

# INCREMENTO EN LA SÍNTESIS DE TREHALOSA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

Ma. Rosa Elia Figueroa-Balderas<sup>\*</sup>, Nelson Avonce<sup>\*</sup>, Johan Thevelein<sup>1</sup>, Gabriel Iturriaga<sup>2</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Mor. México. Fax (73)172388. <sup>1</sup> Instituut voor Biotechnologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. <sup>2</sup> Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM. Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Mor. 62210.  
@ e-mail: maryrosy@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Trehalosa*, *Trehalosa 6-fosfato sintasa*, *Selaginella lepidophylla*

**Introducción.** La trehalosa es un disacárido no reductor que en algunos organismos tiene la capacidad de proteger estructuras celulares ante la desecación extrema. En *E. coli*, *S. cerevisiae* y plantas la trehalosa es sintetizada por las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa 6 fosfato fosfatasa (TPP). Recientemente se ha demostrado que los cDNA's de *A. thaliana* (*AtTPS1*) y de *S. lepidophylla* (*SITPS1*) que codifican para una TPS son capaces de restaurar el crecimiento en glucosa de una mutante  $\Delta$ TPS1 de *S. cerevisiae* (1, 2). Además, *SITPS1* fué capaz de inducir termotolerancia y resistir choques térmicos, estrés osmótico y salino, así como, se observó un incremento en la actividad enzimática y en el contenido de trehalosa al truncar el amino-terminal de *SITPS1* (2). En trabajos previos se ha demostrado que la acumulación de trehalosa en plantas transgénicas que sobreexpresan los genes *otsA* y *otsB* (*E. coli*) es baja y esta se ve incrementada al inhibir la trehalasa con el antibiótico validamicina A (3).

El objetivo del presente trabajo fué evaluar el efecto de las deleciones del amino-terminal de los genes *SITPS1* y *AtTPS1* sobre el contenido de trehalosa en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

**Metodología.** Plantas de *A. thaliana* fueron transformadas mediante infiltración al vacío mediada por *A. tumefaciens* (C58C1pGV2260) con construcciones llevando los genes *SITPS1* y *AtTPS1*, así como versiones truncadas del extremo amino-terminal de los mismos genes bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Líneas transgénicas homocigas fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina (100% Kan<sup>R</sup>) y el contenido de trehalosa fué determinado mediante análisis por HPLC en plántulas de 7 días crecidas sobre medio MS (GIBCO-BRL) con y sin validamicina A.

**Resultados y Discusión.** Análisis mediante PCR, RT-PCR y northern blot mostraron la integración de las construcciones y la sobreexpresión de los transcritos de los genes *SITPS1* y *AtTPS1* en las plantas transgénicas (datos no mostrados). Los análisis del contenido de trehalosa (tabla 1) muestran una mayor acumulación en las plantas crecidas en presencia de validamicina A, alcanzando niveles de hasta 53.164 mg/g de peso fresco. Por otra parte, al ser truncado el extremo amino-terminal, se observó una mayor acumulación de trehalosa con ambos genes. Las plantas que sobreexpresan el gen *SITPS1* o la versión truncada del mismo, acumularon más trehalosa que las plantas con el gen *AtTPS1* o  $\Delta$ *AtTPS1*. De acuerdo a los resultados mostrados en este trabajo se sugiere

un posible papel regulatorio del extremo amino-terminal sobre la producción de trehalosa.

Tabla 1. Acumulación de trehalosa en plantas transgénicas de *A. thaliana*

Líneas Transgénicas		Contenido de trehalosa (mg/g de peso fresco)		
		Sin validamicina	Con validamicina	
<b>SITPS1</b> <b>Completo</b>	S11.7.3	0.405	6.822	
	S111.10	0.242	8.586	
	S119.5	0.202	6.701	
	<b>Truncado</b>	$\Delta$ NS12.5	<b>3.645</b>	<b>53.164</b>
		$\Delta$ NS13.8	0.228	0.368
		$\Delta$ NS15.4	2.065	5.631
<b>AtTPS1</b> <b>Completo</b>	At4.4	0.261	0.321	
	At7.5	0.218	0.358	
	At12.3	0.176	0.358	
	<b>Truncado</b>	$\Delta$ NAt6.5	<b>0.269</b>	<b>0.613</b>
		$\Delta$ NAt13.3	0.202	0.366
		$\Delta$ NAt17.4	0.133	0.455
<b>Controles</b>	WT	0.171	0.222	
	C11.2	0.162	0.202	

**Conclusiones.** El contenido de trehalosa fué aumentado al ser truncado el extremo amino-terminal, en las construcciones con los dos genes. Las líneas transgénicas llevando el gen *SITPS1* fueron más eficientes en la acumulación de trehalosa que las líneas con el gen *AtTPS1*.

**Agradecimiento.** Este trabajo fué financiado por el CONACyT, becas no. 118120 y 84202

### Bibliografía.

- Blázquez, M, Santos, E, Flores, C, Martínez-Zapater, J, Salinas, J, Gancedo, C. (1998) Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13:685-690.
- Zentella, R, Mascorro-Gallardo, J. O, Van Dijck, P, Folch-Mallol, J, Bonini, B, Van Vaeck, Ch, Gaxiola, R, Covarrubias, A. A, Nieto-Sotelo, J, Thevelein, J, Iturriaga, G. (1999) A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol.* 119:1473-1487.
- Goddijn, O. J. M, Verwoerd, T.C, Voogd, E, Krutwagen, R, W. H.H, de Graaf, P. T. H. M, Poels, J, van Dun, K, Ponstein,

A. S. Damm, B. Pen, J. (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113: 181-190