

BIOTECNOLOGIA DE LA TREHALOSA EN LAS PLANTAS

J. O. Mascorro-Gallardo¹; N. Avonce²; G. Iturriaga^{2†}¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México C. P. 56200. MÉXICO.

Correo-e: joscar@correo.chapingo.mx

²Departamento de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos . C. P. 62210. MÉXICO.

Correo-e: iturri@cib.uaem.mx (†Autor responsable)

RESUMEN

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa. Se encuentra presente en una amplia gama de organismos llevando a cabo funciones como azúcar de reserva y como protector ante el estrés abiótico. Posee amplias aplicaciones biotecnológicas ya que protege proteínas y membranas biológicas, lo cual permite que pueda usarse como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos, y como sustituto de sacarosa en dulcería y panadería. La presencia de este disacárido en plantas tiene diversas funciones, donde además de ser osmoprotector juega un papel esencial en diversas etapas del desarrollo como en la formación del embrión y en la floración. La trehalosa parece estar también involucrada en la regulación del metabolismo del carbono y en la fotosíntesis, y su acumulación está asociada a una mayor tolerancia al estrés abiótico. También parece que este azúcar juega un papel indispensable en la interacción planta-microorganismo.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Arabidopsis*, estrés abiótico, levadura, *Selaginella*.

BIOTECHNOLOGY OF TREHALOSE IN PLANTS

ABSTRACT

Trehalose (α -D-glucopyranosil-(1,1)- α -D-glucopyranoside) is a non-reducing disaccharide, formed by two molecules of glucose. It is present in a broad spectrum of different organisms playing roles as reserve carbohydrate and conferring tolerance to abiotic stress. It possesses broad biotechnological applications, since it is able to protect proteins and biological membranes, which allows its use for preserving foods, enzymes, vaccines, cells, tissues and organs, and can also substitute sucrose in confectionery and bakery. The presence of this disaccharide in plants, has several functions, where besides of being an osmoprotectant it plays an essential role in several developmental stages, such as embryo maturation and flowering. Trehalose also is involved in regulating carbon metabolism and photosynthesis, and its accumulation is related with tolerance to abiotic stresses. Finally, this sugar seems to perform an essential role in the plant-microorganism interaction.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Arabidopsis*, abiotic stress, yeast, *Selaginella*.

BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA
Y SU DISTRIBUCIÓN EN LOS SERES VIVOS

La trehalosa fue primero descrita por Wiggers desde 1832 como un azúcar desconocido presente en el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), un hongo patógeno que produce una toxina letal para los humanos. El mismo fue posteriormente encontrado en los capullos o pupas del escarabajo *Larinus maculata* de nombre común "trehala" lo cual inspiró al químico Berthelot para designarlo como trehalosa (Singer y Lindquist, 1998).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido; C₁₂H₂₂O₁₁; PM= 342.31) es un disacárido

no reductor formado por dos moléculas de glucosa. El enlace α,α -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa anulando su poder reductor (Paiva y Panek, 1996). Su biosíntesis fue elucidada por Leloir, quien postuló en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una vía en la que intervienen dos enzimas: la trehalosa-P-sintasa (TPS) que produce trehalosa-6-fosfato (T-6-P) a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa y la trehalosa-P-fosfatasa (TPP) que desfosforila a la T-6-P para transformarla en trehalosa (Cabib y Leloir, 1958; Figura 1): Esta vía se conoce como TPS/TPP y también se encuentra en bacterias donde se le conoce como la vía OtsA/OtsB. La misma se ha encontrado también en insectos, nemátodos y en plantas (Crowe *et al.*, 1992; Elbein *et al.*, 2003).

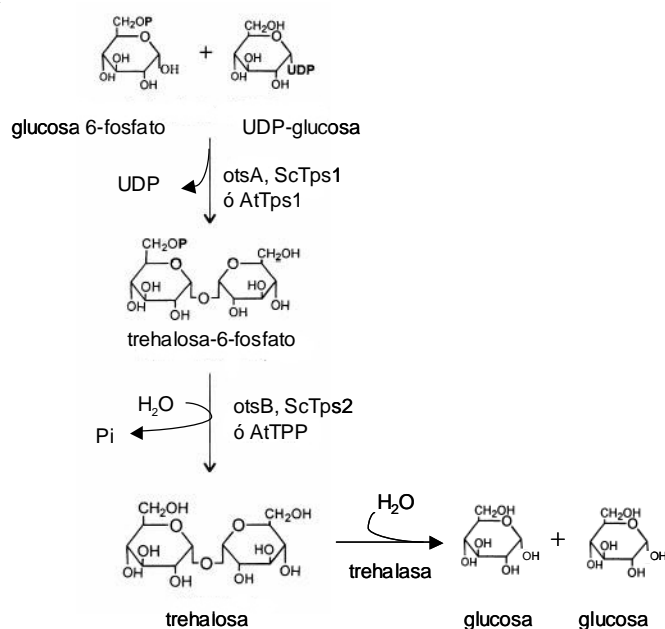


FIGURA 1. Vía TPS/TPP u OtsA/OtsB de biosíntesis de trehalosa, más frecuentemente encontrada en bacterias, hongos y plantas. Se indica también la vía de degradación por la trehalasa, que produce dos moléculas de glucosa.

Las bacterias, adicionalmente a OtsA/OtsB, han desarrollado evolutivamente otras dos vías alternas: en una de éstas, conocida como la vía TreY/TreZ (o MTS/MTH), se utilizan las maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón) como sustrato, modificándose un enlace terminal $\alpha(1-4)$ en el extremo no reductor a un enlace $\alpha(1-1)$ a través de una trans glicosilación, originando una unidad trehalosil terminal. En un segundo paso, mediante hidrólisis se libera una molécula de trehalosa. Las enzimas involucradas en esta vía son la malto-oligosil trehalosa sintasa (MTS) y la malto-oligosil trehalosa hidrolasa (MTH) (Maruta *et al.*, 1996).

En la otra vía (vía TreS o GT), el sustrato es el azúcar maltosa, en el cual, el enlace $\alpha(1-4)$ es modificado $\alpha(1-1)$ por la glicosil transferasa (GT) (Tsusaki *et al.*, 1996).

La degradación de la trehalosa se lleva a cabo en levaduras, bacterias, plantas y animales, por la trehalasa, que origina dos moléculas de glucosa (Figura 1). En animales superiores y humanos no se ha detectado actividad enzimática TPS ni TPP, aunque sí hay una trehalasa, cuyo ARN mensajero se ha detectado en intestino delgado y en riñón.

Es común encontrar a la trehalosa en bacterias y hongos en ciertas etapas de su desarrollo y en cantidades considerables en organismos anhidrobiontes o criptobiontes, como el tardigrado *Echiniscus blumi*, *Artemia salina*, la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla*, así como en las angiospermas *Myrothamus flabellifolius* y *Sporobolus atrovirens* (Crowe *et al.*, 1992; Iturriaga *et al.*, 2000). Estos organismos tienen en común la propiedad de

sobrevivir en estado de casi total desecación, siendo capaces de soportar condiciones extremas de altas o bajas temperaturas, salinidad y radiación, para recuperar sus funciones vitales tan pronto como se re-hidratán de nuevo (Crowe *et al.*, 1992).

Se ha identificado a la trehalosa en casi todos los insectos, principalmente en la hemolinfa y se han acumulado evidencias que indican su presencia en plantas angiospermas como tabaco y arroz, lo cual hace suponer que se encuentra presente en todas las plantas superiores.

Originalmente la biosíntesis de trehalosa había estado relacionada solamente con organismos anhidrobiontes, sin embargo, gracias a la disponibilidad de secuencias de ADN y proteínas depositadas en el GenBank, ha sido posible identificar genes de biosíntesis de trehalosa en diferentes especies de bacterias, arqueobacterias, hongos, insectos y plantas (Figura 2). La distribución de éstos en el árbol de la vida muestra que se encuentran en prácticamente todos los phyla, lo que indica que la biosíntesis de trehalosa es una característica que ha ocurrido en la naturaleza desde hace mucho tiempo, probablemente desde el origen mismo de la vida (Figura 2). Es frecuente encontrar organismos que tienen más de una vía de biosíntesis de trehalosa, lo que resalta la importancia que podría tener la misma para estas especies y su posible adecuación a la disponibilidad de sustratos para la producción del disacárido. La amplia distribución de las vías de biosíntesis y degradación de

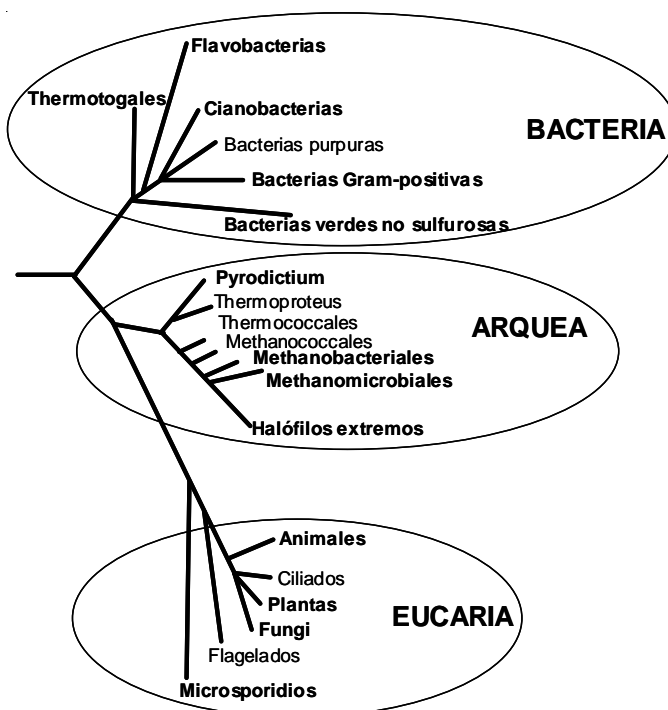


FIGURA 2. La biosíntesis de trehalosa se realiza en organismos muy distantes en la historia evolutiva. Los phyla que son resaltados con letras negras agrupan organismos que tienen al menos una de las tres vías de biosíntesis de trehalosa.

trehalosa en los tres superdominios (Bacteria, Arquea y Eucaria) sugiere además que la misma ha sido una molécula utilizada en la naturaleza de manera muy versátil.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA TREHALOSA.

Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa explican por sí solas las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica de este azúcar. Se ha demostrado que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Crowe *et al.*, 1984; Colaco *et al.*, 1992). La trehalosa posee una gran estabilidad bajo condiciones extremas, derivado de que el enlace glicosídico posee una energía de $4.184 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, en comparación con la sacarosa, donde el mismo tiene una energía de $113 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Schiraldi *et al.*, 2002).

Las proteínas mantienen mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de trehalosa, ya que ésta reemplaza al agua formando una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su actividad (Lins *et al.*, 2004; Figura 3a). La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar (Elbein *et al.*, 2003). Adicionalmente, el hecho que la trehalosa sea un azúcar no reductor, a diferencia de la sacarosa, previene la reacción de Maillard en la cual los grupos aldehído de los azúcares reducen a los grupos amino de los residuos de las proteínas, produciendo así el típico color café asociado a la degradación de las proteínas, reacción que se acelera a mayores temperaturas (Elbein *et al.*, 2003; Paiva y Panek, 1996).

La capacidad de la trehalosa para proteger a las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984). Las evidencias sugieren que la trehalosa retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido. La trehalosa funciona en este sentido incluso mejor que la sacarosa ya que encaja entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus hidroxilos (Crowe *et al.*, 2001; Weisburd, 1988; Figura 3b).

USOS BIOTECNOLÓGICOS DE LA TREHALOSA

Las propiedades de la trehalosa la han vuelto un apreciado producto biotecnológico, con diversas aplicaciones, algunas de las cuales se han desarrollado

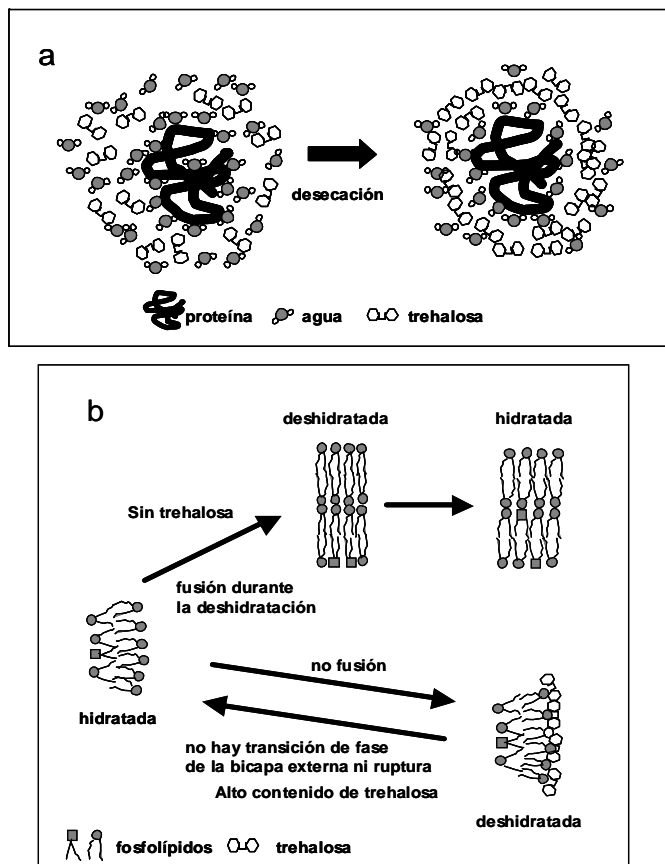


FIGURA 3. a) Osmoprotección de proteínas por la trehalosa: al disminuir el agua, se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible que así queda en contacto con la proteína. En la vecindad de la proteína, se incrementan los puentes de H entre trehalosa-agua y trehalosa-trehalosa. b) Las membranas biológicas son protegidas por la trehalosa durante la desecación evitando su fusión, cambio de fase y rompimiento (adaptado de Lins *et al.*, 2004 y Weisburd, 1988).

hasta el nivel comercial (Paiva y Panek, 1996; Richards *et al.*, 2002; Schiraldi *et al.*, 2002). El uso masivo de este azúcar como preservador o protector, como aditivo, como estabilizador y como sustituto de sacarosa se ha incrementado enormemente a partir de que la Compañía Japonesa Hayashibara desarrolló un procedimiento de producción enzimática basado en el uso del almidón como sustrato, empleando las enzimas malto-oligosil trehalosa sintasa (MTS) y la malto-oligosil trehalosa hidrolasa provenientes de la bacteria del suelo *Arthobacter ramosus* (Richards *et al.*, 2002). El otro proceso de producción de trehalosa se hace en levadura, con las enzimas de la vía TPS/TPP, siendo su rendimiento mucho menor. El costo de producción con el método de Hayashibara bajó desde 700 dólares a 5-6 dólares por kilo con al menos 98 % de pureza y apto para el consumo humano y otros usos industriales (Schiraldi *et al.*, 2002). El grado de dulzura de la trehalosa es de 45 comparado en una escala en la que sacarosa tiene 100 puntos, la fructosa 173 y la glucosa 74 (Richards *et al.*, 2002). Desde 1995 en Japón se aprobó el uso de la trehalo-

sa como aditivo en alimentos de consumo humano, encontrándose actualmente presente en cientos de productos. A continuación se enlistan los usos más comunes y prometedores del azúcar trehalosa: 1) Protector de la actividad enzimática: Se puede utilizar para mantener a temperatura ambiente enzimas termolábiles como ADN polimerasa, enzimas de restricción y ADN ligasa (Colaco *et al.*, 1992). 2) Estabilizador y protector de moléculas complejas: Moléculas biológicas inestables como los anticuerpos, pueden desecarse a temperatura ambiente o a 37 °C, manteniendo su actividad después de varios años de almacenaje (Roser y Colaco, 1993). Sustitutos de sangre y hemoglobina se han conservado como liposomas y desecado en frío manteniendo gran parte de su actividad aún después de años de almacenaje a temperatura ambiente, lo cual promete abaratar enormemente los costos de almacenaje en nitrógeno líquido y traslado (Weisburd, 1988; Brumfiel, 2004). 3) Aditivo de diversos alimentos: Se puede emplear en alimentos desecados o procesados como frutos y legumbres que mantienen mucho mejor sus aromas y propiedades organolépticas. Recientemente la empresa Cargill ha promovido el uso de este azúcar en lugar de otros aditivos en cortes de carne y embutidos, para mantener por más tiempo sus propiedades y sabor (Kidd y Devorak, 1994). 4) Sustituto de azúcar: Puede emplearse en panadería y en confitería, en combinación con la sacarosa, compensando la reducción en dulzor con la mejor conservación de las propiedades de la masa horneada, sobre todo en repostería que debe mantenerse en congelación. Se ha demostrado que el organismo humano tolera hasta 50 g diarios sin causar problemas digestivos (Richards *et al.*, 2002). 5) Preservador de células, tejidos y órganos: Células, tejidos e incluso órganos se pueden mantener desecados o congelados en presencia de trehalosa, lo cual mejora su supervivencia en comparación con otras sustancias (Eroglu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). El principal obstáculo para ampliar su uso con estos fines ha sido el de lograr introducir con mayor eficiencia al disacárido dentro de las células y tejidos (Crowe *et al.*, 2001). 6) Osmoprotector de plantas ornamentales: De 50 a 100 mM de trehalosa en solución acuosa en el florero prolonga la vida después del corte de tulipanes y gladiolos, ya que contribuye a retardar la senescencia debida a la pérdida de agua por transpiración (Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Otusbo y Iwaya-Inoue, 2000). Es predecible que plantas ornamentales que acumulen trehalosa endógena mostrarán una mayor duración después del corte que cuando se adiciona al florero, por lo cual será importante obtener plantas transgénicas con este fin. 7) Osmoprotector en plantas transgénicas: La producción de plantas transgénicas que acumulan trehalosa ha permitido incrementar la tolerancia de las mismas a la sequía, la salinidad y el frío (Garg *et al.*, 2002; Avonce *et al.*, 2004). 8) Marcador de selección en la producción de plantas transgénicas: El gen *AtTPS1* de *A. thaliana* que codifica la enzima TPS1, cuando se sobre expresa en esta planta, es capaz de conferir insensibilidad a la glucosa en semillas y tejidos bajo cultivo *in vitro* que de otra forma se ven inhibidos por este monosacárido para germinar, proliferar y diferenciarse (Avonce *et al.*, 2004;

Leyman *et al.*, 2004). Esto abre las posibilidades de poder usar este gen como un gen de selección durante el proceso de transformación genética, utilizando como medio selectivo a la glucosa (Leyman *et al.*, 2004). 9) Uso en industria de cosméticos: La trehalosa atrapa y reduce la liberación de malos olores de la piel en humanos hasta en un 70 %, lo cual hace que sea factible adicionarla en cremas faciales o corporales o en desodorantes (Higashiyama, 2002). 10) Usos médicos y nutricéuticos: Se está explorando el papel de la trehalosa en la disminución de los síntomas de enfermedades como la Corea de Huntington y en la osteoporosis. En el primer caso, la trehalosa evitaría la formación de agregados proteínicos poli glutamínicos en el cerebro (Katsuno *et al.*, 2004), mientras que en el segundo estudio, el consumo de trehalosa redujo la degeneración de los huesos en modelos de ratones hembra en los que se eliminaron los ovarios, aunque no se conoce con detalle el mecanismo implicado (Higashiyama, 2002).

TREHALOSA, LEVADURAS Y PLANTAS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bioinformática ayudaron a determinar la presencia de biosíntesis de trehalosa en las plantas

Hasta hace pocos años, se pensaba que las plantas superiores carecían de trehalosa salvo *Myrothamnus flabellifolius* y algunos pastos nativos de México como *Sporobolus atrovirens* (Iturriaga *et al.*, 2000), dado que no se había logrado detectarla en éstas mediante métodos tan sensibles como el HPLC. Esto cambió a raíz de que se reportó en la base de datos del GenBank, al gen y la proteína AtTPS1 de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, cuya secuencia mostró una alta homología con la TPS1 de la levadura y con OtsA de *Escherichia coli*. Posteriormente, se reportó que AtTPS1 era capaz de complementar la actividad catalítica en la mutante *tps1D* de la levadura (Blázquez *et al.*, 1998).

La planta de resurrección *Selaginella lepydophylla* posee sorprendentes propiedades anhidrobióticas, asociadas a su capacidad para acumular grandes cantidades de trehalosa, lo cual hizo suponer que de esta planta podrían aislarse los genes involucrados en la biosíntesis de este azúcar. A partir de una genoteca de ADNc, se pudo aislar una clona que mostró una alta homología con las proteínas OtsA y ScTPS1, de *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente (Zentella *et al.*, 1999). Sobre todo, el alto porcentaje de identidad con ScTPS1 sugirió que podría explotarse el modelo de la levadura *S. cerevisiae* para caracterizar bioquímica y molecularmente a este gen y su proteína. La levadura posee también la ventaja de ser el organismo en el cual se ha estudiado con mayor profundidad la bioquímica, metabolismo, biología molecular y fisiología de la trehalosa (Thevelein y Hohmann, 1995). Una vez clonando al gen *SITPS1* en un vector de expresión adecuado para la levadura (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996),

se probó si podía complementarse la mutante *tps1D* y la doble mutante *tps1D/tps2D*, que han perdido su capacidad para biosintetizar trehalosa, así como para crecer en un medio con glucosa como fuente de carbono. Se pudo demostrar que la versión de TPS1 codificada por *SITPS1* restauraba la habilidad de la levadura para sintetizar trehalosa, corrigiéndose con esto otros defectos asociados a esta carencia, como la capacidad de crecer en glucosa, recuperando además la tolerancia a las altas temperaturas y al estrés osmótico (Zentella *et al.*, 1999; Figura 4). La levadura también ayudó a descubrir algunas otras particularidades de los genes y las proteínas TPS de las plantas, mismas que serán comentadas más adelante.

Para 2001 ya estaba completa la secuencia del genoma de *A. thaliana*, así que fue posible hacer una búsqueda sistemática de homólogos de TPS, encontrándose una familia multigénica de un total de 11 genes que se dividieron en clase I y clase II (Leyman *et al.*, 2001). La clase I posee un dominio catalítico con alta homología con OtsA de *E. coli* y con ScTPS1 de *S. cerevisiae*; mientras que en la clase II las proteínas tienen una región amino con menor homología a la TPS1 de los microorganismos mencionados, pero en cambio contienen un dominio carboxilo con una mayor homología a OtsB y ScTPS2 (Leyman *et al.*, 2001). Hasta ahora se ha demostrado experimentalmente que de las 11 proteínas, sólo AtTPS1 posee actividad catalítica similar a OtsA y ScTPS1. Respecto a los homólogos TPP

(OtsB en *E. coli*), en *Arabidopsis* se ha identificado una familia multigénica de 10 elementos, de los cuales sólo se ha demostrado actividad catalítica para AtTPPA y AtTPPB con base en la complementación de la mutante *tps2Δ* de la levadura (Voguel *et al.*, 1998; Schluepmann *et al.*, 2004). Estos análisis de las secuencias de *Arabidopsis* y su comparación con los homólogos de *E. coli* han sugerido la posible existencia en plantas de una enzima bifuncional con actividades TPS y TPP (Figura 5).

Mediante ingeniería genética y con la ayuda de la levadura, se puede mejorar la estructura y la función de las proteínas TPS y TPP

En las TPSs de plantas, como AtTPS1 y SITPS1 de *Arabidopsis* y *S. lepidophylla*, además del dominio TPS, destacan otros dos dominios: una región amino de alrededor de 100 aminoácidos, y otra en el extremo carboxilo de mayores dimensiones que muestra cierta homología con TPP (Figura 5). Para elucidar el posible significado de los dominios amino y carboxilo de las TPS de plantas, se obtuvieron distintas variantes recortadas de los genes y las proteínas SITPS1 y de AtTPS1, determinándose que podían eliminarse tanto el extremo amino como el carboxilo y sin embargo, se mantenía la actividad catalítica de la proteína prácticamente al mismo nivel de la enzima nativa al ensayarse en el sistema heterólogo de la levadura. Fue sorprendente encontrar que la eliminación del extremo amino tanto en SITPS1 como en AtTPS1, incrementó la capacidad de biosíntesis de ambas proteínas, a juzgar por su actividad enzimática y por la capacidad de biosintetizar T-6-P, al expresarse en el mismo sistema de la levadura. También se incrementó el contenido de trehalosa, atribuible a la actividad endógena de TPP (Van Dijck *et al.*, 2002).

Hace algunos años, cuando se comparó la secuencia de las proteínas AtTPS1 de *Arabidopsis* y SITPS1 de *Selaginella* con las correspondientes de *E. coli* y de levadura, se pensó que probablemente las plantas poseían algún tipo de proteína TPS/TPP bifuncional, conclusión a la cual no es difícil arribar si se compara la estructura de esta familia de proteínas (Figura 5). De ser así, podría intentarse hacer plantas transgénicas que acumularan trehalosa, utilizando un solo gen y no dos. Al menos para SITPS1 y AtTPS1 éste no ha sido el caso, ya que se ha demostrado que solo poseen actividad sintasa (Zentella *et al.*, 1999; Van Dijck *et al.*, 2002). Confirma esta conclusión, la ausencia en SITPS1 y AtTPS1 de dos cortas secuencias de aminoácidos asociadas a la función de fosfohidrolasa, mismas que sí están en las proteínas ATPPA-B, ScTPS2, OtsB y en AtTPS5-AtTPS11 (Leyman *et al.*, 2001. Figura 5). El diseño natural de estas proteínas aparentemente bifuncionales, sugirió sin embargo, la obtención de este tipo de quimeras moleculares mediante ingeniería genética. Un grupo de investigación logró fusionar traduccionalmente OtsA y OtsB de *E. coli* para obtener una nueva enzima bifuncional capaz de producir trehalosa en arroz, sin acumular significativamente T-6-P (Seo *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003).

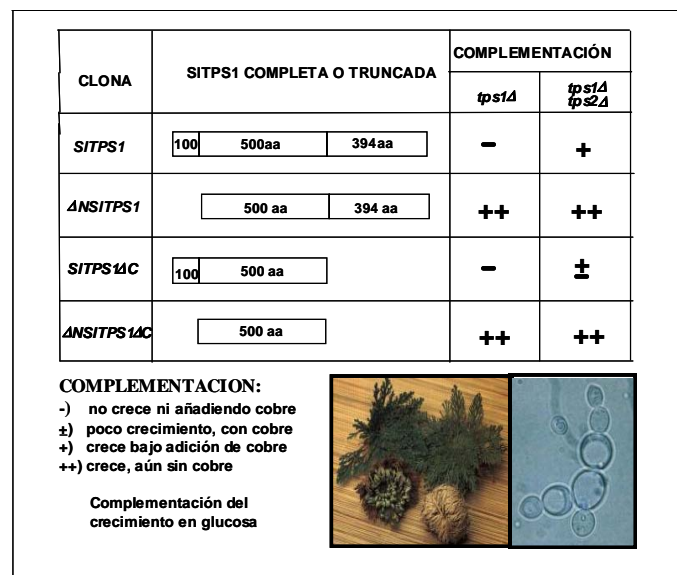


FIGURA 4. Experimentos de complementación de las mutantes *tps1D* y *tps1D/tps2D* de la levadura con la proteína completa o truncada de *Selaginella lepidophylla*. Las proteínas se expresaron en la levadura clonando las diferentes versiones del gen *SITPS1* en el vector de expresión pSAL4, que lleva el promotor *CUP1* el cual es inducible por cobre. Nótese que al eliminar el extremo amino, la complementación fue mejor, incluso aunque se elimine también el extremo carboxilo. En la parte inferior de la figura, se muestran la planta de resurrección seca e hidratada y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

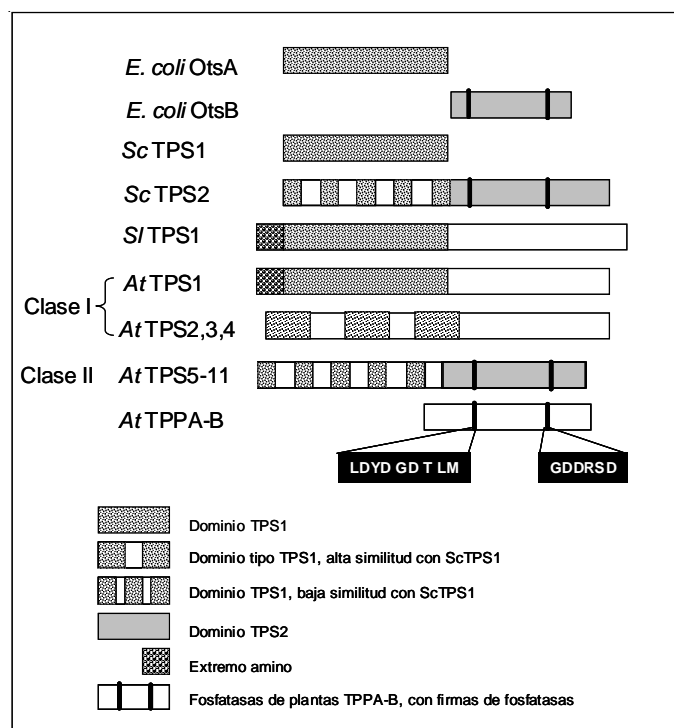


FIGURA 5. Comparación de las estructuras de las proteínas TPS y TPP de biosíntesis de trehalosa de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At) y *Selaginella lepidophylla* (Sl) (adaptado de Leyman *et al.*, 2001).

Recientemente, también se obtuvo otra enzima bifuncional, pero fusionando ScTPS1 con el dominio carboxilo de ScTPS2, ambas de la levadura del pan. La nueva proteína ScTPS1-TPS2 pudo complementar a la doble mutante *tps1D/tps2D* de levadura, restaurando en ésta la capacidad de biosintetizar trehalosa. Actualmente esta construcción se está probando en líneas transgénicas de *Arabidopsis* y en algunos cultivos de importancia agronómica. Esto ha sido un avance biotecnológico considerable, ya que desde que se tuvo la idea de obtener plantas sobre-productoras de trehalosa utilizando genes *TPS*, hubo fuertes sospechas que el fenotipo altamente pleiotrópico obtenido al generar plantas transgénicas sólo con *otsA* o *ScTPS1* podría deberse a la acumulación de T-6-P. Este intermediario, al que recientemente se le ha encontrado involucrado en la regulación de la glicólisis y en el desarrollo del embrión, también puede alterar negativamente el metabolismo y el desarrollo de las plantas si se acumula en exceso (Eastmond *et al.*, 2002; Eastmond *et al.*, 2003; Schluepmann *et al.*, 2003).

FUNCIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA EN LAS PLANTAS

TPS1 es esencial para el desarrollo del embrión y la floración

Hasta hace pocos años, el conocimiento que se tenía sobre el metabolismo de la trehalosa provenía de la

levadura *S. cerevisiae* y otros hongos, así como de algunas bacterias como *E. coli*. En la levadura, el papel de este disacárido es la protección contra el estrés abiótico y como carbohidrato de reserva (Thevelein y Hohmann, 1995; de Winde *et al.*, 1997).

El azúcar trehalosa se acumula en cantidades casi indetectables en *Arabidopsis* y, para revelar su presencia en plantas transgénicas de tabaco que sobre expresan los genes *otsA* y *otsB*, se debe aplicar la droga validomicina A (Val A), que inhibe a la trehalasa. Bajo adición de Val A, se acumuló más trehalosa (hasta 0.6 mg·g⁻¹ de peso fresco) en flores y en raíces. Sin embargo, la distribución de otros carbohidratos como almidón y sacarosa también se vio alterada, por lo cual no pueden descartarse posibles efectos sobre otras enzimas, o en la distribución de los carbohidratos en la planta (Muller *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la trehalosa proporcionada exógenamente, como fuente de carbono, inhibe el crecimiento debido a que influye fuertemente en la distribución de carbohidratos en raíz y parte aérea de *Arabidopsis* que acumula almidón en las hojas. Esto se debe a que se induce el gen *ApL3* que codifica la subunidad grande de la enzima ADP-glucosa fosforilasa, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de almidón (Wingler *et al.*, 2000).

En realidad, la inhibición en el crecimiento no es provocada por la trehalosa en sí, sino por el intermediario trehalosa-6-fosfato: la adición de trehalosa induce la acumulación del intermediario y éste a su vez ejerce profundos efectos en el crecimiento mediante la relocalización de carbohidratos de reserva como el almidón (Schluepmann *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis* se produjo una mutante recesiva *tps1-1* que en condición homocigota resultó ser letal al desarrollo del embrión. El desarrollo embrionario pudo ser parcialmente rescatado *in vitro* reduciendo el suministro de sacarosa, no así al proporcionar trehalosa o T-6-P (Eastmond *et al.*, 2002). La mutante *tps1Δ0* de levadura es incapaz de crecer en glucosa pero puede rescatarse creciéndose en un azúcar poco fermentable como galactosa. La disminución en la actividad de hexocinasa 2 (HXK2), mediante mutación también permite el crecimiento de la mutante *tps1D*. La principal función de la HXK2 es fosforilar a la glucosa para permitir su entrada en glicólisis. En la levadura se ha demostrado que T-6-P inhibe la actividad de la HXK2, y es posible que este metabolito regule la glicólisis modulando el flujo de azúcares fosforilados hacia esta vía (Thevelein y Hohmann, 1995). No obstante lo anterior, la mutante *tps1-1* de *Arabidopsis* no pudo ser rescatada utilizando una línea antisentido *AtHXK2*, pero sí disminuyendo la sacarosa o bien mediante complementación con el gen *otsA* de *E. coli* (Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003).

La actividad catalítica de AtTPS1 también es esencial para que *Arabidopsis* transite del estado vegetativo a la

floración. Mientras que la mutante *tps1* fue incapaz de desarrollar yemas florales, la misma línea re-transformada con *otsA*, bajo el control de un promotor inducible por dexametasona, pudo continuar su desarrollo casi tan normal como la línea silvestre (van Dijken *et al.*, 2004).

Percepción de azúcares, fotosíntesis y estrés

Se mencionó antes que en la levadura, tanto la enzima HXK2 como el intermediario T-6-P participan en la percepción de la glucosa y la entrada de azúcares en glicólisis.

El hecho de que tanto HXK1 como AtTPS1 en *Arabidopsis* podrían estar involucradas en una vía de transducción celular encargada de la percepción de glucosa, provienen de recientes experimentos, en los que se demostró que la sobre expresión de AtTPS1 produjo insensibilidad tanto a glucosa como a ácido abscísico (ABA) en plántulas germinando en medio MS (Avonce *et al.*, 2004). En este mismo trabajo, se demostró que el gen AtTPS1 inhibe su transcripción en presencia de glucosa, pero esta inhibición es superada en un fondo genético con supresión de la actividad de HXK1, obtenido al sobre expresar el antisentido del mismo gen (Avonce *et al.*, 2004; Avonce *et al.*, 2005). Previamente se había encontrado que la sobre expresión de *otsA* de *E. coli* en *Arabidopsis* no fue capaz de contrarrestar la inhibición ejercida por glucosa (Schluepmann *et al.*, 2003). Esta aparente contradicción se explica si se compara OtsA con AtTPS1: esta última proteína posee un extremo amino y uno carboxilo, adicional al dominio catalítico que es equivalente a OtsA (Figura 5). Al menos el extremo amino (de un poco menos de 100 aminoácidos) podría ejercer alguna función regulatoria, ya que cuando se elimina, la actividad enzimática de AtTPS1 se incrementa hasta 40 veces (van Dijck *et al.*, 2002). Esto ha llevado a proponer que adicionalmente a los efectos regulatorios del intermediario T-6-P y su efecto en glicólisis, la proteína AtTPS1 y en particular su dominio amino debe de jugar un papel en una o varias vías de transducción de la percepción de glucosa y de ABA. AtTPS1 estaría regulando negativamente la transcripción de ABI4 en una cascada de señalización que tiene que ver con la germinación, el desarrollo de la parte aérea y la expansión y desarrollo normal de los cotiledones, promoviendo el desarrollo temprano de la plántula (Avonce *et al.*, 2004; Avonce *et al.*, 2005).

Otra línea de investigación del papel de la trehalosa en las plantas es el papel que este azúcar juega en la fotosíntesis. Durante muchos años se ha pretendido manipular este proceso clave en la productividad de las plantas. Plantas de tabaco transformadas con *otsA* que codifica la versión bacteriana de TPS1, mostraron un incremento en la tasa fotosintética de hasta un tercio por unidad de área bajo saturación luminosa. Al contrario, al expresar *otsB* que codifica TPP, la fotosíntesis disminuyó en la misma proporción (Paul *et al.*, 2001). Para explicar este efecto, se ha postulado que, al igual que en la levadura, es posible

que el intermediario T-6-P interactúe con la hexocinasa, modificando su habilidad para percibir el contenido endógeno de glucosa. En plantas que sobre expresan TPS y por lo tanto con un mayor presencia de T-6-P, esto se percibe como un déficit de carbono a través de la hexocinasa y lo contrario ocurre cuando desaparece T-6-P en plantas que sobre expresan TPP. Esto aumenta o disminuye la fotosíntesis a través de un mecanismo hasta ahora desconocido pero que al igual que en la levadura podría pasar por la regulación de la glicólisis (Paul *et al.*, 2001; Paul y Pellny, 2003).

Los primeros intentos por obtener plantas transgénicas que sobre produjeran trehalosa se hicieron utilizando los genes *otsA* de *E. coli* y *ScTPS1* de levadura. Se buscaba obtener plantas que acumulasen este azúcar y que por lo tanto mostraran una mayor tolerancia a la sequía (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

Se han generado plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre expresan el gen AtTPS1, mismo que es capaz de complementar a la mutante *tps1D* de *S. cerevisiae* (van Dijck *et al.*, 2002; Zentella *et al.*, 1999). Para analizar los efectos de la sobre expresión en la tolerancia al estrés por sequía, se crecieron plantas durante 4 semanas en condiciones normales de cultivo, y posteriormente se sometieron a un régimen sin riego por dos semanas. Los resultados mostraron que tanto las plantas transgénicas como las plantas control perdieron cerca del 90 % de agua (Avonce *et al.*, 2004), sin embargo, al adicionar nuevamente agua las plantas sobre expresantes de AtTPS1 fueron capaces de rehidratarse y continuar su ciclo de vida normal hasta la floración y producción de semillas fértiles, mientras que las plantas silvestres murieron por deshidratación (Figura 6). La cantidad de trehalosa acumulada en las plantas transgénicas no fue suficientemente alta como para explicar esta tolerancia, sin embargo se detectaron cambios en la expresión de genes importantes en la señalización y respuesta a estrés, lo que explicaría este fenotipo (Avonce *et al.*, 2004). Contrario a lo observado en otras plantas sobre expresantes de genes *TPS* de *E. coli* y *S. cerevisiae*, la sobre expresión de AtTPS1 no produjo ningún efecto aberrante en *Arabidopsis*, con excepción que la floración se retrasó una semana. Esto se atribuye a que la estructura de AtTPS1 es diferente a OtsA y ScTPS1, y probablemente interaccionen diferencialmente con miembros de las vías de señalización de tal forma que los niveles de T-6-P se regulan este caso eficientemente, suprimiéndose los efectos pleiotrópicos observados en otros casos (Avonce *et al.*, 2005).

También en tabaco transformado con *ScTPS1* ocurrió un ligero incremento en la tolerancia al estrés osmótico que se relacionó con un leve incremento en el contenido de trehalosa, pero en este caso hubo una gama de efectos

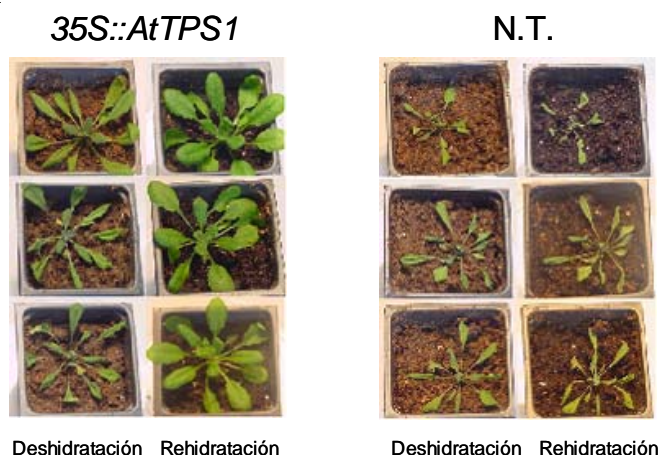


FIGURA 6. Efecto de la sobre-expresión de *AtTPS1* en la tolerancia a sequía en *Arabidopsis*. Plantas de 4 semanas se sometieron a deshidratación durante 14 días (deshidratación). Después de 24 horas de la adición de agua (rehidratación), las plantas transgénicas continuaron con su ciclo de vida normal, mientras que las plantas silvestres murieron. 35S::AtTPS1, líneas transgénicas; N.T., plantas de *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia no transformadas.

pleiotrópicos como plantas de baja estatura, hojas lanceoladas y menor contenido de sacarosa. Se sospechó entonces que el efecto podría deberse a la acumulación del intermediario T-6-P, más que a la trehalosa misma. Esta hipótesis resultó ser correcta (más arriba se mencionó con detalle los posibles efectos del intermediario T-6-P), ya que al utilizar una fusión traduccional OtsA-OtsB para transformar arroz, se obtuvieron plantas tolerantes a sequía, salinidad y frío. A diferencia de las primeras plantas transgénicas obtenidas sólo con el gen *TPS1*, al emplear las secuencias codificantes de las dos enzimas se pudo incrementar la trehalosa endógena, sin acumulación del intermediario T-6-P (Garg *et al.*, 2002). En este caso, la mayor tolerancia al estrés se atribuye a las propiedades osmoprotectoras de la trehalosa que aíslan del daño al aparato fotosintético, a otras enzimas clave y a las membranas, ya que el balance hídrico no se ve mayormente alterado por el mayor contenido de trehalosa, (Garg *et al.*, 2002; Romero *et al.* 1997). Estos datos apoyan el papel de este disacárido como osmoprotector de proteínas y membranas.

LA TREHALOSA EN LAS INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

Desde hace algunos años se conoce la presencia de la trehalosa en algunos tipos de interacciones de tipo simbiótico o patógena. Se ha detectado trehalosa en ecto micorrizas y endo micorrizas (Muller *et al.*, 1995). También se ha encontrado trehalosa en los nódulos de leguminosas, asignándose un 70 % de ésta a los bacteroides y un 30 % a los tejidos de la planta. Se pensaba en ese entonces que como las plantas no sintetizaban trehalosa, ésta provenía

de la biosíntesis de las bacterias, lo cual, a la luz de los hallazgos más recientes, podría ser no tan cierto. En los nódulos se ha detectado actividad de la trehalasa, fuera de los bacteroides, por lo cual se considera a esta enzima como una nodulina que se induce por efecto de la trehalosa (Streeter, 1982; Muller *et al.*, 1995; Goddijn y van Dun, 1999). No se sabe cual es el papel de la trehalosa en los nódulos, aunque se ha demostrado que ayuda a que se lleve a cabo la simbiosis sobre todo bajo condiciones de sequía (Fariás-Rodríguez *et al.*, 1998).

En otro tipo de interacciones de tipo patológico, se ha reportado que en *A. thaliana*, la infección por *Plasmidophora brassicae* que produce la agalla de la raíz, estuvo acompañada por la acumulación de trehalosa del hongo y por la inducción del gen y la actividad de la trehalasa de la planta (Brodmann *et al.*, 2002). Parece ser que la trehalosa es indispensable para el proceso de la infección, ya que al interrumpir de manera dirigida la secuencia del gen *TPS1* de *Magnaporthe grisea*, agente causal de la roya del arroz, la mutante mostró una drástica disminución de la patogenicidad y una pobre esporulación (Foster *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que al suprimir la biosíntesis de trehalosa mutando al gen *TPS1* en *Candida albicans*, causante de candidiasis en animales e individuos inmuno deprimidos, se reduce drásticamente la infección y se altera el desarrollo del patógeno (Zaragoza *et al.*, 1998). En animales superiores las enzimas TPS y TPP constituyen blancos terapéuticos, ya que no están presentes en el hospedante, lo cual abre un flanco de posible control de diferentes enfermedades causadas por hongos y por bacterias, empleando inhibidores específicos para estas proteínas. Prácticamente todos los hongos y bacterias que se han estudiado poseen vías de biosíntesis de trehalosa y cada vez hay mayores evidencias de que el metabolismo de este azúcar podría jugar un papel importante en las interacciones planta-microorganismo.

PERSPECTIVAS

El descubrimiento de la ampliamente distribuida capacidad para biosintetizar trehalosa en el reino vegetal es uno de los hallazgos más recientes en la biología de las plantas. Se ha encontrado que la trehalosa, el intermediario T-6-P y la proteína TPS1 están involucrados en procesos tan importantes como el desarrollo embrionario, la floración, la percepción de azúcares, la fotosíntesis, la tolerancia al estrés abiótico y las interacciones planta-microorganismo. Además de haberse revelado su importancia en tales procesos, ahora hay muchas preguntas adicionales, ya que en la planta modelo *Arabidopsis* sólo se ha estudiado a AtTPS1 y en menor medida AtTPPA y AtTPPB, restando por averiguar la función de al menos otros 10 genes *TPS1* y 8 *TPP*. Desde hace algunos años este se ha convertido en uno de los campos de investigación más activos en la fisiología y biología molecular de las plantas.

Después de varios años de investigación, se ha logrado manipular el contenido endógeno de trehalosa en las plantas sin los efectos pleiotrópicos indeseables que presentaban las primeras plantas modificadas. Esto ofrece posibilidades de obtener plantas transgénicas de diversos cultivos con tolerancia a sequía, salinidad, frío y calor. También es probable que pronto se pueda manipular la fotosíntesis y la distribución de los carbohidratos manipulando el metabolismo de la trehalosa. En el caso de especies frutales, hortalizas y plantas ornamentales, será interesante demostrar, si como se espera, se podrá mejorar la conservación postcosecha de tejidos y órganos que acumulen trehalosa endógena mediante la manipulación genética. Un campo interesante será también el de desarrollar técnicas para la conservación de semillas naturales y artificiales, tejidos y órganos vegetativos a temperatura ambiente y en presencia de trehalosa, como ya se ha comenzado a experimentar con tejidos y órganos animales, lo cual tendría amplias aplicaciones en la conservación de los recursos genéticos vegetales a costos menores al abatirse los altos costos de refrigeración.

Es posible también que al entender el papel del metabolismo de la trehalosa en las interacciones planta-microorganismo se podrán desarrollar nuevas estrategias para el control de enfermedades causadas por hongos y bacterias tanto en animales como en plantas.

LITERATURA CITADA

- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO, J. O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; ITURRIAGA, G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- AVONCE, N.; LEYMAN, B.; THEVELEIN, J.; ITURRIAGA, G. 2005. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Bioch. Soc. Trans.* 33: 276-279.
- BLÁZQUEZ, M. A.; SANTOS, E.; LISSET-FLORES, C.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.; SAINAS, J.; GANCEDO, C. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
- BRODMANN, D.; SCHULLER, A.; LUDWIG-MULLER, J.; AESCHBACHER, R. A.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; WINGLER, A. 2002. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with trehalose-producing pathogen *Plasmidiophora brassicae*. *Mol. Plant Micr. Inter.* 15: 693-700.
- BRUMFIEL, G. 2004. Just add water. *Nature* 428: 14-15.
- CABIB, E.; LOLOIR, L. 1958. The biosynthesis of trehalose-phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275.
- COLACO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M.; PINDER, S.; ROSER, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technol.* 10: 1007-1111.
- CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science* 223: 209-217.
- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; OLIVER, A. E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W.; TABLIN, F. 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105.
- CROWE, J.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- DE WINDE, J. H.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J. 1997. From feast to famine: adaptation to nutrient depletion in yeast (chapter 1), Pp. 7-52. HOHMANN, S.; MAGER, W. G. (eds.) Landes Bioscience. Georgetown, TX *In: Yeast Stress Responses*. USA.
- EASTMOND, P. J.; LI, Y.; GRAHAM, I. A. 2003. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants?. *J. Exp. Botany* 54: 533-537.
- EASTMOND, P. J.; VAN DIJCKEN, A. J. H.; SPIELMAN, M.; KERR, A.; DICKINSON, H. G.; JONES, J. D. G.; SMEEKENS, S.; GRAHAM, I. A. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29: 225-235.
- ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- EROGLU, A.; RUSSO, M. J.; BIEGANSKY, R.; FOWLER, A.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; TONER, M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 18: 163-167.
- FARIAS-RODRÍGUEZ, R.; MELLOR, R. B.; PEÑA-CABRIALES, J. J. 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plant.* 102: 353-359.
- FOSTER, A. J.; JENKINSON, J. M.; TALBOT, N. J. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.* 22: 225-235.
- GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* 99: 15898-15903.
- GODDIJN, O. J. M.; VAN DUN, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315-319.
- GUO, N.; PUHLEV, I.; BROWN, D. R.; MANSBRIDGE, J.; LEVINE, F. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol.* 18: 168-171.
- HIGASHIYAMA, T. 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* 74: 1263-1269.
- HOLMSTROM, K.-O.; MANTYLA, E.; WELIN, B.; MANDAL, A.; PALVA, E. T.; TUNNELA, O. E.; LONDESBOROUGH, J. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- ITURRIAGA, G.; GAFF, D. F.; ZENTELLA, R. 2000. New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust. J. Bot.* 48: 153-158.
- IWAYA-INOUE, M.; TAKATA, M. 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *HortScience* 36: 946-950.
- JANG, I.-C.; OH, S.-J.; SEO, J.-S.; CHOI, W.-B.; SONG, S.-I.; KIM, C. H.; KIM, Y. S.; SEO, H.-S.; CHOI, Y. D.; NAHM, B. H.; KIM, J.-K. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress toler-

- ance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- KATSUNO, M.; ADACHI, H.; SOBUE, G. 2004. Sweet relief for Huntington disease. *Nature Medicine* 10: 123-124.
- KIDD, G.; DEVORAK, J. 1994. Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Bio/technology* 12: 1328-1329.
- LEYMAN, B.; AVONCE, N.; RAMON, M.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; ITURRIAGA, G. 2004. New selection marker for plant transformation, pp. 385-396. *In: Methods in Molecular Biology* Vol. 267. Humana Press Inc. Totowa, N. J. USA.
- LEYMAN, B.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 6: 510-513.
- LINS, R. D.; PEREIRA, C. S.; HUNENBERGER, P. H. 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55: 177-186.
- MARUTA, K.; HATTORI, K.; NAKADA, T.; KUBOTA, M.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M. 1996. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter sp.* Q36. *Biochem. Biophys. Acta.* 1289: 10-13.
- MASCORRO-GALLARDO, J. O.; COVARRUBIAS, A. A.; GAXIOLA, R. A. 1996. Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172: 169-170.
- MULLER, J.; AESCHBACHER, R. A.; WINGLER, A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 2001. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1086-1093.
- MULLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 112: 1-9.
- OTSUBO, M.; IWAYA-INOUE, M. 2000. Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *HortScience* 35: 1107-1110.
- PAIVA, C. L. A.; PANEK, A. D. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 293-314.
- PAUL, M. J.; PELLNY, T. K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54: 539-547.
- PAUL, M.; PELLNY, T.; GODDIJN, O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci.* 6: 197-200.
- PILON-SMITS, E. A. H.; TERRY, N.; SEARS, T.; KIM, H.; ZAYED, A.; HWANG, S.; VAN DUN, K.; VOOGD, E.; VERWOERD, T. C.; KRUTWAGEN, R. W. H. H.; GODDIJN, O. J. M. 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152: 525-532.
- RICHARDS, A. B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L. B.; SCHMID, H.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WAALKENS-BERENDSEN, D. H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food. Chem. Toxicol.* 40: 871-898.
- ROMERO, C.; BELLÉS, J. M.; VAYÁ, J. L.; SERRANO, R.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F. A. 1997. Expression of the yeast trehalose 6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.
- ROSER, B.; COLACO, C. 1993. A sweeter way to fresher food. *New Scientist* 138: 25-28.
- SCHIRALDI, C.; DI LERNIA, I.; DE ROSA, M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 20: 420-425.
- SCHLUEPMANN, H.; PELLNY, T.; VAN DIJCK, A.; SMEEKENS, S.; PAUL, M. 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100: 6849-6854.
- SCHLUEPMANN, H.; VAN DIJCK, A.; AGHDASI, M.; WOBBS, B.; PAUL, M.; SMEEKENS, S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* 135: 879-890.
- SEO, H. S.; KOO, Y. J.; LIM, J. Y.; SONG, J. T.; KIM, C. H.; KIM, J. K.; LEE, J. S.; CHOI, Y. D. 2000. Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 2484-2490.
- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *TIBTECH* 16: 460-468.
- STREETER, J. 1982. Enzymes of sucrose, maltose and a, a-trehalose catabolism in soybean root nodules. *Planta* 155: 112-115.
- THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *TIBS* 20: 3-10.
- TSUSAKI, K.; NISHIMOTO, T.; NAKADA, T.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M. 1996. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter sp.* R48. *Biochem. Biophys. Acta.* 1290: 1-3.
- VAN DIJCK, P.; MASCORRO-GALLARDO, J. O.; DE BUS, M.; ROYACKERS, K.; ITURRIAGA, G.; THEVELEIN, J. M. 2002. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphatase synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem. J.* 366: 63-71.
- VAN DIJCK, A. J. H.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S. C. M. 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.* 135: 969-977.
- VOGEL, G.; AESCHBACHER, R. A.; MULLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J.* 13: 673-683.
- WEISBURD, S. 1988. Death-defying dehydration. *Science News* 133: 107-110.
- WINGLER, A.; FRITZLIUS, T.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; AESBACHER, R. A. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *Apl3* and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 105-114.
- ZARAGOZA, O.; BLÁZQUEZ, M. A.; GANCEDO, C. 1998. Disruption of the *Candida albicans TPS1* gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *J. Bacteriol.* 180: 3809-3815.
- ZENTELLA, R.; MASCORRO-GALLARDO, J. O.; VAN DIJCK, P.; FOLCH-MALLOL, J.; BONINI, B.; VAN VAECK, C.; GAXIOLA, R.; COVARRUBIAS, A. A.; NIETO-SOTELO, J.; THEVELEIN, J. M.; ITURRIAGA, G. 1999. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol.* 119: 1473-1482.