

# MEJORA DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE TABACO MEDIANTE LA INHIBICIÓN DEL GEN DE LA TREHALASA

I. ANALÍ GÁMEZ ESCOBEDO\*, JOSÉ LUIS CABRERA PONCE\*\*, LUIS R. HERRERA ESTRELLA\*\*, CARLOS HERNÁNDEZ LUNA\*, ROBERTO MONTES DE OCA LUNA\*



Las plantas se enfrentan a factores ambientales adversos (temperaturas extremas, estrés osmótico por alta salinidad o sequía, etc.) que les causan dificultades para crecer y desarrollarse. A pesar de los esfuerzos para incrementar la producción de los cultivos agrícolas mediante el

mejoramiento tradicional, en cuanto a resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico, los éxitos han sido limitados. La falta de un progreso eficiente en esta área se debe en gran parte a que los mecanismos para tolerar el estrés son una característica influenciada por la expresión coordinada y diferencial de una amplia red de genes, y no de una característica genética individual.<sup>1</sup>

Una respuesta común de los organismos al estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas, es la acumulación de azúcares y otros solutos compatibles que sirven como osmoprotectores, tal es el caso de la trehalosa, un disacárido de glucosa no reductor que desempeña una función fisiológica importante como protector de estrés abiótico en gran variedad de organismos.<sup>2</sup> En lo que se puede llamar un primer paso de la biosíntesis de este azúcar, la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) transfiere una glucosa-UDP a una glucosa-6-fosfato para producir una molécula de trehalosa-6-fosfato (t6p),

que después es convertida en trehalosa por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP).<sup>3</sup>

Este disacárido se encuentra en diversos organismos como bacterias, hongos e insectos,<sup>4</sup> pero en plantas sólo se acumula en las llamadas "plantas de la resurrección" (*Selaginella lepidophylla* y *Myrothamnus flabellifolia*),<sup>5</sup> que son altamente tolerantes a la sequía. Esta ventaja llevó a proponer la capacidad de sintetizar trehalosa en los cultivos agrícolas, con el fin de mejorar su comportamiento bajo estrés abiótico. Inicialmente se desarrollaron plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*)<sup>6</sup> y *Arabidopsis thaliana*, mediante la introducción y expresión de los genes codificantes para las enzimas TPS y TPP (*otsA* y *otsB*) de *Escherichia coli* y levaduras, y aunque se obtuvo cierta tolerancia a estrés por sequía, salinidad y bajas temperaturas, en ninguno de los casos se obtuvo acumulación de trehalosa, debido a la presencia de la actividad hidrolítica de la enzima trehalasa endógena. Esta enzima regula la acumulación del disacárido al degradarlo a dos moléculas de glucosa.<sup>7</sup> Posteriormente, utilizando el inhibidor específico Validamicina A, se determinó que la inhibición de esta enzima permite la acumulación de trehalosa en las plantas transgénicas, así como en las plantas silvestres, con lo que se determinó que la capacidad para sintetizar trehalosa se encuentra también distribuida en el reino.<sup>8</sup>

□ El presente artículo está basado en la investigación «La inhibición del gen de la trehalasa mejora el crecimiento de plantas de tabaco», galardonado con el Premio de Investigación UANL 2003 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2004.

\* Unidad de Manipulación genética, Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

\*\* Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Además de tolerancia a sequía e incremento en la acumulación de trehalosa, se obtuvieron fenotipos que indican que las plantas que acumulan trehalosa presentan un incremento en su capacidad fotosintética, y aumentan la producción de biomasa, a la vez que sus hojas presentan una mejor capacidad para retener el agua. Es decir, con la manipulación de la concentración de trehalosa se puede incidir en mejorar la tolerancia a estrés (hídrico, salino y por frío) y de incrementar la producción agrícola al mejorar la actividad fotosintética.

La habilidad de alterar el fenotipo de un organismo mediante la movilización de DNA es central para la transformación genética de plantas.<sup>9</sup> Los métodos más comunes para introducir DNA a las células vegetales utilizan la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* o microproyectiles de tungsteno propulsados a gran velocidad. De las células transformadas se obtienen plantas completamente diferenciadas, que son seleccionadas por resistencia a algún antibiótico o herbicida, característica que presenta una gran polémica debido a la probabilidad de transferir estos genes de resistencia a especies no deseadas.

Una planta puede ser modificada genéticamente no sólo por la introducción de secuencias que expresen algún gen, sino porque pueden introducirse secuencias no codificantes que tengan como objetivo apagar la expresión de genes endógenos. El silenciamiento de genes en plantas es un mecanismo natural de control implicado en la resistencia a virus, el mantenimiento del genoma y el control del desarrollo.<sup>10</sup> Cuando los RNAs de un transgén son homólogos a los RNAs codificados por genes endógenos, ambos tipos de RNA son degradados en un fenómeno llamado cosupresión. De este modo hemos conseguido, en nuestro trabajo, disminuir la actividad enzimática trehalasa en plantas de tabaco, mediante la inhibición por RNA antisentido del gen endógeno, al dirigir una secuencia interna del DNA codificante para la enzima trehalasa, además de conducir a un mejoramiento en la capacidad de crecimiento de las plantas y la obtención de plantas transgénicas por selección en medio carente de sacarosa, en sustitución del marcador de selección por el antibiótico kanamicina.

## Métodos y resultados

Ya que el principal objetivo fue evaluar en tabaco una estrategia para mejorar la capacidad de creci-

miento y desarrollo por medio de la inhibición de la enzima trehalasa mediante RNA antisentido, y el uso de esta tecnología para llegar a un sistema de selección de eventos transgénicos, se clonó para ello el cDNA de la trehalasa de alfalfa y se expresó su secuencia antisentido en plantas de tabaco, tanto de manera constitutiva con el promotor 35S, como de manera inducible por estrés osmótico con el promotor rd29A.

### Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa

Con el fin de obtener la secuencia antisentido de la enzima trehalasa de alfalfa requerida para la estrategia de inhibición, se procedió a clonar el cDNA de la misma. Debido a que dicha secuencia no está reportada, inicialmente se amplificó mediante RT-PCR a partir de RNA total de alfalfa (*Medicago sativa*) un fragmento interno de 150 pb (figura 1A), utilizando el sistema AM-RT Avian Enhanced (SIGMA; Inc.), utilizando los oligonucleótidos degenerados Tre300 5' (TATTAYTGGGATTCTATTGG) 3' y Tre351 5' (CTGTTASTRTATRAWGCTCT) 3'. Estos oligonucleótidos se diseñaron con base en regiones conservadas entre las secuencias codificantes reportadas en el banco de datos (Entrez, NCBI) para la trehalasa de *Arabidopsis thaliana* (acceso AAF22127), papa (A67882) y soya (AAD22970). El alineamiento de las secuencias se hizo a través del método Clustal (SoftWare DNA Star).

Posteriormente, utilizando el protocolo de 3'RACE, se amplificó el extremo 3' a partir de un primer PCR, utilizando los oligos específicos 3Tre300 (5'-ACCAATCTCATTTCATTGAT-3') y 5T18HXS (5'-GTGACTCTAGAAGC[T]<sub>18</sub>-3'), diseñados a partir de la secuencia del fragmento interno clonado anteriormente. Con el producto de PCR, se procedió a un PCR semianidado, utilizando los oligos específicos 3Tre320 (5'-CGGGTTTGTGCTTAATGGTG-3') y 5T18HXS, a partir del cual se obtuvo un fragmento de 1.2 kb (figura 1B). Finalmente, para la obtención del extremo 5' se utilizó el sistema GeneRacer (Invitrogen, Inc.), en el que, a partir de 3µg del RNA total, se obtuvo un fragmento de 550 pb (figura 1C), utilizando los oligos GeneRacer5<sup>MR</sup> (5'-CGACTGGAGCACGAGGACTGA-3') y 5Tre350 (5'-AAACCCGTATTCCTCAATCA-3').

A partir de las secuencias del cDNA de la trehalasa de alfalfa (MSTRE; MS: *Medicago sativa*, TRE: trehalasa), amplificada mediante los protocolos de

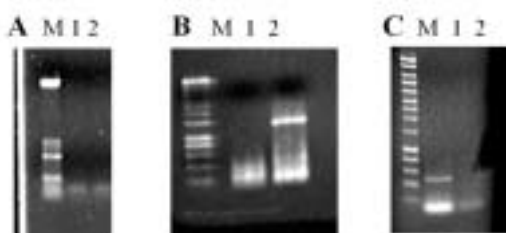


Fig. 1. Clonación del cDNA de la trehalasa de alfalfa. (A) Amplificación por PCR del fragmento interno: M, marcador 1 kb; 1, fragmento de 150 pb producto del PCR. (B) Amplificación 3'RACE del extremo 3': M, marcador e 200 pb; 1, producto de PCR; 2, fragmento de 1.2 kb producto del seminested. (C) Amplificación GeneRacer del extremo 5': M, marcador de 200 pb; 2, fragmento de 550 pb producto del PCR; 2, control negativo de la reacción.

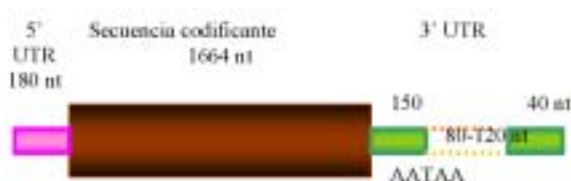


Fig. 2. Estructura del cDNA de la enzima trehalasa de alfalfa. Región 5' no traducible (promedio de 180 nt) en rosa, secuencia codificante (1664 nt), y región 3' no traducible (variable de 200, 270 y 310 nt) en verde. Se indica la señal de poliadenilación a los 135 nt del 3'UTR. La barra verde indica la longitud de secuencia con homología entre las clonas obtenidas; las líneas punteadas indican regiones no homólogas.

RT-PCR, 3'RACE y GeneRacer, se procedió a obtener un contingente con la secuencia completa, identificando la secuencia codificante y sus regiones 5' y 3' no traducibles (figura 2), con ayuda del programa MegAlign<sup>MR</sup>. La secuencia codificante obtenida se analizó y se comparó con las secuencias reportadas.

### Clonación de la secuencia antisentido de la trehalasa bajo el control de los promotores 35S y rd29A

Para expresar en plantas la secuencia de trehalasa en antisentido bajo los promotores 35S y rd29A, se amplificó un fragmento interno de 560 pb de la secuencia, que incluye pequeñas regiones conservadas entre las diferentes trehalasas de plantas, utilizando los oligos específicos 3Tre300 y TreNsiRw (5'-

TTGATTA AATGCATTCTACCCGGG-3'). Esta secuencia fue clonada como fragmento *SacI-XbaI* en los plásmidos de expresión en plantas pBI-121 y prd29, los cuales llevan los promotores 35S y rd29A respectivamente, dando lugar a las construcciones p35S:TREas y prd29:TREas.

### Obtención de plantas transgénicas de tabaco

Para probar el modelo de inhibición por antisentido de la trehalasa, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xhanti) que expresan el antisentido de manera constitutiva e inducible, respectivamente, con los promotores 35S y rd29A. Para ello se integraron al tabaco las construcciones p35S:TREas y prd29:TREas, así como sus controles p35S:GUS y prd29:GUS, mediante el sistema de biobalística, siguiendo el protocolo reportado por Cabrera-Ponce *et al.*<sup>11</sup> La regeneración de las plantas transgénicas se llevó a cabo según el protocolo de Herrera y Simpson,<sup>12</sup> utilizando Kanamicina (SIGMA) 200mg/L como agente de selección.

### Determinación de la actividad trehalasa en plantas

Para evaluar si la estrategia de inhibición por antisentido disminuye la actividad trehalasa en las líneas transgénicas, se realizó un ensayo enzimático para cuantificar la cantidad de glucosa obtenida de una solución 10mM de trehalosa pura (SIGMA) por medio de la enzima trehalasa presente en el extracto vegetal (Dalqvist, 1964). Para determinar la concentración de glucosa producida en la reacción se utilizó el sistema de glucosa oxidasa/peroxidasa (GO Assay<sup>MR</sup>, SIGMA). La cuantificación de glucosa se realizó en un espectrofotómetro UV-vis MINI 1240<sup>MR</sup> (Shimadzu, Inc.) a  $Abs_{540nm}$ , obteniéndose una menor actividad de trehalasa en las líneas transgénicas para el antisentido #32 y #45, en comparación a las líneas controles #150 y #171, como se observa en la figura 3. Posteriormente, la cantidad de glucosa se ajustó a la concentración de proteína presente en el extracto (cuantificada por el método Bradford. Con base en estos resultados, las líneas transgénicas para el antisentido presentan una disminución promedio de 50% en comparación con las líneas control, como se observa en la figura 4.

### Análisis de dependencia a sacarosa y comporta-



Fig. 3. Determinación de actividad trehalasa por ensayo de disacaridasa. Tubos: 1-3, curva estándar de glucosa de 0.0, 40.0 y 80.0 mg. 4, línea control p35S: GUS #150. 5, línea antisentido p35S: TREAs #32; 6, línea control prd29A: GUS #171. 7, línea antisentido con prd29A: TREAs #45. 8, control negativo (buffer de extracción como extracto enzimático). 9, control positivo (0.25 unidades de trehalasa porcina pura).

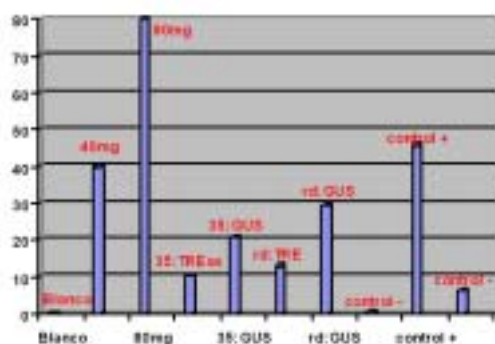


Fig. 4. Cuantificación de glucosa producida por la actividad trehalasa en las plantas transgénicas. En el eje de las Y se representa la concentración de glucosa en mg, y en el eje de las X se representan las muestras analizadas. Columnas: 1-3, curva estándar, 0, 40 y 80 mg de glucosa respectivamente; 4, línea p35S-TREAs #32; 5, p35S: GUS#150; 6, prd29A: TREAs #45; 7, prd29A: GUS#170; 8, buffer MES; y 9, trehalasa pura.

### miento de azúcares de las líneas transgénicas *in vitro*

Con el fin de evaluar si la expresión del antisentido conduce a cambios significativos en el desarrollo de la planta, se procedió a evaluar si la expresión del antisentido confiere a las plantas un mejor desarrollo *in vitro* en ausencia de sacarosa (fuente de carbono común necesaria en cultivo de tejidos *in vitro*), para ello se observó el desarrollo de plantas de las diferentes líneas transgénicas, así como de tabaco silvestre, por un período de cuatro semanas, evaluando la diferencia en velocidad de crecimiento y en vigorosidad. Como se observa en la figura 5, plantas como el tabaco silvestre requieren de la presencia de sacarosa en el medio para desarrollarse normalmente, ya que al prescindir de ésta merma su desarrollo (figura 5B), y finalmente provoca su



Fig. 5. Eliminación de la dependencia a sacarosa. Diferencia a las tres semanas de desarrollo de una línea transgénica con el antisentido de trehalasa y un control en medio normal (MS Sac 2%) y en medio carente de sacarosa (MS). A) tabaco silvestre (Wt) en medio con sacarosa; B) tabaco silvestre en medio carente de sacarosa; y C) línea transgénica prd29A: TREAs #70 en medio sin sacarosa.

inanición y muerte. La expresión del antisentido de la trehalasa, sin embargo, permitió no sólo que la planta se desarrollara normalmente en medio carente de sacarosa (figura 5C), sino que pudiera también evadir la inanición y sobrevivir finalmente.

Por otra parte, para observar diferencias en el comportamiento de azúcares, se realizó un ensayo preliminar de cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography), siguiendo el protocolo propuesto por Haer,<sup>13</sup> utilizando placas preparativas de sílica preadsorbente Uniplate<sup>MR</sup> de 250µm de grosor (Alltech, Inc.). Se utilizaron estándares para glucosa, sacarosa y trehalosa al 0.1% (Research Organics, Inc.). Con este ensayo pudimos observar que las plantas transgénicas para el antisentido de trehalasa acumulan glucosa cuando la fuente de carbono está presente en el medio (figura 6, carriles 6 y 8), mientras que en su ausencia la glucosa se utiliza y no se acumula (figura 6, carriles 7 y 9). Las plantas control no acumulan glucosa bajo ninguna de estas condiciones (figura 6, carriles 10-13). En el caso de la línea transgénica antisentido p35S: TREAs#27, tampoco se observa acumulación de glucosa (figura 6, carriles 4 y 5). Esta línea tampoco presenta el mismo desarrollo y vigorosidad que las demás líneas antisentido, y su dependencia a sacarosa no es tan marcada. Al parecer, esta línea presenta un silenciamiento del transgén.

### Evaluación del sistema como marcador de selección

Ya que nos interesaba saber si esta tecnología de inhibición de la enzima trehalasa puede implemen-



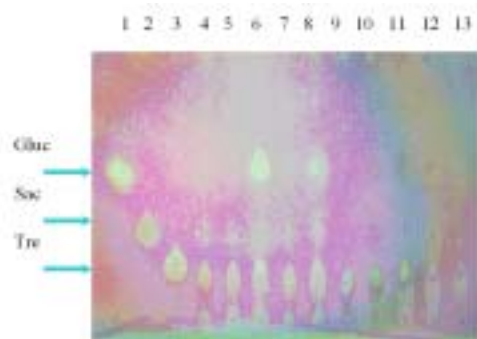


Fig. 6. Cromatografía en capa fina del extracto de azúcares vegetales. Carriles: 1, estándar glucosa 0.1%; 2, estándar sacarosa 0.1%; 3, estándar trehalosa 0.1%; 4, p35S:TRERas #27 MS Sac2%; 5, p35S:TRERas #27 MS; 6, prd29:TRERas #45 MS Sac2%; 7, prd29:TRERas #45 MS. 8, prd29:TRERas #70 MS Sac2%; 9, prd29:TRERas #70 MS. 10, p35S:GUS #150 MS Sac2%; 11, p35S:GUS #150 MS; 12, Prd29:GUS #170 MS Sac2%; 13, prd29: GUS #170 MS.

tarse como un nuevo marcador de selección en medio carente de fuente de carbono, se llevó a cabo un ensayo en el cual se procedió a diferenciar plantas a partir de explantes bombardeados con las construcciones antisentido y sus controles, en medio de cultivo suplementado con ácido indolbutírico (AIB) y con una concentración menor de sacarosa (0.7%). No se ejerció selección por resistencia a kanamicina. Los explantes se incubaron según el protocolo de Herrera y Simpson,<sup>11</sup> a 26°C y fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. A las cuatro semanas de diferenciación, tanto los explantes bombardeados con el antisentido como los de sus controles presentaron diferenciación de brotes debido a que la concentración de sacarosa aún era suficiente para permitir el desarrollo de las células bombardeadas. Los brotes obtenidos se transfirieron entonces a medio MS sin sacarosa, y a las tres semanas se pudo observar la inanición y muerte de los brotes control (figura 7A), a diferencia de los brotes con el antisentido (figura 7B y C) que continuaron su desarrollo y diferenciación normal.

## Discusión

Aunque son pocas las secuencias que se reportan para las trehalasas de origen vegetal,<sup>14</sup> la secuencia de alfalfa utilizada en este trabajo como antisentido incluyó la región más conservada entre dichas especies, por lo que se esperaba que el transcrito hibridara con el RNAm endógeno de la trehalasa y



Fig. 7. Utilización de la secuencia antisentido de trehalasa como marcador de selección en plantas transgénicas. Regeneración de brotes en medio IBA con sacarosa al 0.7% durante 30 días y transplante a medio carente de sacarosa durante 45 días. Brotes de tabaco silvestre (A); brotes de tabaco transgénico para el antisentido p35S:TRERas GUS (B); brotes de tabaco transgénico para el antisentido prd29:TRERas.

desencadenara el silenciamiento postranscripcional de este gen. La inhibición enzimática tuvo efecto, con una disminución de hasta el 50%. Con este grado de inhibición se observaron fenotipos correlacionados con los reportados al alterar el metabolismo de la trehalosa, como defectos en el crecimiento y en el metabolismo, que consisten en cambios en la distribución del carbono entre los tejidos fuente y de desecho, conduciendo a la propuesta de que algunas etapas del metabolismo de la trehalosa están implicadas en la señalización de azúcares.

Aunque no evaluamos acumulación de trehalosa, nos basamos en el hecho de que si la inhibición química de la trehalasa conduce en plantas silvestres a una acumulación mínima de trehalosa y a fenotipos característicos, nuestra estrategia de inhibición por antisentido permitirá una acumulación

del azúcar.

Por largo tiempo, uno de los objetivos principales de los científicos ha sido mejorar la fotosíntesis para maximizar la productividad de los cultivos. Las plantas producen carbohidratos en los tejidos fotosintéticamente activos, a partir de los cuales se distribuyen entre los órganos vertedero. Las enzimas clave involucradas en el metabolismo de carbohidratos están sujetas al control de metabolitos. En general, la acumulación de azúcares en los órganos fuente da como resultado la represión de los genes involucrados en la fotosíntesis, mientras que en los tejidos vertedero se inducen los genes para el almacenamiento y utilización. El agotamiento de los azúcares revierte esta situación.<sup>15</sup> Considerando que la trehalosa que se acumula en respuesta a la inhibición de la actividad trehalasa, pudiera afectar la expresión de genes involucrados con dichos comportamientos, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la modificación genética del mecanismo de la trehalosa afecta la capacidad fotosintética por medio de señalización de azúcares. Por otra parte, la capacidad de regeneración en ausencia de una fuente de carbono (sacarosa) podría explicarse por un incremento en la capacidad fotosintética de la célula vegetal, lo cual se traduce a producción de biomasa y mejor utilización de nutrientes, así como también al sensado y señalización de azúcares, que está involucrado en el control del crecimiento y el desarrollo de la planta durante su ciclo de vida, ya que en la germinación y desarrollo los azúcares pueden reprimir o inducir la movilización de nutrientes, la elongación del hipocotilo, la expansión y desarrollo del tallo, y la diferenciación de los tejidos meristemáticos.

## Resumen

La síntesis de trehalosa es un mecanismo natural de tolerancia a sequía, aunque en plantas no se acumula debido a la presencia de la enzima trehalasa. En este trabajo inicialmente clonamos el cDNA de la trehalasa de alfalfa para desarrollar un modelo de inhibición por antisentido de la misma. Este modelo se evaluó en tabaco con el fin de conferir tolerancia a sequía. Las plantas obtenidas tienen menor actividad trehalasa que los controles, además de presentar una completa independencia de sacarosa como fuente de carbono. Esto nos indica que la expresión del antisentido de trehalasa induce en las plantas una mejor capacidad fotosintética, lo cual

puede utilizarse para obtener cultivos de importancia agronómica con un mejor crecimiento y desarrollo. Con base en la respuesta de las plantas con el antisentido pudimos utilizar este sistema como un marcador de selección y obtuvimos brotes transgénicos seleccionados en medio sin sacarosa, sin necesidad de utilizar un marcador de selección por antibióticos, o herbicidas.

**Palabras clave:** Plantas transgénicas, Trehalosa, Trehalasa, Sacarosa, Fotosíntesis, Marcador de selección.

## Abstract

In nature, an accumulation of trehalose acts as a mechanism of drought resistance. Low levels of this sugar in plants are due to the expression of the enzyme trehalase. In this work, a trehalase cDNA was cloned to inhibit the expression of the gene by RNA antisense and induce trehalose accumulation. Transgenic tobacco plants expressing the antisense were generated to test this strategy. These transgenic plants showed a decrease in trehalase activity and non-dependent sucrose growth. This indicates that the expression of trehalase antisense induce a better photosynthetic capacity, which can be used to improve the growth or production in crops. These results allowed us to use the antisense expression as a marker to select transgenic plants in the absence of sucrose, without having to use an antibiotic marker.

**Keywords:** Transgenic plants, Trehalose, Trehalase, Sacarose, Photosynthesis, Select marker.

## Referencias

1. Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1999. *Nature Biotech.*, 17: 287-291.
2. Nwaka, S. y H. Holzer. 1998. Molecular biology of trehalose and trehalases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Pr. Nucl. Ac. Res. & Mol. Biol.*, 58: 197-237.
3. Cabib, E. y F.L. Leloir. 1958. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 231: 951-959.
4. Elbein, A.D., 1974. The metabolism of  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 30: 227-256.
5. Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. 1992.

- Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 54: 579-599.
6. Müller, J., Boller, T. y A. Wiemken. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 112: 1-9.
  7. Romero, C., Bellés, J.M., Vaya, J.L., Serrano, R. y F.A. Cullanezmacia. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 201: 293-297.
  8. Goddijn, O.J., Vervoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, W.H.H., de Graaf, P.T.H.M., Poels, J., van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B. y J. Pen. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Phys.* 113:181-190.
  9. Voinnet, O. y D.C. Baulcombe. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389: 553.
  10. Cabrera-Ponce, J.L., López, L., Assad-García, N., Medina-Arévalo, C. Baley, A.M. y L. Herrera-Estrella. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports* 16: 255-260.
  11. Herrera-Estrella, L. y J. Simpson. 1988. Foreign gene expression in plants. *Plant Molecular Biology. A practical approach.* Oxford, C.H. Shaw Eds. IRL Press. pp: 131-160.
  12. Haer, F. 1969. An introduction to chromatography. *Ann Arbor Science Pub.* Michigan.