia k326, iniciando con ELO para determinar los DPI asociados a la variedad, protocolo de regeneración con pruebas de sensibilidad a antibióticos para la selección, y pruebas de confirmación de la inserción de los transgenes. Se concluye que todo el ELO desarrollado para la variedad de tabaco Samsun cubre a la variedad Virginia k326, con el diferencial de establecer si existía algún PBR vigente que la protegiera.

5.1.1. Metodología

Los materiales y métodos descritos en el caso desarrollado para la variedad Samsun se aplicaron de la misma forma para la variedad Virginia k326.

5.1.2.Resultados y discusión

La variedad Virginia k326 fue lanzada por Novartis Seeds, Inc, en 1982, esta se obtuvo a partir de las líneas cruzadas entre Coker 139 con Coker 319 y McNair 30 y NC 95. La variedad tiene una menor resistencia a la caña negra y Granville Marchito que a los nematodos del nudo de la raíz, es susceptible al mosaico. Esta variedad no cuenta con un PBR vigente (grant 8300070/25 de febrero de 1983), puesto que perdió su vigencia en el 2002, por lo que su uso es de dominio público, según lo determinado en la base de datos PLUTO (UPOV, 2022).

La variedad Virginia k326 es una variedad comercial adaptada a las condiciones climáticas y edáficas del Departamento del Huila, y no ha sido previamente micropropagada *in vitro* para transformación genética, era relevante evaluar protocolos aplicados a variedades de laboratorio como Samsun y Havana petit documentados en la literatura, con el propósito de establecer un medio de regeneración adecuado para transformar la variedad Virginia k326.

Una vez se estableció el modelo de transformación en la variedad Samsun se validó el procedimiento en la variedad cultivada en el Departamento del Huila Virginia k326. Se realizó el test Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos, obteniendo un valor *p* 0,02134 para la variedad Virginia k326. El valor *p* de los datos son menores a 0.05 % con un intervalo de confianza de 95 %, por lo tanto, no son normales. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre los protocolos con respecto a las variables número de explantes con brotes ($p= 0.03802$) y promedio de numero de brotes por explante ($p=0.01469$) ($p<0.05$) en la variedad k326.

Teniendo en cuenta que los datos no son normales se procedió a analizar los resultados con la prueba no paramétrica Kruskall-Wallis, con las hipótesis analizadas para la variedad Samsun. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre los protocolos con respecto a las variables número de explantes con brotes ($p=0.03802$) y promedio de numero de brotes por explante ($p=0.01469$) en la variedad Virginia k326. El

porcentaje de regeneración fue del 100 % con el protocolo P1, en el protocolo P2, fue de 96 % con una regeneración de brotes en 24 explantes, en el protocolo P3 fue de 72 %, con la regeneración de brotes en 18 explantes, mientras que en el protocolo P4, solo dos explantes regeneraron brotes (Tabla 5-1).

Tabla 5-1. Protocolos de regeneración de *N. tabacum* variedad Virginia k326

Protocolo	Número total de explantes	Número de explantes con brotes	P-valor	Promedio de explantes con brotes	P-valor	Porcentaje de regeneración
P0	25	0	0.11	0	1	0
P1	25	23	0.15	8.07	0.029	94.66
P2	25	24	0.18	4.53	0.413	96
P3	25	18	0.41	3.41	0.470	72
P4	25	2	0.038	0,27	1	13.33

El número promedio de brotes por explantes en la variedad Virginia K326 fue de 8.07 con el protocolo P1, 4.53 con el protocolo P2, 3.41 con el protocolo P3 y 0.27 con el protocolo P4 (Figura 5-1).

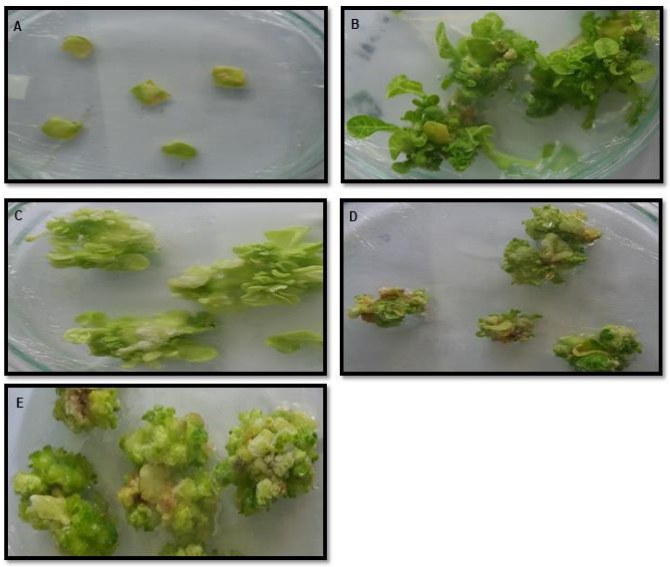


Figura 5-1. Protocolos de regeneración N. tabacum variedad Virginia k326.A: Control P0. B: protocolo P1. C: protocolo P2. D: protocolo P3. E: protocolo P4.

Con el fin de determinar las diferencias significativas entre los protocolos para la variedad Virginia k326 se realizó el Test de Nemenyi. De acuerdo a los datos obtenidos se evidenció que, para el número de explantes con brotes, el protocolo P4 es significativamente diferente con respecto al control y los demás protocolos, con dos explantes regenerados y un porcentaje de regeneración de 13.33 %, los tres protocolos restantes presentan diferencias significativas con respecto al control, pero no entre ellos (Tabla 5-2).

Tabla 5-2. Protocolo de regeneración de *N. tabacum* variedad Virginia k326

Protocolo	Número total de explantes	Numero de explantes con brotes	P-valor	Promedio de explantes con brotes	P-valor	Porcentaje de regeneración
P0	25	0	0.11	0	1	0
P1	25	23	0.15	8.07	0.029	94.66
P2	25	24	0.18	4.53	0.413	96
P3	25	18	0.41	3.41	0.470	72
P4	25	2	0.038	0.27	1	13.33

En la variable del promedio de explantes con brotes el análisis de los datos determinó que el protocolo P1 tiene un valor p=0.029, lo cual demuestra que este tratamiento es significativamente diferente con respecto al protocolo control y a los demás tratamientos con un promedio de explantes por brote de 8.07. Teniendo en cuenta estos resultados se escogió el protocolo P1 como el medio de regeneración óptimo para la variedad Virginia k326 (Figura 5-2**)**

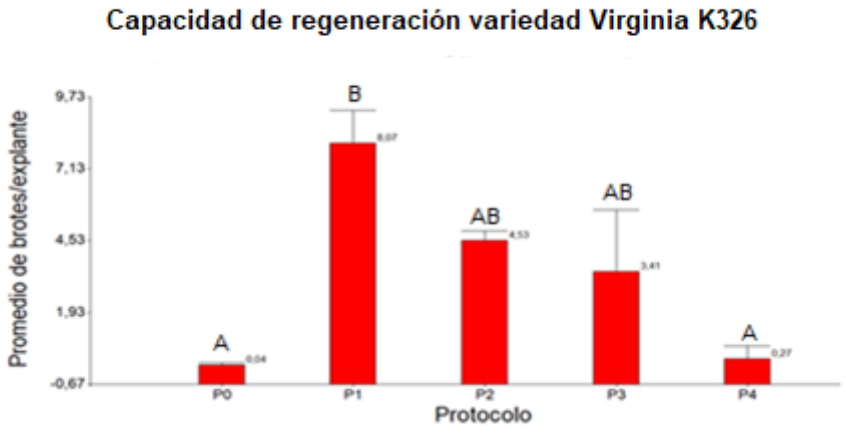


Figura 5-2. Capacidad de regeneración de *N. tabacum* variedad k326.Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$)

Al igual que en la variedad Samsun, en la variedad Virginia k326 no se evidenció la regeneración de brotes en todas las concentraciones evaluadas de kanamicina como sí se observó en el control, por tal razón se tomó en cuenta como variable respuesta, los explantes que después de 4 semanas conservaban su pigmentación verde (Figura 5-3**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

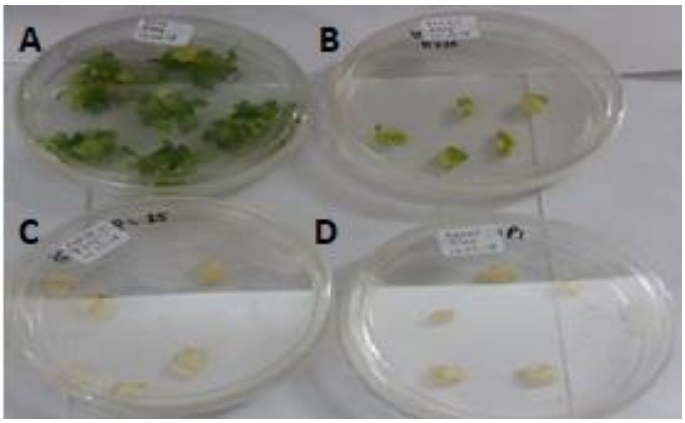


Figura 5-3. Respuesta de *N. tabacum* variedad Virginia K326 al agente de selección.

El análisis con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$), aunque el número de explantes verdes fue mayor en la concentración de 12, 5 mg/mL de kanamicina con un promedio de 18 explantes verdes (Figura 5-4). Según (Gubiš et al., 2007; Krishna et al., 2013; Ghaffar et al., 2016), las variedades de *N. tabacum* como Petit havana, M15, Bel B y turkish con concentraciones mayores a 50 mg/mL se tornan blancos por la clorosis, en el caso de Virginia K326 este efecto se evidenció en concentraciones mayores a 12,5 mg/mL (Figura 5-4), esto señala que la variedad tiene una alta sensibilidad al antibiótico y puede ser considerado para la selección de plántulas transformadas. Teniendo en cuenta que las concentraciones de kanamicina de 100 y 200 mg/mL pueden ejercer una presión de selección muy alta, se decidió escoger la concentración de 50 mg/mL como agente de selección para la variedad Virginia k326.

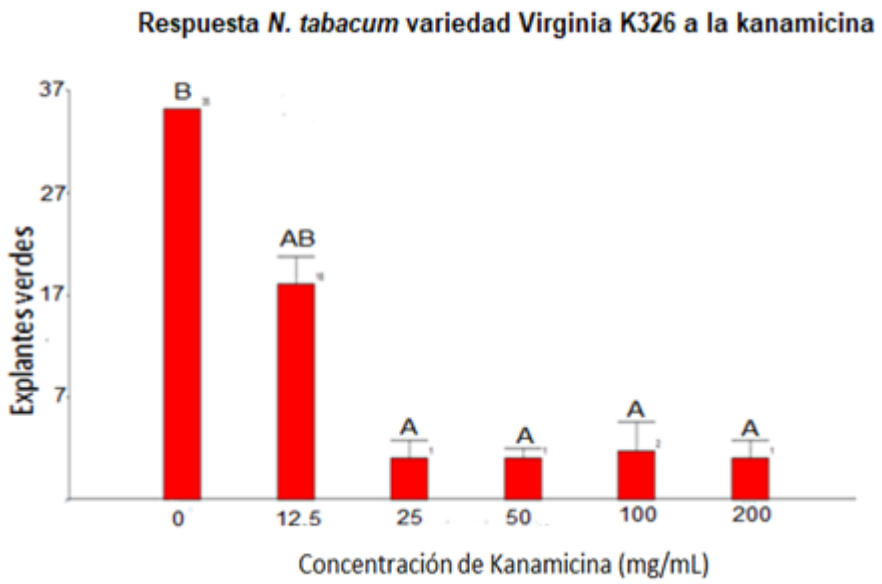


Figura 5-4. Respuesta de *N. tabacum* variedad Virginia K326 al agente de selección kanamicina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).

La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 fue transformada con el vector pCAMBIA2301, el vector pCAMBIA2301 con el casete de expresión $PHAC_{A.c}$ y con el casete de expresión $PHAC_{AC}MOD$. Después de tres días se evidenció crecimiento de colonias en medio de cultivo LB con 50 mg/mL de Kanamicina y 50 mg/mL de rimfampicina. Después de siete semanas fueron obtenidas plántulas provenientes de explantes sometidos a transformación, regenerados en medio de selección y elongación para la variedad Samsun. Fueron sometidos a transformación genética con el vector pCAMBIA2301 sin ningún casete de expresión, 64 explantes por repetición y se realizaron cuatro repeticiones en el tiempo, de estos explantes sembrados en medio de selección 320 brotes (6 brotes por explante) fueron obtenidos. Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (64 brotes), de estos 64 brotes elongaron 50 plántulas.

Para los casetes de expresión $PHAC_{A.c.}$ y $PHAC_{AC}MOD$ fueron sometidos a transformación 64 explantes por repetición con cuatro repeticiones en el tiempo. De los explantes sembrados en medio de selección que fueron sometidos a transformación con el transgen $PHAC_{A.c.}$ Se obtuvieron 53 brotes (2 brotes por explante). Solo un brote por explante fue

transferido a medio de elongación (40 brotes), 12 brotes lograron elongar. Los explantes foliares sometidos a transformación con el gen $PHAC_{AC}MOD$ se obtuvieron 28 brotes (1 brote por explante), Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (26 brotes), 12 brotes lograron elongar (Figura 5-5).

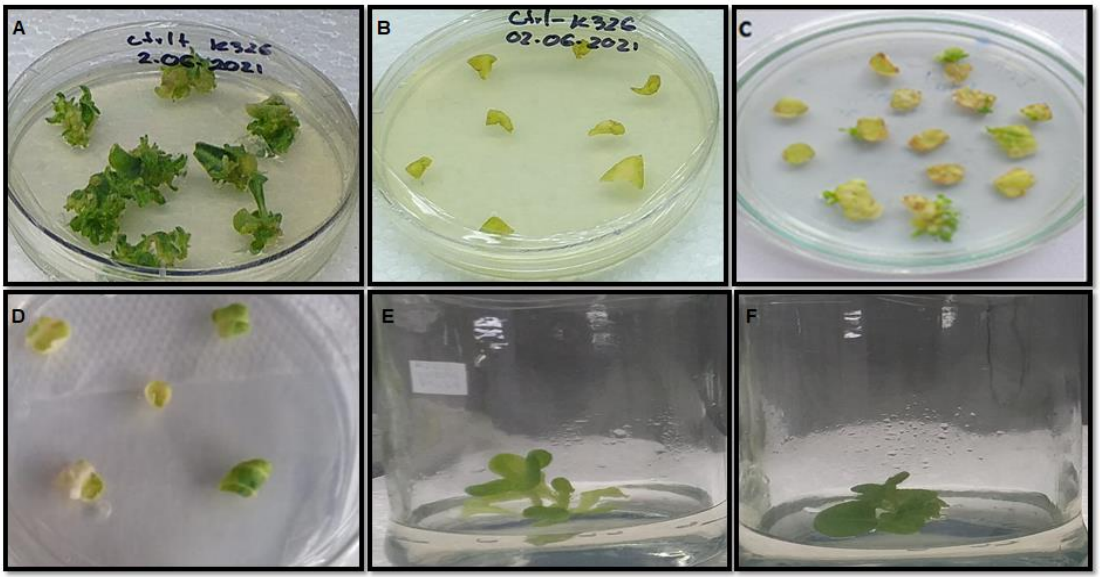


Figura 5-5. Explantes de *N. tabacum* variedad Virginia k326 transformados con los casetes de expresión $PHAC_{A.c}$ y $PHAC_{AC}MOD$.A: control absoluto B: Control relativo (Explantes foliares en medio con 50 mg/ml de kanamicina) C: regeneración de brotes a partir de explantes foliares sometidos a transformación con $PHAC_{A.C}$ en medio de selección con 100mg/ml de Kanamicina .D: regeneración de brotes a partir de explantes foliares sometidos a transformación con $PHAC_{AC}MOD$ en medio de selección con 100mg/ml de kanamicina. E: brotes elongados provenientes de explantes transformados con el gen $PHAC_{A.c}$ en medio de elongación libre de hormonas de crecimiento vegetal y con 100 mg/ml de kanamicina. F: Brotes elongados provenientes de explantes transformados con el gen $PHAC_{AC}MOD$ en medio de elongación libre de hormonas de crecimiento vegetal y con 50 mg/mL de kanamicina

Se determinaron las diferencias en la regeneración de los explantes transformados con los dos casetes, el vector pCAMBIA2301 sin casete de expresión, y el control absoluto y se realizó un análisis estadístico teniendo en cuenta como variable respuesta porcentaje de elongación. La normalidad de los datos a través del test de Shapiro-Wilk ($p<0.05$) indicó

que los datos no son homogéneos. Teniendo en cuenta esto se realizó un análisis de los datos con la prueba no paramética Kruskal Wallis que mostró que en la variedad Samsun si existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre la transformación con los casetes de expresión, el vector pCAMBIA2301 y los controles con respecto a la variable porcentaje de elongación. Para determinar las diferencias significativas entre los casetes de expresión se realizó el Test de Dunn que es una prueba no paramétrica la cual permite realizar comparaciones entre los casetes. De acuerdo al análisis se evidenció que los explantes transformados con el casete de expresión $PHAC_{A.c}$ no presentan diferencias significativas con respecto a los explantes transformados con el casete de expresión $PHAC_{AC}MOD$ y el vector pCAMBIA2301 (9.875 % en todos los casos) y el control relativo (4.875 %) (Figura 5-6).

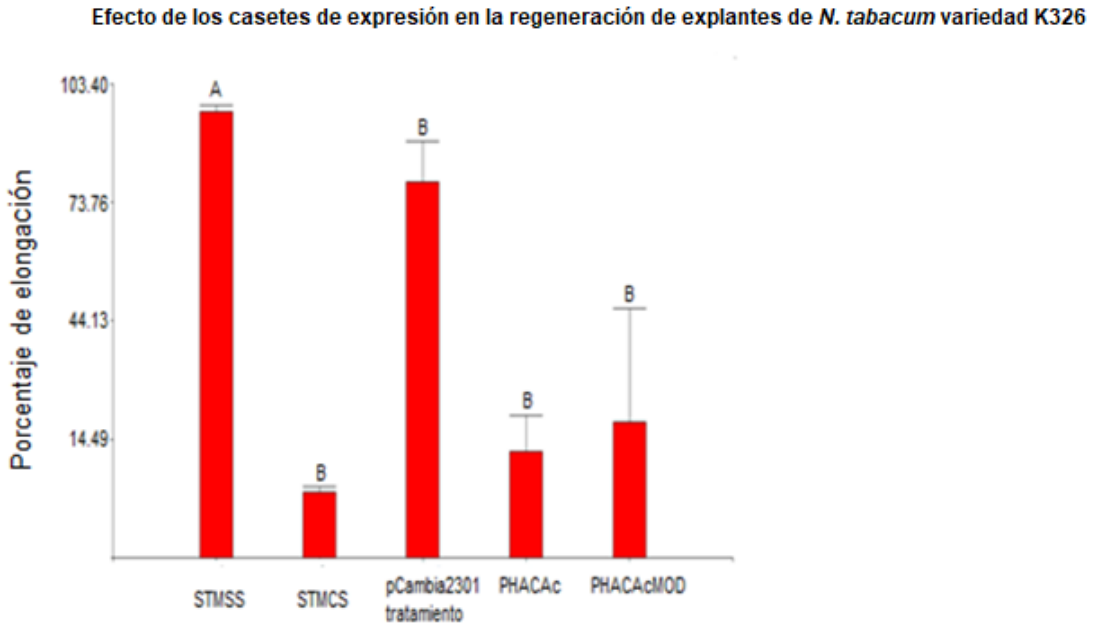


Figura 5-6. Efecto casetes de expresión sobre la regeneracion de explantes de *N. tabacum* variedad Virginia k326. STMSS: plantas sin transformar en medio sin kanamicina. STMCS: plantas sin transformar con Kanamicina. pCambia2301: plantas transformadas con el vector vacío. PhaCAc: plantas transformadas con el casete $PHAC_{A.c.}$ PHACAcMOD: plantas transformadas con el casete $PHAC_{AC}MOD.$ Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Se realizaron ensayos de expresión del gen GUS en hojas de las plántulas obtenidas del proceso de transformación, cada ensayo se realizó por triplicado para las plantas transformadas con el vector pCAMBIA2301 y los casetes de expresión $PHAC_{A.c.}$ y $PHAC_{AC}MOD$. De los explantes transformados con el vector pCAMBIA2301, 33 fueron GUS positivo; de las plántulas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión $PHAC_{A.c.}$, 14 fueron GUS positivo; de las plántulas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión $PHAC_{AC}MOD$, cuatro fueron GUS positivo (Figura 5-7).

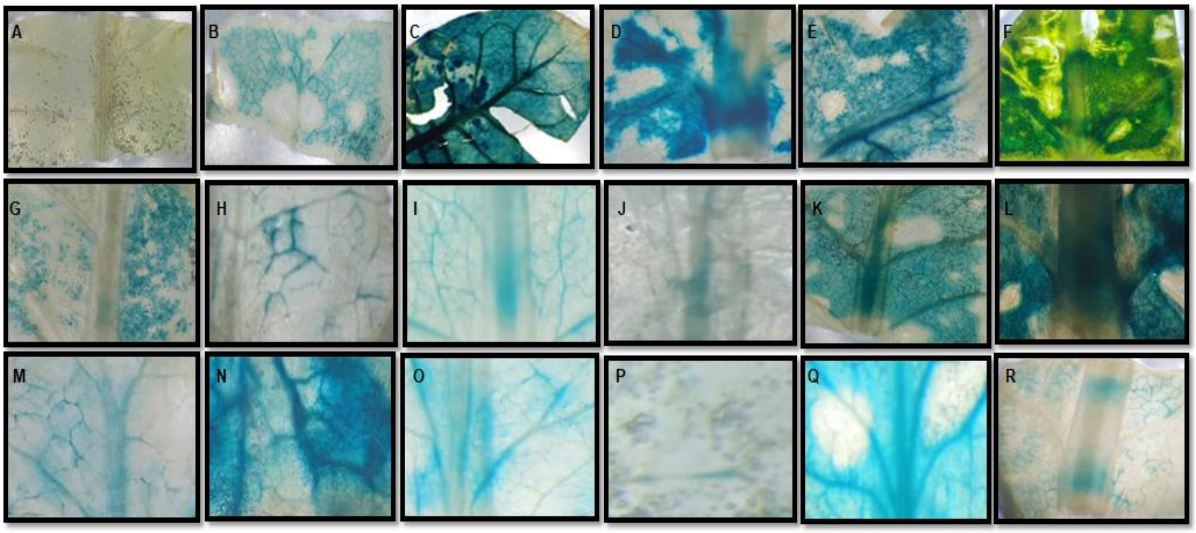


Figura 5-7. Expresión del gen reportero GUS en hojas de plantas regeneradas de explantes variedad Virginia k326 transformados con los casetes de expresión PHACA.c. y PHACACMOD.A: variedad Virginia k326 sin transformar. B-M: variedad Virginia k326 transformada con el casete de expresión $PHAC_{A.c.}$ (KA1, KA2, KA8, KA12, KA14, KA15, KA21, KA26, KA28, KA32, KA36, KA38). N-Q: variedad Virginia k326 transformada con el casete de expresión $PHAC_{AC}MOD$ (KB9, KB29, KB30, KB41). R: variedad Virginia k326 transformada con el vector pCAMBIA2301

Para las plántulas GUS positivo se les realizó PCR para obtener un fragmento de 300 pb en las transformadas con el vector pCAMBIA2301 y de 613 pb para las transformadas con cada casete de expresión. Para las plántulas transformadas con el vector pCAMBIA2301 se obtuvieron 24 PCR positivas, para las plantulas obtenidas después de la transformación

con el casete de expresión *PHAC*$_{Ac}$, 11 fueron PCR positivo (KA1, KA2, KA12, KA14, KA15, KA21, KA26, KA28, KA32, KA36, KA38) (Figura 5-8).

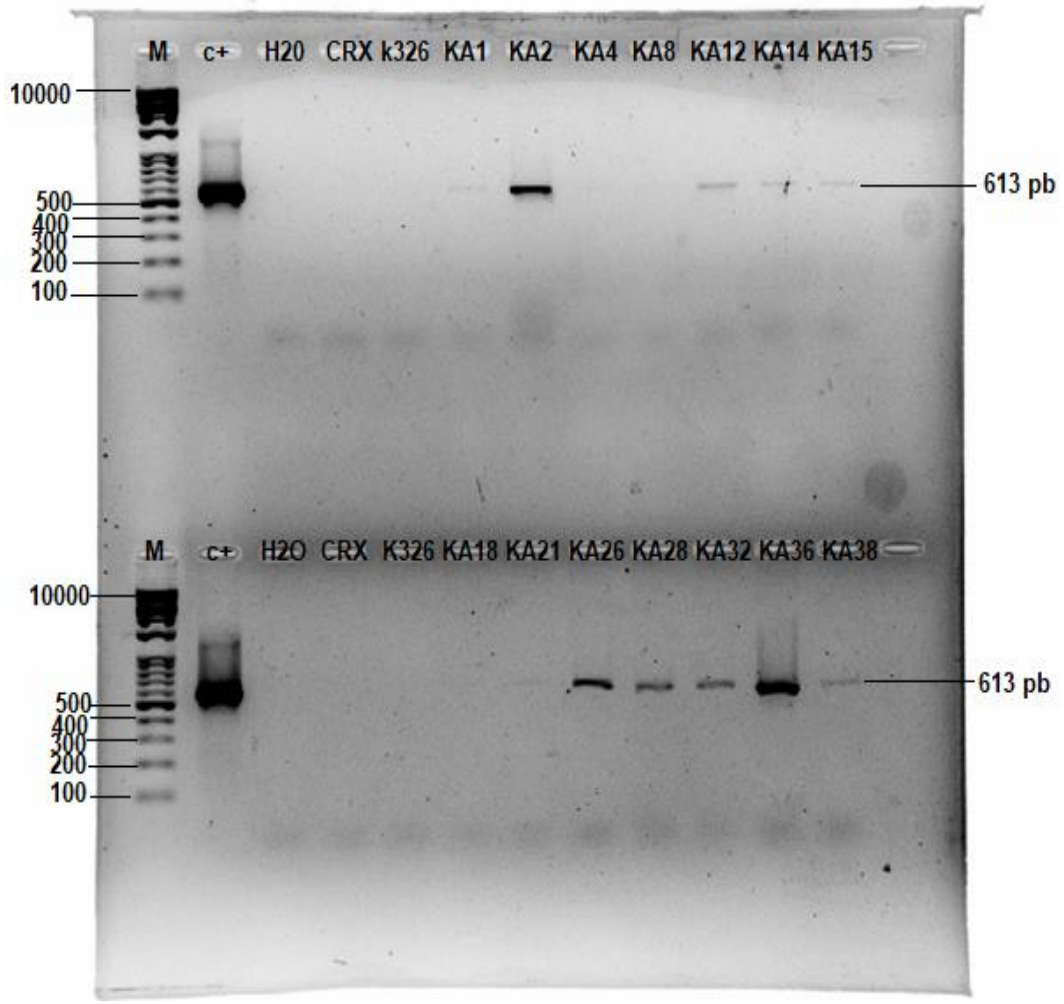


Figura 5-8. Electroforesis en 1 % de amplificación de fragmento 613 pb correspondiente a *PHAC*$_{A.c.}$ en plantas transformadas de la variedad Virginia k326.Marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: vector pCAMBIA2301+ *PHAC*$_{A.C.}$ CRX: control de reactivos. Virginia k326: planta sin transformar. KA (1-38): plantas variedad Virginia k326 transformadas con el casete *PHAC*$_{A.c.}$

Para las plantúlas obtenidas después de la transformación con el casete de expresión *PHAC*$_{AC}$*MOD*, 4 fueron PCR positivo (KB9, KB29, KB30, KB41) (Figura 5-9).

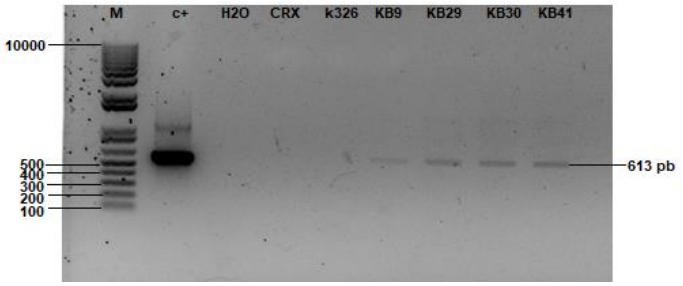


Figura 5-9 Electroforesis en 1 % de amplificación fragmento 613 pb correspondiente a PHACACMOD en plantas putativamente transformadas de la variedad Virginia k326.Marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: vector pCAMBIA2301+ *PHAC$_{AC}$MOD.* CRX: control de reactivos. Virginia k326: planta sin transformar. KB (9, 29, 30, 41): plantas variedad Virginia k326 transformadas con el casete *PHAC$_{AC}$MOD*

Se comprobó que los amplificados provenían de la planta y no de contaminación con *A. tumefaciens* mediante la amplificación por PCR del gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* desde el ADN de las plantas (Figura 5-10).

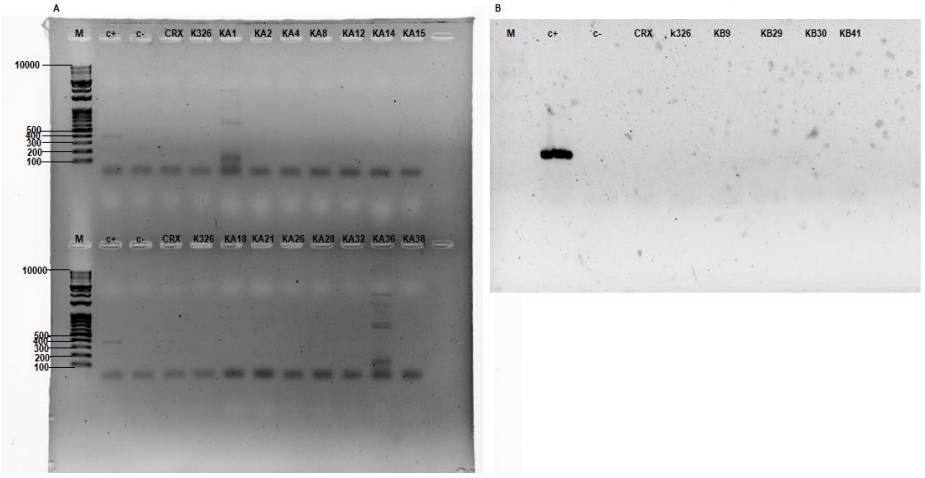
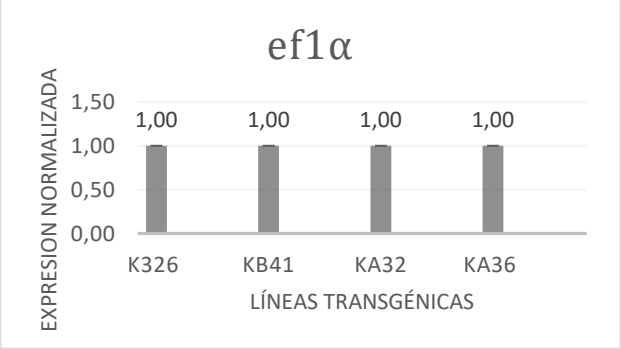


Figura 5-10. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) amplificación fragmento 369 pb correspondiente al gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* en plantas putativamente transformadas de la variedad samsun. A. Plantas transformadas con el casete *PHAC$_{A.C.}$* B: Plantas transformadas con el casete *PHAC$_{AC}$MOD*. M: marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: Colonia *A. tumefaciens.* CRX: control de reactivos. K326: planta sin transformar.

La frecuencia de transformación para la variedad Virginia k326 con el transgén *PHAC$_{A.c}$* fue de 4.29 %; con el transgén *PHAC$_{AC}$MOD* la frecuencia de transformación fue de 1.56 % y con el vector pCAMBIA2301 fue de 9.87 %. Aunque el porcentaje regeneración de la variedad Virginia k326 sin transformar en medio sin selección era mayor al 80 % (control absoluto), una vez realizada la transformación este porcentaje se redujo. Este porcentaje de regeneración fue menor al reportado por Gubis *et al* (2007), en las variedades de *N. tabacum* M15 (12.5 %) y Bel B (37.5 %) quienes usaron, el mismo medio de regeneración (Gubiš et al., 2007). La baja frecuencia de regeneración de la variedad Virginia k326 puede ser generada por la alta presión de selección de la kanamicina, que como se había evidenciado previamente, la variedad es sensible a este agente de selección. El efecto de la selección se evidenció en fuertemente en la etapa de elongación en donde se generó la mayor pérdida de material vegetal.

El análisis de la expresión por RT-qPCR, indicó que de las 11 plantas PCR positivas transformadas con el casete *PHAC$_{A.c}$*, dos expresan el transgén (KA32 Y KA36). De las cuatro plantas PCR positivas que fueron transformadas con el casete *PHAC$_{AC}$MOD*, una expresa el transgén (KB41). La expresión del gen normalizador de la RT-qPCR ***ef1α*** y *AXI1* no presentaron variaciones entre las líneas GM y el control (Figura 5-11). La expresión relativa de los transgenes presentó variaciones con respecto al control sin transformar y entre los casetes; las líneas KA32, KA36 y KB41 expresan los transgenes de forma similar (Figura 5-12). La expresión de los constructos es similar a lo observado para la variedad de tabaco Samsun.

A.



B.

Figura 5-11. Expresión de los genes de referencia *ef1α* y *AXI1* en las líneas transgénicas de la variedad Virginia K326. A: Expresión gen de referencia *ef1α*. B: Expresión gen de referencia *AXI1*.

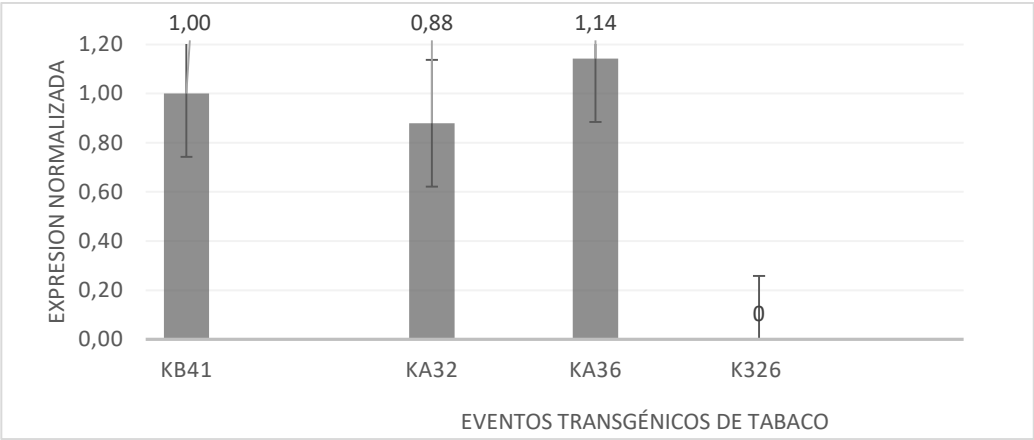


Figura 5-12. Expresión de los transgenes $PHAC_{AC}MOD$ y $PHAC_{A.c}$ en los eventos transgénicos de la variedad Virginia k326.

5.2 Aplicación del modelo basado en Derechos de Propiedad Intelectual en el desarrollo de tabaco transgénico para la producción de proteínas anticancerígenas de *Bacillus thuringiensis*

5.2.1 Introducción

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria cosmopolita que se ha aislado de suelo, insectos, productos almacenados, y filoplano entre otros. Su principal característica corresponde a su letalidad hacia insectos plaga de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera, que afectan cultivos comerciales. Su actividad biológica se atribuye principalmente a proteínas de entre 60 a 120 kDa denominadas Cry, de las cuales se han descrito más de 700 clases, agrupadas en más de 70 grupos (Soberon et al., 2018). Se ha sugerido que la actividad insecticida de la bacteria se debe a una coevolución con el insecto, pero en los proyectos de aislamiento de cepas de Bt alrededor del mundo se ha encontrado que son muchos más los aislamientos sin actividad evidente hacia insectos. En el año 1999 fue publicado un estudio realizado por científicos japoneses describiendo la evaluación de 1744 cepas de Bt, 1700 cepas japonesas y 44 cepas de referencia, sobre células leucémicas T, encontrando 42 que pertenecían a lo serotipos Bt *dakota*, Bt *neoleonensis*, Bt *shandongiensis*, Bt *coreanensis*, Bt 90-F-45-14 (relacionada a Bt *dakota*), Bt 84-HS-1-11 y Bt 89-T-26-17; las dos últimas presentaron la más alta actividad hacia células deleucemia T, sin afectar linfocitos T normales (Mizuki et al., 1999).

En años posteriores, se determinó que existían un tipo de proteínas causantes de la actividad citotóxica de las cepas de Bt anticancerígenas, que se denominaron parasporinas (PS). La primera PS se denominó como Cry31Aa1, según el actual modelo de clasificación de toxinas Cry de Bt, pero debido a importantes diferencias en homología de las PS con sus contrapartes Cry, se decidió realizar una clasificación paralela, donde se ha determinado hasta el momento seis clases de PS (PS1-PS6). Las PS1 a PS4 han sido más estudiadas. PS1Aa1 tiene una estructura de tres dominios, con menos de 25 % de homología con proteínas Cry. PS2Aa1 es homologa a toxinas mosquitocidas. PS3Aa1 contiene tres dominios. PS4Aa1 no posee bloques conservados o estructura de tres dominios. PS1Aa1 es probablemente un agente de inducción de apoptosis, Ps2Aa1 forma

poros líticos en células cancerosas, PS3Aa1 sería una toxina formadora de poros, y en el caso de PS4Aa1 se desconoce el receptor de membrana plasmática, pero su mecanismo de acción estaría relacionado a su estructura tipo β-aerolisina formadora de poros (Okumura et al., 2011). La proteína PS PS6Aa1, es una proteína formadora de poros con actividad anticancerígena contra células cancerígenas de hepatocitos humanos y células de cáncer de útero (Nagamatsu et al., 2010; Okassov et al., 2015). Se ha evaluado el efecto lítico de estas proteínas PS, a nivel *in vitro*, en diferentes tipos de cáncer como células T leucémicas, cáncer hepatocelular, cáncer de cuello uterino (como en el caso de PS1Aa1), adenocarcinoma de pulmón, cáncer colorectal y de riñón (Akiba & Okumura , 2017).

La producción de proteínas en plantas GM (molecular pharming) es una opción práctica, que cumple con estándares de bioseguridad, y barata si se compara con los fermentadores microbianos que necesitan alimentación constante de nutrientes costosos, equipos especializados, operarios calificados, y sistemas complejos de purificación del agente activo. Las plantas permiten producción de bajo costo porque no se requieren equipos y sistemas especializados, y la parte operativa del proceso es mucho más sencilla una vez se ha logrado obtener material vegetal transgénico susceptible de llevarse a campo para producción en masa. La primera proteína de interés médico, que se sintetizo en 1990 en tabaco y papa, fue la albúmina sérica humana, y a partir de allí se han logrado productos farmacéuticos (eritropoyetina, péptidos humanos, anticuerpos) desde plantas transgénicas en países como Cuba y Estados Unidos (Kittur et al., 2013 ; ChileBIO, 2020). El tabaco es una opción para la producción de medicamentos debido a que es un vegetal que produce mucha biomasa a partir de la cual se puede obtener la proteína de interés, se han realizado varios estudios de producción de proteínas terapéuticas en tabaco (Limkul et al., 2016). Por esto vale la pena evaluar la posible producción de proteínas PS en tabaco a través de la inserción de un gen semi-sintético codificante de una proteína PS6Aa1 bajo el modelo basado en DPI establecido en este trabajo, que consiste en ELO para establecer patentes asociadas a la tecnología, diseño de un casete de expresión que contienen el gen de interés (que puede ajustarse al uso codonico de la planta) protocolo de cultivo de tejidos bajo pruebas de sensibilidad a antibióticos para la selección, regeneración de explantes y pruebas de confirmación de la transformación.

5.2.2 Metodología

Los materiales y métodos descritos en el caso desarrollado para la variedad Samsun y Virginia k326 se aplicaron a la transformación con un casete de expresión conteniendo el gen *ps6Aa1*. El ELO se realizó mediante búsqueda en bases de datos de patentes de acceso público en forma similar al enfoque con la variedad de tabaco GM Samsun para síntesis de PHAs: The Lens (The Lens-Free and Open Patent and Scholarly search, 2021), Espacenet (Oficina Europea de Patentes, 2021) y Google Patent (Google Patent), además de patentes solicitadas a través del PCT.

5.2.3. Resultados y discusión

Se realizó una búsqueda en bases de datos de patentes de acceso público con el objetivo de identificar patentes que protegen las parasporinas de *B. thuringiensis*. Se utilizaron las bases de datos The Lens (The Lens-Free and Open Patent and Scholarly search, 2021), Espacenet (Oficina Europea de Patentes, 2021) y Google Patent (Google Patent). También se tomaron en consideración las patentes solicitadas a través del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT), dirigido por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) y se realizó una búsqueda en la base de datos de la superintendencia de Industria y Comercio en Colombia.

Para la búsqueda se usaron las siguientes palabras claves: “Protein anticancer Bacillus thuringiensis”, “Bacillus thuringiensis anticancer”, “Protein Cry Anticancer”, “Parasporin”. Los datos de solicitudes de patente recopilados consistieron en familias de solicitudes de patentes y solicitudes individuales sin familia de patentes. Se consideró su estatus legal, fecha de prioridad, cobertura geográfica y reivindicaciones. La búsqueda se realizó desde enero de 2021 hasta enero de 2022.

Las patentes seleccionadas fueron aquellas que protegían el uso de parasporinas en tratamientos anticancerígenos, teniendo en cuenta criterios como genes que codifican estas proteinas, cepas que las producen, recpetores implicados en el mecanismo de acción y métodos para la administración terapéutica de las parasporinas. Se identificaron 9 patentes que protegen parasporinas relacionadas con tratamientos anticancerígénos,

registradas en oficinas de patentes de Estados Unidos, China, Japón, Europa, Canadá y México (Tabla 5-3).

Tabla 5-3 Patentes relacionadas con PS con actividad anticancerigenas

Elemento	Publicación o numero de aplicación	Aplicación por PCT	Propietario	País	Fecha de aplicación	Fecha de expiración
PS	MX 2011000894 US 20140073582	WO 2012080985	Ct de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada	Mexico EU	17/12/2010	17/12/2030
PS-2	US 20140377216	WO2013098755	Adamed Sp Zoo	Canada US Polonia Israel China Mexico Filipinas Sudafrica Nueva Zelanda Ucrania Dinamarca Portugal Croacia Lituania Hungria Noruega	21/08/2013	20/08/2033
Cry62Aa1	CN 102517228	-	University Shihuan Agricultural	China	29/11/2011	29/11/2031
Bt subs thuringiensis	US 5824636	WO1996038477	Res Dev foundation	Canada Australia Sudáfrica China México Japón Rusia Alemania España	31/05/1995	30/05/2015
Receptor PS1Aa	US 20110038880	WO2009123145	Fufuoka prefectural Government	UE Japón EU	31/05/2008	31/05/2028
Receptor-PS-2	JP 2011068568	-	Univ Kyushu	Japón	24/09/2009	Retirada
PS-1	JP 2005263728	-	Nant Inst of Adv Ind y Tecnol, Mizushiro Hidekazu, Ichimatzu Tokio, Katayama Hideki, Akao Tetsuyuki, Nakamura Osamu, Oba Michio	Japón	19/03/2004	19/03/2024
Cepa *B. thuringiensis* ST7	CN 102517228	-	University Shihuan Agricultural	China	29/11/2011	28/11/2031

Cry31	CA 2410153	-	Agriculture Agroalimentaire CA	Canadá	05/12/2005	04/12/2025

La patente US20140073582 protege genes de la familia *cry* con actividad citotóxica contra células cancerígenas y no afectan las células normales. La patente solicitada por PCT WO2013098755 protege una proteína de fusión PS2 que se usa para tratamientos anticancerígenos. La patente CN102517228 cubre la secuencia de nucleótidos y la proteína Cry62Aa1 que tiene actividad anticancerígena y protege su uso en medicamentos. La patente solicitada por PCT WO1996038477 protege las proteínas derivadas de la cepa *Bt thuringiensis* que tienen un efecto citotóxico sobre células tumorales y su uso como componente farmacéutico. La patente WO2009123145 cubre un método para determinar la sensibilidad de células que sobreexpresan el receptor beclina-1 a la PS1. La unión de PS1 al receptor beclina-1 induce la apoptosis celular y su uso como componente farmacéutico para el tratamiento del cáncer. La patente JP2011068568 cubre el suministro del receptor Hep27 para la unión de PS2 como un componente candidato para medicamentes anticarígenos o para diagnóstico. La patente JP2005263728 protege un método para producir el cristal de la PS1 y proporciona su estructura tridimensional de la cadena lateral de aminoácidos por cristalografía de rayos X. La patente CN102517228 protege la cepa Bt ST7 que contiene el gen *cry62Aa1* que tienen una alta actividad toxica sobre células de cáncer de mama. La patente CA2410153 protege una nueva cepa de Bt que contiene una protoxina, toxina y secuencia de nucleótidos que codifica Cry31 con actividad anticancerígena.

El análisis de las patentes relacionadas con las PS con actividad anticancerígenas indica que, de las nueve patentes identificadas, dos patentes no están vigentes, tal es el caso de la solicitud JP2011068568 que fue retirada de la oficina de patentes porque no se realizó la solicitud de examinación y la patente WO1996038477 venció en el 2015 por lo tanto es de uso público. En otros casos, los componentes están aun protegidos sin embargo dos de ellas se encuentran próximas a vencer; la patente JP2005263728 tiene vigencia hasta 2024 y la patente CA2410153 tiene vigencia hasta 2025. Hasta la fecha no se registran solicitudes de patentes para la PS6Aa1. Teniendo en cuenta que las patentes son jurisdiccionales, estas patentes no han sido solicitadas en países de Latinoamérica a excepción de México que cuenta con una solicitud de patente vigente, por lo tanto, es

posible usar estos genes en el desarrollo de líneas GM genéricas que produzcan proteínas recombinantes como principios activos para terapias anticancerígenas con jurisdicción nacional.

El casete está regulado por el promotor 35S CAMV, la región codificante “CDS” del gen *ps6Aa1* para la toxina activa y un terminador T-nos, gen codificante de nopalin sintasa de *A. tumefaciens* y dos enzimas de restricción insertados en los extremos del casete con el fin de mejorar su manipulación, el tamaño del casete de expresión es de 2834 pb, el casete de expresion fue denominada *Ps6A* (Tabla 5-4).

Tabla 5-4 Componentes casete de expresion *Ps6A*

Nombre	**Promotor**	**Gen**	**Terminador**	**Tamaño de la secuencia codificante (pb)**	**Tamaño del constructo de expresión (pb)**
Ps6A	CAMV35S	CDS toxina activa	Nopalin sintasa *Agrobacterium tumefaciens*	2179 pb	2834 pb

La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 fue transformada con el vector pCAMBIA2300, y el vector pCAMBIA2300 con el casete de expresión *Ps6A*. Después de tres días se evidenció crecimiento de colonias en medio de cultivo LB con 50 mg/ml de kanamicina y 50 mg/ml de rimfampicina. De las células bacterianas que fueron transformadas, se evidenció crecimiento de $3.1x10^3$ UFC, de las cuales al 10 % de las UFC se las analizó por reacción de PCR con los primers diseñados en primer3 (PF 5´-GAACCGTAATTCCAGGAGGA-3' y PR 5'-GTTCAACGGTTCCAGCAAAT-3'), evidenciándose un amplificado de 900 pb que corresponde al tamaño del amplificado para el casete de expresión *Ps6A* (Figura 5-13)

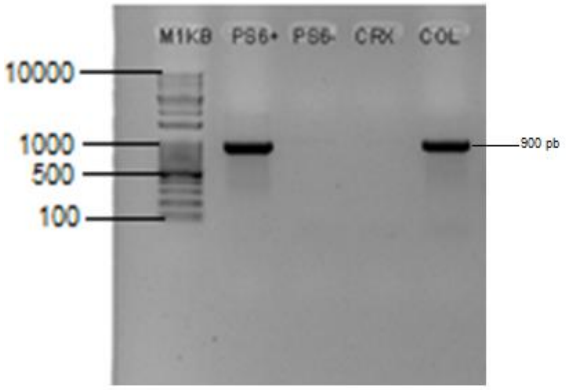


Figura 5-13. Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación fragmento 900 pb correspondiente al transgen *Ps6A* en colonia de *A. tumefaciens*. M: M: marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen.PS6+: pCAMBIA2300 + Ps6A. PS6-: colonia sin transformar, CRX: controles reactivos, COL: colonia de *A. tumefaciens* transformada con el casete de expresion

Fueron sometidos a transformación con el casete de expresión 30 explantes de la variedad Samsun y 30 explantes de la variedad Virginia k326 por repetición con cuatro repeticiones en el tiempo. De los explantes de la variedad Samsun sembrados en medio de selección que fueron sometidos a transformación con el transgén *Ps6A* se obtuvieron 150 brotes (5 brotes por explante). Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (30 brotes), 16 brotes lograron elongar (Figura 5-14).

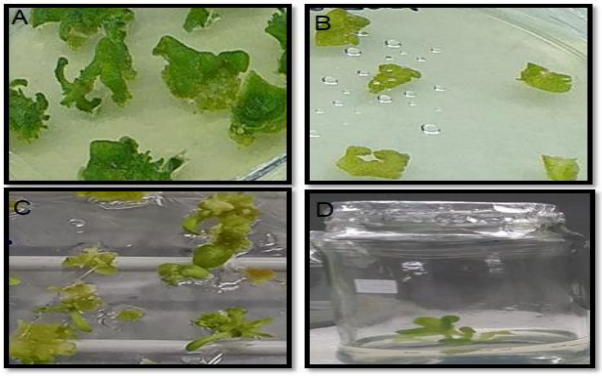


Figura 5-14 Proceso de transformación variedad Samsun con el casete de expresión *Ps6A*

Las plántulas de Samsun que regeneraron se las evaluó por PCR, en 15 plantas se evidenció la amplificación de un fragmento de 900 pb correspondiente a una región del transgén *Ps6A* (Figura 5-15).

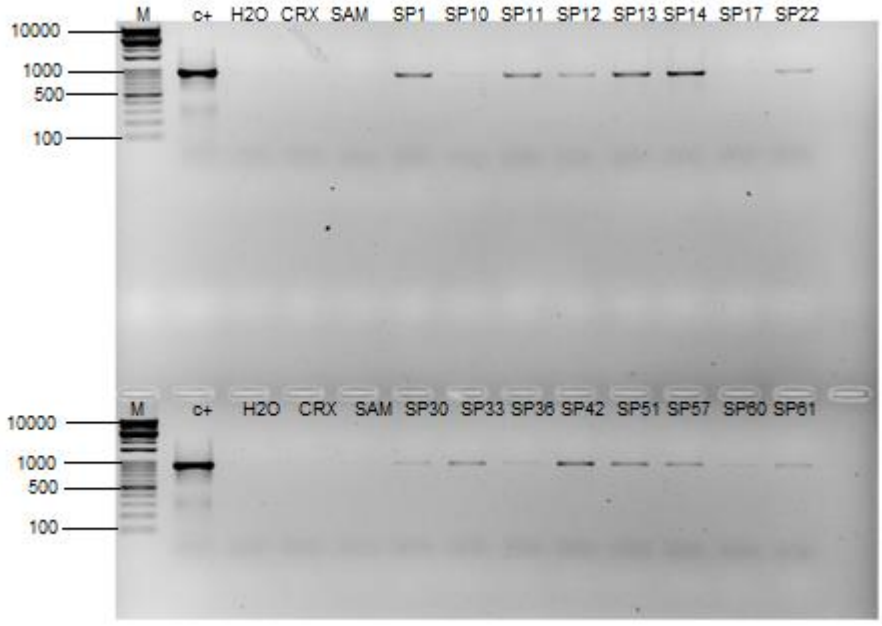


Figura 5-15. Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación fragmento 900 pb correspondiente a *Ps6A* en plantas transformadas de la variedad Samsun.Marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: vector pCAMBIA2301+ *Ps6A.* CRX: control de reactivos. SAM: planta sin transformar. SP (1-61): plantas variedad Samsun transformadas con el casete *Ps6A.*

De los explantes de la variedad Virginia k326 sembrados en medio de selección que fueron sometidos a transformación con el transgén *Ps6A* se obtuvieron 99 brotes (tres brotes/explante). Solo un brote por explante fue transferido a medio de elongación (30 brotes), 16 brotes lograron elongar (Figura 5-16).

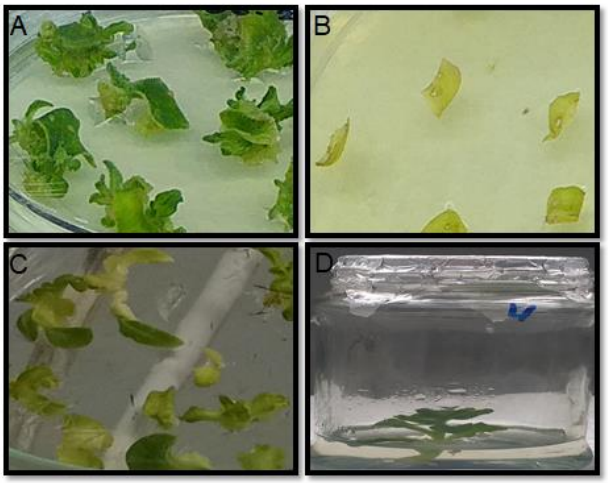


Figura 5-16. Proceso de transformación variedad K326 con el casete de expresión *Ps6A*.

Las plántulas de la variedad Virginia k326 que regeneraron se les realizó PCR, donde 13 presentaban un amplicón de 900 pb que corresponde a un fragmento del transgén *Ps6A* (Figura 5-17).

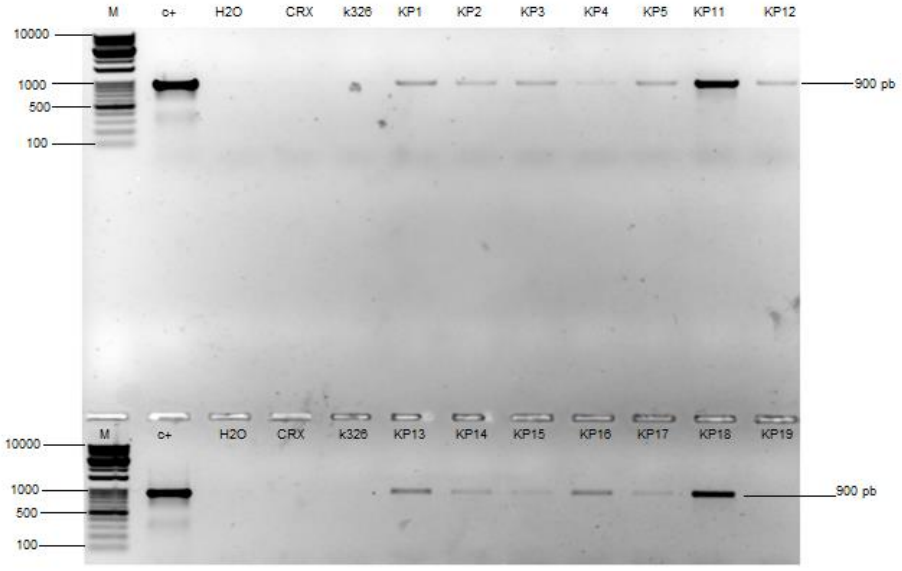


Figura 5-17**.** Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación fragmento 900 pb correspondiente a *Ps6A* en plantas transformadas de la variedad Virginia k326. M: Marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: vector pCAMBIA2301+ *Ps6A.* CRX: control de reactivos. Virginia k326: planta sin transformar. KP (1-19): plantas variedad Virginia k326 transformadas con el casete *Ps6A*

Con el fin de comprobar que los amplificados provenían de la planta y no de contaminación con *A. tumefaciens* se realizó PCR para amplificar el gen *Ach5FtsZ* de *la* bacteria desde el ADN de las plantas (Figura 5-18).

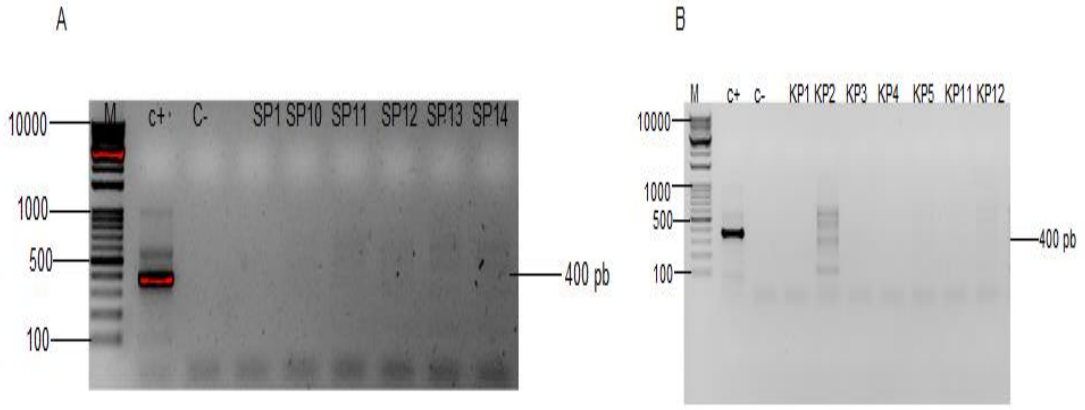


Figura 5-18. Electroforesis en agarosa 1 % de amplificación fragmento 369 pb correspondiente al gen *Ach5FtsZ* de *A. tumefaciens* en plantas transformadas de la variedad Samsun. A: Plantas variedad Samsun transformadas con el casete *Ps6A*. B: Plantas variedad k326 transformadas con el casete *Ps6A*. M: marcador de peso 1kb ladder plus Invitrogen. C+: Colonia *A. tumefaciens.* SP: plantas Samsun. KP: plantas k326.

Bt ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de sintetizar proteína con actividad insecticida (Cry), gracias a estos avances se han insertado los genes codificantes de las proteinas Cry en plantas con el fin de proveer cultivos resistentes a insectos. La primera planta transformada para generar resistencia a insectos con genes *cry* fue una planta de tabaco (Dong & Ronald, 2019), a partir de esta primera modificación en tabaco se desarrollaron cultivos modificados para la resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas que dieron cavida al planteamiento de biofabricas vegetales (Shanmugaraj et al., 2020).

El cáncer es una enfermedad cuya base es la alteración del material genético generando un fenotipo celular de proliferación anormal e invasión de tejidos externos y órganos por parte de un grupo celular que pueden causar la muerte. Existen 100 clases de cáncer que han generado millones de muertes (Rahib et al., 2021). El tratamiento en la mayoría de los casos se basa en la extirpación, la histerectomía, radio y quimioterapia en donde se expone

en muchas ocasiones a citotoxicidad de los fármacos no solo las células cancerosas, sino también a las células normales ocasionando importantes efectos colaterales y en donde cada posibilidad de remisión o curación depende de la extensión de la malignidad (Hanna et al., 2020).

Para evaluar nuevas opciones terapéuticas como las PS de Bt en células cancerígenas y posteriormente producirla como medicamento, es necesario garantizar la disponibilidad de grandes cantidades de la proteína, por lo tanto, se requiere un sistema biológico que permita la fabricación masiva de la proteína. En este sentido, la producción de proteínas en un sistema de biofábrica como las plantas GM (molecular pharming) es una opción práctica, que cumple con estándares de bioseguridad, y barata si se compara con los fermentadores microbianos que necesitan alimentación constante de nutrientes costosos, equipos especializados, operarios calificados, y sistemas complejos de purificación del agente activo. Las plantas permiten producción de bajo costo porque no se requieren equipos y sistemas especializados, y la parte operativa del proceso es mucho más sencilla una vez se ha logrado obtener material vegetal transgénico susceptible de llevarse a campo para producción en masa (Holásková et al., 2018). Este modelo de ingeniería genética favorece la produccion de proteinas recombinantes de interés industrial, aumentando su disponiblidad para estudios futuros y disponiblidad de materia prima para nuevos desarrollos (Goldstein & Thomas, 2004).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

- El ELO para determinar los DPI sobre la tecnología de producción de PHAs en *N. tabacum* variedad Samsun permitió determinar la presencia de patentes en países desarrollados, y algunos en vías de desarrollo. Se identificaron 16 patentes relacionadas con los elementos relevantes para el desarrollo de una línea GM de tabaco productora de PHAs: secuencia promotora, codificante y terminadora, vector de transformación, cepa de *A. tumefaciens* para transformación, y péptido de transito, de las cuales 11 se encuentran vigentes, cinco protegen la cepa de transformación, tres protegen el gen phaC de *A.caviae*, dos protegen el péptido de transito y una protege el vector CAMBIA. Este análisis permitió determinar los elementos relevantes en terminos de DPI, y usar alternativas como vectores pCAMBIA, cepas estandar de *A. tumefaciens*, protocolos de amplio uso descritos en la literatura, o casetes sinteticos para uso comercial entre otros.

- Se aplicaron protocolos de cultivo de tejidos y de transformación que permitió obtener regenerantes que fueron seleccionados usando kanamicina a 100 y a 50 mg/ml tras la transformación con *A. tumefaciens* LBA4404 con dos casetes de expresión diseñados en base al gen codificante de la PHA sintasa de *A. caviae*. Las dos versiones de casetes, incluyendo una con uso codonico adaptado a tabaco, demostraron ser funcionales según los resultados de caracterización mediante pruebas de GUS, PCR, y RT-qPCR. La obtención y caracterización del polímero resultante en individuos GM permitió determinar presencia de PHB a concentración de 0.36 mg por peso seco. Se logró encontrar granulos asociados a producción de PHAs en material vegetal de individuos transformados. Esta aproximación experimental permitió obtener exitosamente eventos GM de tabaco para síntesis de PHAs.

- Este modelo basado en DPI fue aplicado a la variedad Virgina k326 con lo cual se logró obtener transformantes positivos para la inserción de los casetes en el genoma, esta variedad no tiene PBR vigente. Adicionalmente, el modelo aquí planteado se aplicó a la obtención de plántulas transformadas con un casete de expresión para un gen codificante de la proteína anticancerígena parasporina 6 de Bt, varias patentes tienen relación con esta proteína según el ELO respectivo. Estas son dos experiencias que constatan que el modelo planteado en este estudio es valido para generar variedades GM de tabaco para apicaciones diferentes a la producción de cigarrillos.

7. Anexos

7.1. ANEXO: Congreso nacional

ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PERSONERÍA JURÍDICA 05547 – Diciembre 16 de 1974
Nit. 805.014.676-1

"50 años promoviendo el Desarrollo, Investigación, Enseñanza y Divulgación de las Ciencias Biológicas"

LV CONGRESO NACIONAL Y VI INTERNACIONAL VIRTUAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Noviembre 5-7 DEL 2020

Santiago de Cali, 14/03/2021

La Asociación colombiana de Ciencias Biológicas certifica que el trabajo:

INSERCIÓN DEL GEN phaC DE Aeromonas caviae EN EL GENOMA DE Nicotiana tabacum PARA LA BIOSINTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS Autores : Villamil-Bolaños F, Portela-Dussan D , Chaparro-Giraldo A.

Fue presentado en el LV Congreso Nacional y VI Internacional Virtual de Ciencias Biológicas, realizado del 5 al 7 de Noviembre del 2020

LINA JOHANNA MORENO GIRALDO
M.D., Esp., MSc., PhD (c)
Presidente LV Congreso Nacional y VI Internacional Virtual de Ciencias Biológicas
Presidente ACCB- Capítulo Valle – Fiscal JDN ACCB
Teléfonos de Contacto: 318 6538236
E-mail: accb55congresovirtual@gmail.com

Calle 23N **No. 19-47 Mz C casa 16 – Armenia Quindío. Móvil TI 3108467710.**
www.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org
E-mail: secretariatecnicaaccb@gmail.com
accb55congresovirtual@gmail.com

CONGRESO NACIONAL DE SEMILLAS -2022 ACOSEMILLAS

3 y 4 de Noviembre, Palmira

"Un reencuentro con la vida por una producción de calidad"

La Asociación Colombiana de Semillas y Biotecnología - Acosemillas

Otorga el presente certificado a los autores del poster titulado:

DESARROLLO DE TABACO GENÉTICAMENTE MODIFICADO PORTADOR DEL GEN phaC DE Aeromonas caviae PARA LA SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Diana D. Portela Dussán, Fabian Villamil Bolaños, Mariana Moncayo Rios, Felipe Sarmiento Salazar, Alejandro Chaparro Giraldo, Silvio A. López Pazos.

Por hacer parte de la exposición de trabajos de investigación en el marco del Congreso Nacional de Semillas 2022.

Leonardo Ariza Ramírez
Gerente General

7.2. ANEXO B: Articulo Aceptado publicación

Intellectual property on the design of genetically modified tobacco containing a *phaC* gene for peroxisomal biosynthesis of polyhydroxyalkanoates

Propiedad intelectual sobre el diseño de tabaco genéticamente modificado que contiene un gen *phaC* para la biosíntesis peroxisomal de polihidroxialcanoatos

Diana Daniela Portela[1*], Fabián Villamil-Bolaños[1], Felipe Sarmiento[1], Alejandro Chaparro-Giraldo[1†], and Silvio Alejandro López-Pazos[2]

ABSTRACT

Genetically modified (GM) plants producing polyhydroxyalkanoates (PHA) are protected by patents. This study analyzes the status of patents covering PHA-producing GM plants, focusing on the production of GM tobacco expressing the *phaC* gene of *Aeromonas caviae* for PHA synthesis. Thirty patent applications for PHAs producing GM plants were identified. Patent applications covering the design of GM tobacco expressing the *A. caviae phaC* gene for biosynthesis of PHAs in peroxisomes were found from our searches; five safeguard the rights on the *A. caviae phaC* gene, and three protect the transit peptide. In addition, 96 records related to *Nicotiana tabacum* breeder's rights were identified, with 22 varieties still protected.

Key words: patent, R-3 hydroxycarboxylic acid monomers, *Aeromonas caviae* PHA synthase, *Nicotiana tabacum*, plant breeder's rights.

RESUMEN

Las plantas modificadas genéticamente (GM) productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) son protegidas por patentes. Este estudio analiza el estado de las patentes que protegen las plantas GM productoras de PHA, centrándose en la producción de tabaco GM que expresa el gen *phaC* de *Aeromonas caviae* para la síntesis de PHA. Se identificaron 30 solicitudes de patentes para plantas GM productoras de PHAs. De las solicitudes de patentes vigentes que cubren el diseño de tabaco GM que expresa el gen *phaC* de *A. caviae* para la biosíntesis de PHAs en peroxisomas, cinco patentes cubren el gen *phaC* de *A. caviae* y tres patentes cubren el péptido de tránsito. Además, se identificaron 96 registros relacionados con los títulos de obtentor de *Nicotiana tabacum* dentro de los cuales 22 variedades aún se encuentran protegidas.

Palabras clave: patente, monómeros del ácido hidroxicarboxílico R-3, PHA sintasa de *Aeromonas caviae*, *Nicotiana tabacum*, títulos de obtentor.

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) have been used to replace synthetic petroleum-derived plastics that are environmentally recalcitrant and polluting (Muneer *et al.*, 2020). Advances in biotechnology related to synthetic biology and systems biology can provide efficient strategies to produce PHAs in other organisms, such as genetically modified (GM) plants, by introducing the genes encoding for enzymes involved in the biosynthesis of PHAs in cytosol, plastids, mitochondria, or peroxisomes (Lössl *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2011; Bohmert-Tatarev *et al.*, 2011). Polyhydroxybutyrate (PHB) is the most common type of PHA (Stouten *et al.*, 2019), which is synthesized from acetyl-CoA by the bacterium *Cupriavidus necator* involving three enzymes: (i) β-ketothiolase (*phaA* gene) catalyzes the condensation of two molecules of acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA; (ii) acetoacetyl-CoA reductase (*phaB* gene) catalyzes the reduction of acetocatyl-CoA to (R)-3-hydroxybutyryl-CoA; (iii) PHA synthase (*phaC* gene) catalyzes the polymerization of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA monomers (Gupta *et al.*, 2021).

Acetyl CoA is produced in numerous metabolic pathways in plants. In general, the metabolic pathway of glycolysis occurs in the cytosol; once pyruvate has been produced it is oxidized by pyruvate dehydrogenase into acetyl-CoA to enter the citric acid cycle. The acetyl-CoA can be used by the β-ketothiolase present in the cytosol to carry out the first metabolic reaction that produces PHB. Insertion of *phaB* and *phaC* genes into the plant genome is required to complete the synthesis of PHB in the cytosol (Jeon *et al.*,

7.3. ANEXO C: Pasantía

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Departament de Química Analítica, Nutrició i Bromatologia

Alicante, 31 de julio de 2019

Señores
Doctorado en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín

CERTIFICADO ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

Estimados Señores,

Los abajo firmantes, por medio de la presente certificamos que la estudiante de doctorado en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Dña. Diana Daniela Portela Dussán, identificada con cédula de ciudadanía No. 1032432867 de Bogotá, realizó una estancia de investigación en el Grupo de investigación Análisis de Polímeros y Nanomateriales (NANOBIOPOL) del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante (España), bajo nuestra supervisión, durante el periodo comprendido entre el 1 de mayo al 31 de julio de 2019.

Durante su estancia de investigación desarrolló las siguientes actividades: evaluación de metodologías para la extracción y metilación de poli(hidroxialcanoatos) en tejido de *Nicotiana tabacum* y *Bacillus subtilis*, ensayos de calorimetría diferencial del barrido y ensayos de cromatografía de gases con detector de llama ionizante y cromatografía de gases acoplado a masas

Dichas actividades fueron realizadas como colaboración de nuestro Grupo de investigación en el proyecto de tesis de doctorado de la estudiante, titulado "Expresión del gen *phaC* de *Aeromonas caviae* en líneas transgénicas derivadas de una variedad de *Nicotiana tabacum L.* cultivadas en el Departamento del Huila".

Para que así conste, se firma la presente en Alicante, a 31 días del mes de julio de 2019,

Atentamente,

Prof. Alfonso Jiménez Migallón
Profesor Titular
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Universidad de Alicante

Prof. María del Carmen Garrigós Selva
Profesor Titular
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Universidad de Alicante

Tel. – Fax 96 590 3527
Campus de Sant Vicent del Raspeig
Apt. 99 E-03080 Alacant
E-mail: dqana@ua.es
http://dqana.ua.es/

8. Bibliografía

Abbas, M. (2018). Genetically engineered (modified) crops (Bacillus thuriengiensis crops) and the world controversy on their safety. *Egyptian journal of Biological Pest Control, 28*(52). doi:https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2

Agarwal, P., Garg, V., Gautam, T., Pillai, B., Kanoria, S., & Burma, P. (2014). A study on the influence of different promoter and 5′UTR (URM) cassettes from Arabidopsis thaliana on the expression level of the reporter gene β glucuronidase in tobacco and cotton. *Transgenic Res, 23*(2), 351-363. doi:https://doi.org/10.1007/s11248-013-9757-9

Agarwal, P., Gautam, T., Singh, A., & Burma, P. (2019). Evaluating the effect of codon optimization on expression of bar gene in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 8*, 189–202. doi:10.1007/s13562-019-00506-2

Akiba , T., & Okumura , S. (2017). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology, 142*, 44-49.

Alandete-Saez, M., Chi Ham, C. L., Graff, G. D., Boettiger, S., & Bennet, A. B. (2015). Intellectual property in agricultural biotechnology: Strategies for open access. In N. Stewart (Ed.), *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications* (pp. 347-63). New Jersey: John Wiley & Sons.

Altenbach, S. B. (1989). Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Mol. Biol*, 513–522.

Amara, A., & Moawad, H. (2011). PhaC Synthases and PHA Depolymerases: The Enzymes that Produce and Degrade Plastic. *IIUM Engineering Journal, 12*(4). doi:10.31436/iiumej.v12i4.171

Anderson, D. J., Gnanasambandam, A., Mills, E., O'shea, M., Nielsen, J., & Brumbley, S. (2011). Synthesis of short-chain-length / medium-chain length polyhydroxy alkanoate-(PHA) Copolymers of peroxisomes in transgenic sugarcane. *Tropical Plant Biology, 4*, 170-184. doi:10.1007/s12042-011-9080-7

Anwara , A. M., Aljabari, M., & El-Soda, M. (2021). Patterns of genome-wide codon usage bias in tobacco, tomato and potato. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. doi:https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1911684

Anwara , A. M., Aljabri, M., & El-Soda, M. (2021). Patterns of genome-wide codon usage bias in tobacco, tomato and potato. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35*(1), 657-664. doi:https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1911684

Arai, Y., Nakashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Shimizu, T., Yasuda, M., . . . Yamaguchi, I. (2002). Synthesis of a novel class of polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis peroxisomes, and their use in monitoring short-chain-length intermediates of βoxidation. *Plant cell physiology*, 555-562.

Aremu, M. O., Ishola, M. M., & Taherzadeh, M. J. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production from Volatile Fatty Acids (VFAs) from Organic Wastes by Pseudomonas oleovorans. *Fermentation, 7*(4). doi:doi.org/10.3390/fermentation7040287

Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., & Matsumoto, K. (2016). A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in Cupriavidus necator H16. *J. Biotechnol*, 94-102. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.004

Asociación de Semilleros Argentinos. (2015). *Una breve historia del mejoramiento de cultivos.* Obtenido de Chilebio: https://chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/09/Una-Breve-Historia-del-Mejoramiento-de-Cultivos.pdf

Assad-García, N., Ochoa-Alejo, N., García-Hernández, E, Herrera-Estrella, L., & Simpson, J. (1992). Agrobacterium-mediated transformation of tomatillo (Physalis ixocarpa) and tissue specific and developmental expression of the CaMV 35S promoter in transgenic tomatillo plants. *Plant Cell Reports*. doi:10.1007/BF00233092

Aydin, G., Yucel, M., Chan, M.-T., & Oktem, H. A. (2014). Evaluation of abiotic stress tolerance and physiological characteristics of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Kennebec) that heterologously expresses the rice *Osmyb4* gene. *Plant Biotechnology Reports*, 8(3), 295-304. https://doi.org/10.1007/s11816-014-0322-7

Azizi-Dargahlou, S., Ahmadabadi, M., & Valizadeh Kamran, R. (2022). Biolistic Transformation and Expression of Functional Chymosin from a Codon- Optimized Synthetic Bovine Gene in Tobacco Plants. *Journal of Medicinal Plants and By-products*. Obtenido de https://jmpb.areeo.ac.ir/article_125848_c65fb13ded63911b02bd9526c98b16a1.pdf

Baidurah, S. (2022). Methods of analyses for biodegradable polymers: A review. *Polymers, 14*(22). doi:https://doi.org/10.3390/polym14224928

Bakhsh, A., Anayol, E., & Ozcan, S. (2014). Comparison of transformation efficiency of five Agrobacterium tumefaciens strains in Nicotiana Tabacum L. *Plant Sciences, 26*(3), 259-264.

Baldissera, M., Souza, C., Parmeggiani, B., Leipnitz, G., Verdi, C., Santos, R., . . . Baldisserotto, B. (2018). The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by Aeromonas caviae: Relationship with disease pathophysiology. *Microbial Pathogenisis*, 53-57. doi:10.1016/j.micpath.2018.06.011

Bandopadhyay, R. H. (2010). Levels and Stability of Expression of Transgenes. *Transgenic Crop Plants: Principles and Development*, págs. 145-186.

Barbosa , M., Espinoza-Hernandez, A., Malagón, D., & Moreno-Sarmiento, N. (2005). Producción de poli-β-hidrobutirato (PHB) por Ralstonia euthropha ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*, 45-54. Obtenido de https://www.redalyc.org/pdf/499/49910105.pdf

Basso, M., Arraes, F., Grossi-de-Sa, M., Moreira, V., Alves-Ferreira, M., & Grossi-de-Sa, M. (2020). Insights Into Genetic and Molecular Elements for Transgenic Crop Development. *Frontiers in Plant Science*, 1-24. doi:https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00509

Benítez Candia, N., Fernández Ríos, D., & Vicién, C. (2020). paraguay's path toward the simplification of procedures in the approval of gm crops. *Front. Bioeng Biotechnol, 8*, 1023. doi: 10.3389/fbioe.2020.01023

Bohmert, K. B. (2002). Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant physiology, 128*(4), págs. 1282–1290.

Bohmert-Tatarev, K., McAvoy, S., Daughtry, S., Peoples, O. P., & Snell, K. D. (2011). High Levels of Bioplastic Are Produced in Fertile Transplastomic Tobacco Plants Engineered with a for the Production of Polyhydroxybutyrate. *Plant Physiology, 155*, 1690-1708.

Bravo-Fernández, A., & Figueras, M. (2020). An Update on the Genus Aeromonas: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms, 8*(1). doi:10.3390/microorganisms8010129

Budde, C., Riedel, S. L., Willis, L. B., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2011). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered

Ralstonia eutropha strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 2847-2854. doi:10.1128/aem.02429-10

CAMBIA. (02 de Febrero de 2022). *Legacy pCAMBIA Vectors*. Obtenido de https://cambia.org/welcome-to-cambialabs/cambialabs-projects/cambialabs-projects-legacy-pcambia-vectors-pcambia-legacy-vectors-1/

Capdesuñer, Y., Rivas, M., Quiñones-Galvis, J., Gallo, M., Rodriguez, E., Perez, J., . . . Hernández, M. (2016). Análisis comparativo de indicadores químicos de la hoja y diterpenos de exudados foliares de Nicotiana tabacum L. *Cultivos tropicales, 37*(especial), 127-135. doi:10.13140/RG.2.1.3186.1369

Carreño-Venegas, A., Mora-Oberlaender, J., & Chaparro-Giraldo, A. (2017). Identification and freedom to operate analysis of potential genes for drought tolerance in maize. *Agronomía Colombiana, 35*(2), 150-157. doi:https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n2.60706.

Carroll, M. J. (2016). The importance of regulatory data protection or exclusive use and other forms of intellectual property rights in the crop protection industry. *Pest Management Science*.

Carvajal- Campos P; Jiménes V. (2021).Ingeniería Genética contra estrés abiótico en cultivos neotropicales: osmolitos, factores de transcripción y CRISPR/Cas9. Rev. colomb.biotechnol, 33 (2).

CFIA. (Septiebre de 2022). *Plants with novel traits.* Obtenido de https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/eng/1300137887237/1300137939635

Chacón-Sanchez, M. I. (2009). Darwin y la domesticación de plantas en las Américas: el caso del maíz y el fríjol. *Acta biológica Colombiana, 14*, 351-364.

Chakraborty, S. C. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from Amaranthus hypochondriacus. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 3724-3729.

Chang, Y.-C., Reddy, M. V., Imura, K., Onodera , R., Kamada, N., & Sano, Y. (2021). Two-Stage Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Cheese Whey Using Acetobacter pasteurianus C1 and Bacillus sp. CYR1. *bioengineering, 8*(11).

Chek, M. F., Hiroe, A., Hakoshima, T., Sudesh, K., & Taguchii, S. (2019). PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. *Applied Microbiology and Biotecnology, 103*, 1131-1141. doi:10.1007/s00253-018-9538-8

ChileBIO. (Agosto de 2020). *Plantas transgénicas que producen medicamentes: ¿es la agricultura el futuro de las vacunas?* Obtenido de

https://www.chilebio.cl/2020/08/28/plantas-transgenicas-que-producen-medicamentos-es-la-agricultura-el-futuro-de-las-vacunas/: https://www.chilebio.cl/2020/08/28/plantas-transgenicas-que-producen-medicamentos-es-la-agricultura-el-futuro-de-las-vacunas/

Choi, S., Rhie, M., Kim, H., Joo, J., Cho, I., Son, J., . . . Park, S. J. (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering, 58*, 47-81. doi:10.1016/j.ymben.2019.05.009

Clark, M. M. (2020). Transgene Biocontainment Strategies for Molecular Farming. *Front. Plant Sci., 11*.

Cramer, C., Cramer , C. L., Boothe, J. G., & Oishi , K. K. (1996). Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Annals of the New York Academy of Sciences, 792*, 62-71. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb32492.x

Daniell, H., Streatfield, S., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farm-ing: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, 219-226.

De Guglielmo, Z. F. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología, 18*(2), págs. 119-128.

De Silva, L., Wickramanayake, M., & Heo, G.-J. (2021). Virulence and antimicrobial resistance potential ofAeromonasspp. associated with shellfish. *Applied Microbiology*. doi:doi:10.1111/lam.13489

De Smet, M., Eggink, G., Witholt , B., Kingma, J., & Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by Pseudomonas oleovorans during growth on octane. *Journal Bacteriol*, 870-878.

Deepa, K., Rodionov, R. N., Weiss, N., & Parani, M. (2013). Transgenic Expression and Functional Characterization of Human Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) in Tobacco (Nicotiana tabacum L.). *Appl Biochem Biotechnol, 171*, 1390-1404. doi:10.1007/s12010-013-0413-x

Deng, W., Babu, R., Su, D., Yin, S., Begley, T., & Dedon, P. (2015). Trm9-Catalyzed tRNA Modifications Regulate Global Protein Expression by Codon-Biased Translation. *PLOS GENETICS*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005706

Díaz Guillén, F. (28 de Febrero de 2010). *El proceso de domesticación en las plantas.* Obtenido de Casa del tiempo: https://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_num28_66_70.pdf

Dong, O., & Ronald, P. (2019). Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent Progress and Future Perspectives. *Plant Physiology, 180*(1), 26-38. doi:doi.org/10.1104/pp.18.01224

Edwards, K., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., Humpry, M., Evans, A., Bombarely, A., . . . Mueller, L. (2017). A reference genome for Nicotiana tabacum enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics*, 448. doi:10.1186/s12864-017-3791-6

Eriksson, D., Custers, R., Edvardsson, B., Hansson, S., Purnhagen, K., Qaim, M., . . . Visser, R. (2020). Options to reform the european union legislation on gmos: scope and definitions. *Trends Biotechnol*, 231-234. doi:10.1016/j.tibtech.2019.12.002

Falco, S. C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R. T., & Webber, P. (1995). Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *BioTechnology*, 577–582.

Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorvski, T., Nordling, E., . . . Opperman, U. (2002). Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal Of Biological Chemistry, 277*(28), 25677-25684. doi:10.1074/jbc.M202160200

Finagro. (2018). *Ficha Técina Tabaco.* Bogotá: Finagro.

Fukui, T. D. (1997). Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of Aeromonas caviae. *Journal of bacteriology, 179*(15), págs. 4821-4830.

Fulgsang, A. (2004). The 'effective number of codons' revisited. *Biochem Biophys Res Commun, 317*(3), 957-964. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.138

Fuller, D. (2007). Contrasting Patterns in Crop Domestication and Domestication Rates: Recent Archaeobotanical Insights from the Old World. *Ann Bot*, 903-924.

Gao, Y., Liu, J., Yang, F., Zhang, G., Wang, D., Zhang, L., Ou, Y., & Yao, Y. (2020). The WRKY transcription factor WRKY8 promotes resistance to pathogen infection and mediates drought and salt stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia Plantarum*, *168*(1), 98-117. https://doi.org/10.1111/ppl.12978.

Ghaffar, A., Bagheri, A., Reza , M., Malekzadeh-Shafaroudi, S., Afsharifar, A., & Niazid, A. (2016). Expression of Hemagglutinin-Neuraminidase and fusion epitopes of Newcastle Disease Virus in transgenic tobacco. *Electron. J. Biotechnol, 19*(4). doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.05.003

Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol, 12*, 450-454. doi:10.1016/s0958-1669(00)00244-5

Goel, D., Singh, A. K., Yadav, V., Babbar, S. B., Murata, N., & Bansal, K. C. (2011). Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses. *Journal of Plant Physiology*, *168*(11), 1286-1294. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.010

Goldstein, D., & Thomas, J. (2004). Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM: An International Journal of Medicine, 97*, 705-716.

Gomez, M. (2002). La producción de vacunas y otros compuestos farmacéuticos en plantas. *Revista de la Sociedad Química de México, 46*(3), 264-270.

González , J. M., & William, G. (1998). Cultivo de Tabaco Nicotiana tabacum. *Escuela Agrícola Panamericana*.

Gubiš, J., Vaňková, R., Červená, V., Dragúňová, M., Hudcovicová, M., Lichtnerová, H., & Jurekovád, Z. (2007). Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany, 73*(4), 505-511. doi:https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.03.011

Gumel , A., Annuar, M., & Chisti, Y. (2012). Lipase catalyzed ultrasonic synthesis of poly-4-hydroxybutyrate-co-6-hydroxyhexanoate. *Ultrasonics Sonochemistry*. doi:https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.09.015

Gupta, J., Rathour, R., Maheshwari, N., & Thakur, I. S. (2021). Integrated analysis of Whole genome sequencing and life cycle assessment for polyhydroxyalkanoates production by Cupriavidus sp ISTL7. *Bioresource Technology, 337*.

Hahn, J., Eschenlauer, A., Narrol, M., Somers, D., & Srienc, F. (1997). Growth kinetics, nutrient uptake, and expression of the Alcaligenes eutrophus poly(beta-hydroxybutyrate) synthesis pathway in transgenic maize cell suspension cultures. *Biotechnol. Progress, 13*, 347-354.

Hahn, J., Eschenlauer, A., Sleytr, U. B., Somers, D. A., & Srienc, F. (1999). Peroxisomes as sites for synthesis of polyhydroxyalkanoates in transgenic plants. *Biotechnol Prog, 15*(6), 1053-1057. doi:10.1021/bp990118n

Hanna, T., King, W., Thibodeau, S., Jalink, M., Paulin, G., Harvey-Jones, E., . . . Aggarwal, A. (2020). Mortality due to cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. doi:doi.org/10.1136/bmj.m4087

Harada, K., Kobayashi, S., Oshima, K., Yoshida, S., Tsuge, T., & Sato, S. (2021). Engineering of Aeromonas caviae Polyhydroxyalkanoate Synthase Through Site-

Directed Mutagenesis for Enhanced Polymerization of the 3-Hydroxyhexanoate Unit. *Front Bioeng Biotechnol*. doi:10.3389/fbioe.2021.627082

Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,*, 2122-2127. Obtenido de 10.1073/pnas.94.6.2122

Hawks, W., & Collins, S. (1986). Principles of Flue-Cured Tobacco Production. *Field Crops Research*.

Heikkilä, J., & Lorenz, A. (2017). Need for speed? Exploring the relative importance of patents and utility models among German firms. *Economics of innovation and new techonology*. doi:10.1080/10438599.2017.1310794

Henry, J. B., Vann, M. C., & Lewis, R. S. (2019). Agronomic Practices Affecting Nicotine Concentration in Flue-Cured Tobacco: A Review. *Agronomy Journal*, 3067-3075. doi:10.2134/agronj2019.04.0268

Herrera-Estrella, L., & Simpson, J. (1995). Genetically-Engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. doi:10.1007/BF00364613

Herrera-Estrella, L., Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J., Montagu, M., & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J*, 987-995.

Hincapié, V., & Chaparro-Giraldo, A. (2014). Study of freedom to operate for a genetically modified potato (Solanum tuberosum L.) line. *Revista Colombiana de Biotecnología, 16*(1), 119-128. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44260.

Holásková, E., Galuszka, P., Mičúchová, A., Šebela, O., Öz, M., & Frébort, I. (2018). Molecular Farming in Barley: Development of a Novel Production Platform to Produce Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biotechnol J, 13*(6), e1700628. doi:10.1002/biot.201700628. Epub 2018

Huang, A., Trelease, R., & Moore, T. (1983). Plant peroxisomes. *Academic*.

Humphrey, B., Huang, N., & Klasing, K. (2002). Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like porperties when fed to chicks. *J Nutr, 132*(6), 1214-1218. doi:doi: 10.1093/jn/132.6.1214. PMID: 12042436.

Huong, K.-H., Teh, C.-H., & Al-Ashraf Abdullah, A. (2017). Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic. *thermoplastic. International Journal of Biological Macromolecules, 101*, 983-995. doi:doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.179

Instituto Colombiano Agropecuario. (2017). *Legislación sobre protección a los derechos de obtentores de variedades vegetales.* Bogotá: Ministerio de Agricultura.

ISAAA. (2021). *Breaking Barriers with Breeding: A Primer on New Breeding Innovations for Food security.* Ithaca, NY: ISAAA Brief. Retrieved Abril 2022, from ISAAA Brief: https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/56/

Ismail, I., Iskandar, N., Gor, M.-C., & Abdulah, R. (2010). Genetic transformation and molecular analysis of polyhydroxybutyrate biosynthetic gene expression in oil palm m (Elaeis guineensis Jacq. Var Tenera) tissues. *Plant OMICS, 3*(1).

Japelaghi, R. H. (2018). High-Efficiency Agrobacterium -Mediated Transformation of Tobacco (Nicotiana tabacum). *Plant Molecular Breeding, 6*, págs. 38-50.

Jefferson, D. J., Graff, G. D., Chi-Ham, C. L., & Bennet, A. B. (2015). The emergence of agbiogenerics. *National Biotechnology*, 819-823. doi:10.1038/nbt.3306

Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2013). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental microbiology*, 2357-2373. doi:10.1111/1462-2920.12356

Jeon, J.-M., Brigham, C. J., Kim, Y.-H., Kim, H.-J., Yi, D.-H., Kim, H., . . . Yang, Y.-H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P(HB-co-HHx)) from butyrate using engineered Ralstonia eutropha. *Appl Microbiol Biotechnol, 98*(12). doi:10.1007/s00253-014-5617-7

Jia, K., Cao, R., Hua, D. H., & Li, P. (2016). Study of Class I and Class III Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases with Substrates Containing a Modified Side Chain. *Biomacromoleculas, 17*(4), 1477-1485. doi:10.1021/acs.biomac.6b00082

Joshi, N. (2009). In vitro growth and shoot multiplication in Nicotiana tabacun L. -Influence of gelling agent and carbon source. *International journal of plant developmental biology, 3*(1), 29-33. Obtenido de http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/IJPDB_3(1)/IJPDB_3(1)29-33o.pdf

Jung, S.-K., & McDonald, K. (2011). Visual gene developer: A fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization. *BMC Bioinformatics, 12*(1), 1-13.

Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., & Doi, Y. (2004). High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its

recombinant strain. *Polym Degrad Stabil*, 79-86. doi:10.1016/s0141-3910(03)00277-1

Kaló, Z. H.-C. (2015). Need for multicriteria evaluation of generic drug policies. *Value in health : the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research, 18*(2), págs. 346-351.

Kämpf, M., Thöny-Meyer, L., & Ren, Q. (2014). Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyrate) in recombinant Escherichia coli grown on glycerol is stimulated by propionic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.023

Kazusa. (Marzo de 2020). *Codon usage database*. Obtenido de https://www.kazusa.or.jp/codon/

Keridou, I., Del Valle, L., Funk, L., Turon, P., Franco , L., & Puiggalí, J. (2019). Non-Isothermal Crystallization Kinetics of Poly(4-Hydroxybutyrate) Biopolymer. *molecules, 24*(15), 2840. doi:10.3390/molecules24152840

Khezri, G., Baghban Kohneh Rouz, B., Ofoghi, H., & Davarpanah, S. (2020). Heterologous expression of biologically active Mambalgin-1 peptide as a new potential anticancer, using a PVX-based viral vector in Nicotiana benthamiana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 142*, 241-251. doi:https://doi.org/10.1007/s11240-020-01838-x

Kim, E. J., Son , H., Kim, S., Ahn, J.-W., & Kim, K.-J. (2014). Crystal structure and biochemical characterization of beta-keto thiolase B from polyhydroxyalkanoate-producing bacterium Ralstonia eutropha H16. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 3*(14), 365-369. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.055

Kim, E.-J., & Kim, K.-J. (2014). Crystal structure and biochemical characterization of phaA from Ralstonia eutropha, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 124-129.

Kim, J., Chang, J., Kim, E.-J., & Kim, K.-J. (2014). Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from Ralstonia eutropha. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 443*, 783-788. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.150

Kim, J., Kim, Y.-J., Choi, S., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2017). Crystal structure of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal*. doi:10.1002/biot.201600648

Kim, M. Y. (2017). Expression and assembly of cholera toxin B subunit and domain III of dengue virus 2 envelope fusion protein in transgenic potatoes. *Protein expression and purification, 139*, págs. 57-62.

Kim, Y.-J., Choi, S. Y., Kim, J., Jin, K. S., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2016). Structure and function of the N-terminal domain of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal*. doi:10.1002/biot.201600649

Kimura, M., Araoka, H., & Yoneyama, A. (2013). Aeromonas caviae is the most frequent pathogen amongst cases of Aeromonas bacteremia in Japan. *Scand J Infect Dis, 45*(4), 304-309. doi:10.3109/00365548.2012.737474

Kiranmai, K., Lokanadha Rao, G., Pandurangaiah, M., Nareshkumar, A., Amaranatha Reddy, V., Lokesh, U., Venkatesh, B., Anthony Johnson, A. M., & Sudhakar, C. (2018). A novel WRKY transcription factor, *MuWRKY3* (*Macrotyloma uniflorum* Lam. Verdc.) enhances drought stress tolerance in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 346. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00346.

Kittur , F., Bah, M., Archer-Hartmann, S., Hung, C.-Y., Azadi, P., Ishihara, M., . . . Xie, J. (2013). Cytoprotective effect of recombinant human erythropoietin produced in transgenic tobacco plants. *PLoS One, 8*, e76468.

Knapp, S., Chase, M., & Clarkson, J. (2004). Nomenclatural changes and a new section classification in Nicotiana (Solanaceae). *Taxon*. doi:10.2307/4135490

Koller, M., & Mukherjee, A. (2022). A new wave of industrialization of PHA biopolyesters. *Bioengineering, 9*(2). doi:https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074

Kourtz, L., Dillon, K., Daughtry, S., Peoples, O. P., & Snell, K. D. (2007). Chemically inducible expression of the PHB biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Transgenic Res, 16*(6), 759-769. doi:10.1007/s11248-007-9067-1

Krishna, M., Suresh, T., Kazi, M., Vineet, K., & Narendra, T. (2013). An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (Zea mays L.). *Plant Signaling & Behavior, 8*(10).

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2019). Pathways of DNA transfer to plants from agrobacterium tumefaciens and related bacterial species. *Annual Review of Phytopathology, 57*, 231–251. doi: https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101

Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science, 38*, 536-583. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003

Lemoigne, M., Grelet, N., Croson, M., & Le Treis, M. (1945). Formation de lipide /B-hydroxybutyrique aux dkpens du glucose par le Bacillus megaterium. DonnCes quantitatives. *Chim biol pams*, 27-90.

Lens. (17 de 04 de 2022). *how to read a patent*. Obtenido de https://support.lens.org/knowledge-base/how-to-read-a-patent/

Lewis, R. S. (2020). Nicotiana tabacum L: Tobacco. In : Novak J., Bluthner WD. (eds) Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. *Handbook of Plant Breeding*. doi:10.1007/978-3-030-38792-1_9

Li , X., Li, S., Lang, Z., Zhang, J., Zhu, L., & Huang, D. (2013). Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports, 8*(32), 1299-1308.

Li, M., Li, Z., Li, S., Guo, S., Meng, Q., Li, G., & Yang, X. (2014). Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis reduces heat-enhanced photoinhibition by enhancing antioxidative defense and alleviating lipid peroxidation in tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, *32*(1), 42-51. https://doi.org/10.1007/s11105-013-0594-z.

Limkul, J., Iizuka, S., Sato, Y., Misaki, R., Ohashi, T., Ohashi, T., & Fujiyama, K. (2016). The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered Nicotiana benthamiana plants. *Plant Biotechnol J, 14*(8), 1682-94. doi:10.1111/pbi.12529. Epub 2016 Feb 12

Livak, K., & Shmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods, 25*(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Lössl, A., Bohmert, K., Harloff, H., Eibl, C., Mühlbauer, S., & Koop, H.-U. (2005). Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the R. eutropha phb operon in transplastomic tobacco. *Plant Cell Physiol, 46*(9), 1462-1471. doi:10.1093/pcp/pci157. Epub

Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.-J., Jung, C., & Koop, U.-H. (2003). Polyester synthesis in transplastomic tobacco (Nicotiana tabacum L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep, 21*, 891-899. doi:10.1007/s00299-003-0610-0

Low, L., Yang, S., Andrew Kok, D., Ong-Abdullah, J., Tan, N., & Lai, K. (2018). Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method. *New visions in plant science*, 41-61.

Luo, K., Zheng, X., Xiao, Y., Pei, Y., McAvoy, R., Chen, Y., & Li, Y. (2006). The maize Knotted1 gene is an effective positive selectable marker gene for Agrobacterium-mediated tobacco transformation. *Genetic Transformation and Hibridization*, 403-409. doi:10.1007/s00299-005-0051-z

Lyu, X., Yang, Q., Li, L., Dang, Y., Zhou, Z., Chen, S., & Liu, Y. (2020). Adaptation of codon usage to tRNA I34 modification controls translation kinetics and proteome landscape. *PLoS Genet, 16*(6), e1008836. doi:doi: 10.1371/journal.pgen.1008836

Lyu, J. I., Min, S. R., Lee, J. H., Lim, Y. H., Kim, J.-K., Bae, C.-H., & Liu, J. R. (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *112*(2), 257-262. https://doi.org/10.1007/s11240-012-0225-7.

Macrae, R., & Wilkinson, J. (1958). Poly-β-hyroxybutyrate metabolism in washed suspensions of Bacillus cereus and Bacillus megaterium. *J Gen Microbiol*, 210-222.

Malacarne, F., & Reynolds , R. (2015). *Una breve historia del mejoramiento de cultivos.* Obtenido de Asociación Semilleros Argentinos: https://chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/09/Una-Breve-Historia-del-Mejoramiento-de-Cultivos.pdf

Mall, T., Gupta, M., Dhadialla, T., & Sarria, R. (2019). Overview of biotechnology-derived herbicide tolerance and insect resistance traits in plant agriculture. *Transgenic Plants.Methods in Molecular Biology, 1864*, 313-342. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_21

Manoj K, S., Singh, S., Kapoor, N., & Tomar, R. (2022). Polyhydroxyalkanoate Production in Transgenic Plants: Green Plastics for Better Future and Environmental Sustainability. En P. Kumar, R. Tomar , J. Bhat, M. Dobriyal, & M. Rani, *Agro-biodiversity and Agri-ecosystem Management. Springer, Singapore.* doi:https://doi.org/10.1007/978-981-19-0928-3_15

Martinez-Tobón, D. I., Gul, M., Elias, A. L., & Sauvageau, D. (2018). Polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradation using bacterial strains with demonstrated and predicted PHB depolymerase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology, 102*, 8049-8067. doi:10.1007/s00253-018-9153-8

Matsumoto , K., Murata, T., Nagao, R., Nomura, C., Arai, S., Arai, Y., . . . Shimada, H. (2009). Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of Arabidopsis thaliana using an engineered 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Biomacromoleculas*, 686-690. doi:10.1021/bm8013878

Matsumoto, K., Arai, Y., Nagao, R., Murata, T., Takase, K. K., Nakashita, H., . . . Doi, Y. (2006). Synthesis of short-chainlength/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers in peroxisome of the transgenic Arabidopsis thaliana harboring the PHA synthase gene from Pseudomonas 61-3. *Journal Polymer and Environ*, 369-374.

Matsumoto, K., Morimoto, K., Gohda, A., Shimada, H., & Taguchi, S. (2011). Improved polyhydroxybutyrate (PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 11*(4), 485-488. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.11.020

Matsumoto, K., Nagao, R., & Murata, T. (2005). Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in the transgenic Arabidopsis thaliana by the in vitro evolved highly active mutants of Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from Aeromonas caviae. *Biomacromolecules, 6*(4), 2126-2130.

McHughen, A. (2016). A critical assessment of regulatory triggers for products of biotechnology: product vs. process. *GM Crops Food, 7*, 125-158. doi::10.1080/21645698.2016.1228516

McMurtrey, J. E. (2017). *Tobacco.* Obtenido de Encyclopedia Britannica: https://www.britannica.com/plant/common-tobacco

McQualter, R., Petrasovits, L., Gebbie, L. K., Schweitzer, D., Blackman, D., Chrysanthopoulos, P., . . . Nielsen, L. (2015). The use of an acetoacetyl-CoA synthase in place of a β-ketothiolase enhances poly-3-hydroxybutyrate production in sugarcane mesophyll cells. *Plant Biotechnol J*, 700-707. doi:10.1111/pbi.12298

Mezzina, M. P., & Pettinari , J. M. (2016). Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins. *AMS Journal, 82*(17). doi:10.1128/AEM.01161-16

Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Appl Environ Microbiol*, 5060-5067. doi:10.1128/AEM.01161-16.

Mifune, J., Nakamura, S., & Fukui, T. (2010). Engineering of pha operon on Cupriavidus necator chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Polymer Degradation and Stability*, 1305-1312.

MinAgricultura. (2020). *Cadena de Tabaco.* Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural .

Mittendorf, V., Robertson, E. J., Krüger, N., Steinbüchel, A., & Poirier, Y. (1998). Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis thaliana using intermediates of peroxisomal fatty acid β-oxidation. *Natl Acad. Sci*, 13397-13402.

Mizuki , E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita , S., Saitoh, H., & Park, Y. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J Appl Microbiol, 86*(3), 477-86. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x.

Mohammadzadeh, S., Khabiri, A. R., Roohvand, F., Memarnejadian, A., Salmanian, A. H., Ajdary, S., & Ehsani, P. (2014). Enhanced-Transient Expression of Hepatitis C Virus Core Protein in Nicotiana tabacum, a Protein With Potential Clinical Applications. *Hepatitis monthly, 14*(11). doi:10.5812/hepatmon.20524

Mohan, P., Tula, S., & Tuteja, N. (2013). High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling & Behavior*, 1559-2324. doi:doi:https://doi.org/10.4161/psb.24354

Mohanrasu, K., Guru, R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Prakash, S., Song, D.-P., . . . Arun, A. (2020). Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by Bacillus megaterium. *271*. doi:10.1016/j.fuel.2020.117522

Moon, K.-B., Park , J.-S., Park, Y.-I., Song, I.-J., Lee , H.-J., Cho, H., . . . Kim , H.-S. (2020). Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals. *Plants, 9*(1). doi:https://doi.org/10.3390/plants9010030

Możejko-Ciesielska, J., Pokoj, T., & Ciesielski, S. (2018). Transcriptome remodeling of Pseudomonas putida KT2440 during mcl-PHAs synthesis: effect of different carbon sources and response to nitrogen stress. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 45*, 433-446. doi:10.1007/s10295-018-2042-4.

Muneer , F., Rasul, I., Azeem, F., Siddique, M. H., Zubair, M., & Nadeem, H. (2020). Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Remplacement of Synthetic Polymers. *Journal of Polymer and the Environment, 28*, 2301–2323.

Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou , H., Akao, T., & Mizuki, E. (2010). Three Cry toxin in two types from Bacillus thuringiensis Strain M019 prefentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 494-498. doi:10.1271/bbb.90615

Nagori, B. P., & Mathur, V. (2009). Basics of Writing Patent Non-Infringement and Freedom-to-Operate Opinions. *Journal of Intellectual Property Rights, 14*(1), 7-13.

Nakamura, Y., Gojobori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for year 2000. *Nucleic Acids Research*.

Nakashita, H., Arai, Y., Yoshioka, K., Fukui, T., Doi, Y., Usami, R., . . . Yamaguchi, I. (1999). Production of Biodegradable Polyester by a Transgenic Tobacco. *Biochemistry & Molecular Biology Regular, 63*(5), 870-874. doi:10.1271/bbb.63.870

NASEM. (2016). Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. *Washington (DC): National Academies Press (US), 17*. doi:10.17226/23395

Nawrath, C., Poirier, Y., & Somerville, C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of Arabidopsis thaliana results in high levels of polymer accumulation. *PNAS, 91*(26). doi:10.1073/pnas.91.26.12760

Needleman, S. B., & Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol, 48*(3), 443-53. doi:10.1016/0022-2836(70)90057-4

Okassov, A., Nersesyan, A., Kitada, S., & Ilin, A. I. (2015). Parasporins as new natural anticancer agents: A review. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology* , 5-16.

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K., & Mizuki, E. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from Bacillus thuringiensis. *Biochim Biophys Acta*, 1476-82. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.003.

OMPI. (16 de Abril de 2022). *Organizacion Mundial de la Propiedad Intelectual*. Obtenido de https://www.wipo.int/about-ip/es/

Onelli, E., Moscatelli, A., Gagliardi, A., Zaninelli, M., Bini, L., Baldi, A., . . . Rossi, L. (2017). Retarded germination of Nicotiana tabacum seeds following insertion of exogenous DNA mimics the seed persistent behavior. *PLOS ONE*. doi:doi.org/10.1371/journal.pone.0187929

Ortiz , I., & Escorsa, E. (2010). *Guía de Buenas Prácticas para la Búsqueda de Información en patentes.* Chile: : PIPRA-Fundación para la Innovación Agraria.

Park, S. J., Park, J. P., & Lee, S. Y. (2002). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant Escherichia coli in a pilot-scale fermenter. *Biotechnol Lett, 24*, 185–189.

Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). Aeromonas spp. clinical microbiology and disease. *Journal of infection*, 109-118. doi:10.1016/j.jinf.2010.12.003

Parveez, G., Bahariah, B., Ayub, N., Masani, M., Rasid, O., Tarmizi, A., & Ishak, Z. (2015). Production of polyhydroxybutyrate in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) mediated by microprojectile bombardment of PHB biosynthesis genes into embryogenic calli. *Front Plant Sci, 11*(6). doi:10.3389/fpls.2015.00598

Paveez, A., Bahariah, B., Ayub, N., Mat Yunus, A., Rasid, O. A., Hashim , A., . . . Sinskey, A. J. (2008). Transformation of PHB and PHBV genes driven by maize ubiquitin promoter into oil palm for the production of biodegradable plastics. *J Oil Palm Res*, 77-96.

PCT-The International Patent System. (2019). Obtenido de https://www.wipo.int/pct/en/

Petrasovits, L., Purnell, M., Nielsen, L., & Brumbley, S. (s.f.). Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. *Plant Biotechnol J, 1*, 162-172. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00229.x.

Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in Ralstonia eutropha. *Applied and Environmental Microbiology, 80*(2), 555-563. doi:10.1128/AEM.02935-13

Poirier , Y., Dennis, D., Klomparens , K., Nawrath , C., & Somerville , C. (1992). Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Reviews, 103*, 237-246.

Poirier, Yves. (2002). Polyhydroxyalknoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog Lipid Res, 41*(2), 131-155.

Priyadarshi, S., Shukla, A., & Borse, B. B. (2014). Polyhydroxyalkanoates: Role of Ralstonia eutropha. *International Journal of Biomedical and Advance Research, 05*(02). doi:10.7439/ijbar

Purnell, M., Petrasovits, L., Nielsen, L., & Brumbley, S. (2007). Spatio-temporal characterization of polyhydroxybutyrate accumulation in sugarcane. *Plant Biotechnol J, 5*(1), 173-184. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00230.x.

Queensland, T. U. . (2018). *Turning plants into medicine factories*. Obtenido de https://www.uq.edu.au/news/article/2018/03/turning-plants-medicine-factories

Rahib, L., Wehner, M., Matrisian, L., & Nead, K. (2021). stimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *AMA Netw Open, 4*(4). doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.4708

Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J., Boccaccini, A., & Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering R: Reports, 72*(3), 29-47. doi:10.1016/j.mser.2010.11.002

Rehm, B. (2007). Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailormade bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology, 9*, 41-62.

Rojas-Arias, A. C., Palacio, J. L., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2017). Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. *World Patent Information, 48*, 47-51. doi:https://doi.org/10.1016/j.wpi.2017.01.002

Rüdelsheim, P., Dumont, P., Freyssinet, G., Pertry, I., & Heijde, M. (2018). OffPatent Transgenic Events: Challenges and Opportunities for New Actors and Markets. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. doi: https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00071

Sagong, H.-Y., Son, H. F., Choi, S., Lee, S., & Kim, K.-J. (2018). Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in biochemical Sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2018.08.005

Sahoo, Satyabrata; Das , Shib Sankar; Rakshit, Ria. (2019). Codon usage pattern and predicted gene expression in Arabidopsis thaliana. *Gene, 721*. doi:10.1016/j.gene.2019.100012

Saruul, P., Srienc, F., Somers, D., & Samac, D. (2002). Production of a Biodegradable Plastic Polymer, Poly-β-Hydroxybutyrate, in Transgenic Alfalfa. *Crop Science, 42*(3), 919–927.

Sekizuka, T., Inamine, Y., Segawa, T., Hashino, M., & Yatsu, K. (2019). Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental Aeromonas hydrophila and Aeromonas caviae isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. *Environmental microbiology reports*. doi:10.1111/1758-2229.12772

Semeniuk, I., Pokynbroda, T., Kochubei, V., Midyana, H., Karpenko, O., & Skorokhoda, V. (2020). Biosynthesis and characteristics of polyhydroxybutyrates of Azotobacter vinelandii N-15. *Chemistry and Chemistry Technology, 14*(4), 463-467.

Seoane, I., Manfredi, L., & Cyras, V. (2018). Effect of two different plasticizers on the properties of poly(3-hydroxybutyrate) binary and ternaryscopy. *Applied Polymer Science Scinece*. doi: https://doi.org/10.1002/app.46016

Shabani, J. T. (2019). Perception of possible transformation in samples of corn seed and feed for livestock and poultry based on 35S promoter and nos terminator. *Iranian Journal of Field Crop Science, 50*(1), págs. 161-169.

Shafei, A., Matbouly, M., Mostafa, E., Al Sannat, S., Abdelrahman, M., Lewis, B., . . . Mostafa, R. (2018). stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. *Environmental Sciences and Pollution Research, 25*, 23624-23630. doi:ttps://doi.org/10.1007/s11356-018-2540-y

Shah, K. (2014). Optimization and production of Polyhydroxybutarate(PHB) by Bacillus subtilis G1S1from soil. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 3*(5), 377-387. Obtenido de https://www.ijcmas.com/vol-3-5/K.R.Shah.pdf

Shanmugaraj, B., Bulaon, C., & Phoolcharoen, W. (2020). Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production. *plants, 9*(7). doi:doi.org/10.3390/plants9070842

Sharma, V., Sehgal, R., & Gupta, R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer, 212*. doi:10.1016/j.polymer.2020.123161

Sharp, P., & Li, W.-h. (1987). The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 1281-1295.

Shze Mok, P., Ann Chuah , J., Najimudin, N., Najimudin, N., Woan-Ying Liew , P., Jong , B.-C., & Sudesh, K. (2021). In Vivo Characterization and Application of the PHA Synthase from Azotobacter vinelandii for the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing 4-Hydroxybutyrate. *Polymers, 13*(10).

SIC. (17 de 04 de 2022). *Patentes. Superintendencia de Industria y Comercio*. Obtenido de https://www.sic.gov.co/patentes

Sivamani, E., Nalapalli, S., Prairie, A., Bradley, D., Richbourg, L., Strebe, T., . . . Que, Q. (2019). A study on optimization of pat gene expression cassette for maize transformation. *Molecular Biology Reports*. doi:10.1007/s11033-019-04737-3

Slater, S., Mitsky, T., Houmiel, K., Hao, M., Reiser, S., Taylor, N., . . . Gruys, K. (1999). Metabolic engineering of Arabidopsis and Brassica for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat Biotechnol, 17*(10), 1011-1016. doi:10.1038/13711

Smith, C. J., Watson, C. F., Morris, P. C., Bird, C. R., Seymour, G. B., Gray, E. J., . . . Harding, S. (1999). Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol, 14*(3), 369-379. doi:10.1007/BF00028773

Soberon, M., Portugal, L., Garcia-Gomez, B., Sánchez, J., Onofre, J., Gómez, I., . . . Bravo, A. (2018). Cell lines as models for the study of Cry toxins from Bacillus thuringiensis. *Insect Biochem Mol Biol*. doi:10.1016/j.ibmb.2017.12.008

Spök, A., Twyman, R., Fischer, R., Ma, J., & Sparrow, P. (2008). . Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends Biotechnol, 9*(26), 506-17. doi:10.1016/j.tibtech.2008.05.007

Sruamsiri, D., Thayanakul, P., & Suwannasilp, B. B. (2020). In situ identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Sci Rep, 10*(3752). doi:10.1038/s41598-020-60727-7

Streatfield, S. J., Jilka, J. M., Hood, E. E., Turner, D. D., Bailey, M. R., Mayor, J. M., . . . Howard, J. A. (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine, 19*(17-19), 2742-2748. doi:10.1016/s0264-410x(00)00512-0

Stuart, E., Tehrain, A., Valentin, H., Dennis, D., Lenz, R., & Fuller, R. (1998). Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary. *64*(2-3), pp. 137-144. doi:10.1016/s0168-1656(98)00096-0.

Sung, Y. J., & Seo, Y. B. (2009). Thermogravimetric study on stem biomass of Nicotiana tabacum. pp. 1-4. doi:10.1016/j.tca.2008.12.010

Taguchi, S., & Matsumoto, K. (2021). Evolution of polyhydroxyalkanoate synthesizing systems toward a sustainable plastic industry. *Polymer Journal, 53*, 67-79.

Teixeira da Silva, J. A. (2005). Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. *Plant Science*, 1046–1058. doi:10.1016/j.plantsci.2005.07.012

Tilbrook, K., Gebbie, L., Schenk, P. M., Poirier, Y., & Brumbley, S. M. (2011). Peroxisomal polyhydroxyalkanoate biosynthesis is a promising strategy for bioplastic production in high biomass crops, Plant biotechn. *Plant Biotechnology Journal, 9*(9), 958-969. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00600.x

Tilbrook, K., Poirier, Y., Gebbie, L., Schenk, P. M., McQualte, R. B., & Brumbley, S. M. (2014). Reduced peroxisomal citrate synthase activity increases substrate availability for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in plant peroxisomes. *Plant Biotechnology Journal, 12*, 1044-1052. doi:10.1111/pbi.12211

Tremols, A., Monzón, L., Canepa, Y., Valiente, M., González, A., & Villalón , A. (2012). Diagnóstico nutricional del tabaco cultivado sobre suelos ferralíticos y ferrálicos rojos. II: Análisis de plantas. *Cuba Tabaco, 13*(1), 77-84.

Tsuge, T., Hyakutake, M., & Mizuno, K. (2015). Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing Bacillus. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(15). doi:10.1007/s00253-015-6777-9

Tsuge, T., Yamamoto, T., Yano, K., Abe, H., Doi, Y., & Taguchi, S. (2009). Evaluating the ability of polyhydroxyalkanoate synthase mutants to produce P(3HB−co−3HA) from soybean oil. *Macromol. Biosci*, 71-78. doi:10.1002/mabi.200800118

Turnbull, C., Lillemo, M., & Hvoslef-Eide, T. (2021). Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom - A Review. *Front Plant Sci, 24*(12), 630396. doi:10.3389/fpls.2021.630396

Universidad Politécnica de Madrid. (2011). *Contenido de una patente.* Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.

Universitat Politècnica de València, U. (2018). *NEWCOTIANA*. Obtenido de http://www.upv.es/noticias-upv/noticia-9822-newcotiana-es.html

UPOV. (20 de 02 de 2022). *UPOV*. Obtenido de https://www.upov.int/about/es/overview.html

USDA APHIS. (Semptember de 2022). *Petitions for determination of nonregulated status.* Obtenido de https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/permits-notifications-petitions/petitions/petition-status

Utsunomia, C., Ren, Q., & Manfred, Z. (2020). Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol*. doi:https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00257

Varchenko, O. I., Kuchuk, M. V., Parii, M. F., & Symonenko, Y. V. (2021). Comparison of gfp Gene Expression Levels after Agrobacterium-Mediated Transient Transformation of Nicotiana rustica L. by Constructs with Different Promoter Sequences. *Cytology and Genetics, 54*, 531-538. doi:10.3103/S0095452720060110

Volova, T. G., Zhila, N. O., Shishatskaya, E. I., Mironov, P. V., Vasil'ev, A. D., Sukovatyi, A. G., & Sinskey , A. J. (2013). The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures. *Polymer Sciences Series A*, 427-437. doi:10.1134/S0965545X13070080

Volova, T., Kiselev, E., Nemtsev, I., Lukyanenko, A., Sukovatyi, A., Kuzmin, A., . . . Shishatskaya, E. (2021). Properties of degradable polyhydroxyalkanoates with different monomer compositions. *International Journal of Biological Macromolecules, 182*, 98-114. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.008

Wallen, L. L., & Rohwedder, W. K. (1974). Poly-.beta.-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ Sci Technol*, 576-579. doi:10.1021/es60091a007

Wang, H., Zhou, X., Liu, Q., & Chen, G.-Q. (2010). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by Pseudomonas putida. *Applied Microbiology and Biotechnology, 89*(5), 1497–1507. doi:doi:10.1007/s00253-010-2964-x

Watts, A., Sankaranarayanan, S., Watts, A., & Raipuria, R. K. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. *Meta Gene, 19*. doi:https://doi.org/10.1016/j.mgene.2021.100899

Whittall, D., Baker , K., Breitling, R., & Takano, E. (2021). Host systems for the production of recombinant spider silk. *Trends in Biotechnology, 39*(6), 560-573. doi:https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.09.007

Williams, S., Rizk, S., & Martin, D. (2013). Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration.

Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering, 58(5). doi:doi:10.1515/bmt-2013

Wittenborn, E., Jost, M., Wei, Y., Stubbe, J., & Drennan, C. L. (2016). Structure of the Catalytic Domain of the Class I Polyhydroxybutyrate Synthase from Cupriavidus necator. *291*(48), 25264-25277. doi:10.1074/jbc.M116.756833

Xu, C., Wei, H., Wang, L., Yin, T., & Zhuge, Q. (2019). Optimization of the cry1Ah1 Sequence Enhances the Hyper-Resistance of Transgenic Poplars to Hyphantria cunea. *Front. Plant Sci*. doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00335

Yadav, B., Talan, A., Tyagi, R., & Drogui, P. (2021). Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: A review. *Bioresource Technology, 37*. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125419

Ye, X, Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science, 287*(5451), 303-305. doi:10.1126/science.287.5451.303

Yukawa , M., Tsudzuki, T., & Sugiura, M. (2006). The chloroplast genome of Nicotiana sylvestris and Nicotiana tomentosiformis: complete sequencing confirms that the Nicotiana sylvestris progenitor is the maternal genome donor of Nicotiana tabacum. *Mol Genet Genomics*, 367-373. doi:10.1007/s00438-005-0092-6

Zhao, Y., Yang, X., Zhou, G., & Zhang, T. (2019). Engineering plant virus resistance: from RNA silencing to genome editing strategies. *Plant Biotechnology Journal, 18*(2), 328-336. doi: https://doi.org/10.1111/pbi.13278

Zhang, H., Li, J., Wang, R., Zhi , J., Yin, P., & Xu, J. (2018). Comparative Analysis of Expansin Gene Codon Usage Patterns among Eight Plant Species. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. doi: https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1442746