

LA TREHALOSA: UN AZÚCAR OSMOPROTECTOR CON CAPACIDAD DE SEÑALIZACIÓN

Suárez Rodríguez, R.¹; Raya Pérez, J.C.²; Iturriaga de la Fuente, G.^{2§}

¹Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuemavaca, Morelos, México. ²Instituto Tecnológico de Roque.

Roque Celaya, Guanajuato, México. §Autor para correspondencia: gaiturriaga@itroque.edu.mx

Recibido: Marzo 13, 2015 Aceptado: Mayo 8, 2015

Artículo de revisión

RESUMEN

La trehalosa es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa. En la naturaleza se encuentra ampliamente distribuida y ha sido aislada de algas, bacterias, hongos, insectos, invertebrados y levaduras, así como también de plantas no vasculares como la Licofita *Selaginella lepidophylla*. Además de su papel como carbohidrato de reserva, la trehalosa actúa en la protección de proteínas y membranas celulares de la inactivación o desnaturalización ocasionadas por diversas condiciones de estrés que incluyen deshidratación, calor, frío y salinidad. Posee amplias aplicaciones biotecnológicas, ya que sus propiedades fisicoquímicas son diferentes a las de otros azúcares,

lo cual le permite usarse como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, cosméticos, células, tejidos y órganos. La presencia de este disacárido en plantas tiene diversas funciones donde, además de osmoprotector, juega un papel esencial en diversas etapas del desarrollo de la planta como formación del embrión y floración. La trehalosa también parece estar involucrada en la regulación del metabolismo del carbono y en la fotosíntesis, y su acumulación está asociada a una mayor tolerancia al estrés abiótico. Además, se ha demostrado que este azúcar juega un papel importante en la interacción planta-microorganismo.

Palabras clave: disacárido, sequía, trehalosa.

ABSTRACT

Trehalose is a nonreducing disaccharide composed of two glucose molecules. In nature it is widely distributed and has been isolated from algae, bacteria, fungi, insects, invertebrates and yeast, as well as nonvascular plants as such as the Licophyte *Selaginella lepidophylla*. Besides its role as a reserve carbohydrate trehalose acts in protecting proteins and cell membranes from inactivation or denaturation caused by various stress conditions including dehydration, heat, cold and salinity. It has large biotechnological applications because its physical chemical properties are different from those of other sugars which allows it be used as preservative of

foods, enzymes, vaccines, cosmetics, cells, tissues and organs. The presence of this disaccharide in plants has several functions, which besides being osmoprotector plays an essential role in various stages of development and embryo formation and flowering. Trehalose seems to be also involved in the regulation of carbon metabolism and photosynthesis, and its accumulation is associated with an increased tolerance to abiotic stress. Furthermore, it has been shown that this sugar plays a role in plant-microbe interactions.

Key words: disaccharide, drought, trehalose.

Estructura de la trehalosa y su distribución

La trehalosa (α,α -trehalosa ó α -D-glucopiranosil α -glucopiranosido) es un disacárido no reductor en el que dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace glicosídico 1-1. Existen tres posibles anómeros de trehalosa: α , β -1,1-; β , β -1,1- y; α , α -1,1 pero sólo éste último ha sido aislado y biosintetizado en un organismo vivo (Figura 1). Este disacárido está ampliamente distribuido en el mundo biológico y su presencia en órdenes inferiores del reino vegetal se

conoce desde hace muchos años, cuyo primer reporte tentativo ocurrió en 1832 en el hongo *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., un patógeno productor de una toxina letal para el humano. Posteriormente, se encontró en pupas del escarabajo *Larinus maculata* Gyllenhal, de nombre común "trehala", que inspiró al químico Marcellin P.E. Berthelot para designarla como trehalosa (Elbein *et al.*, 2003).

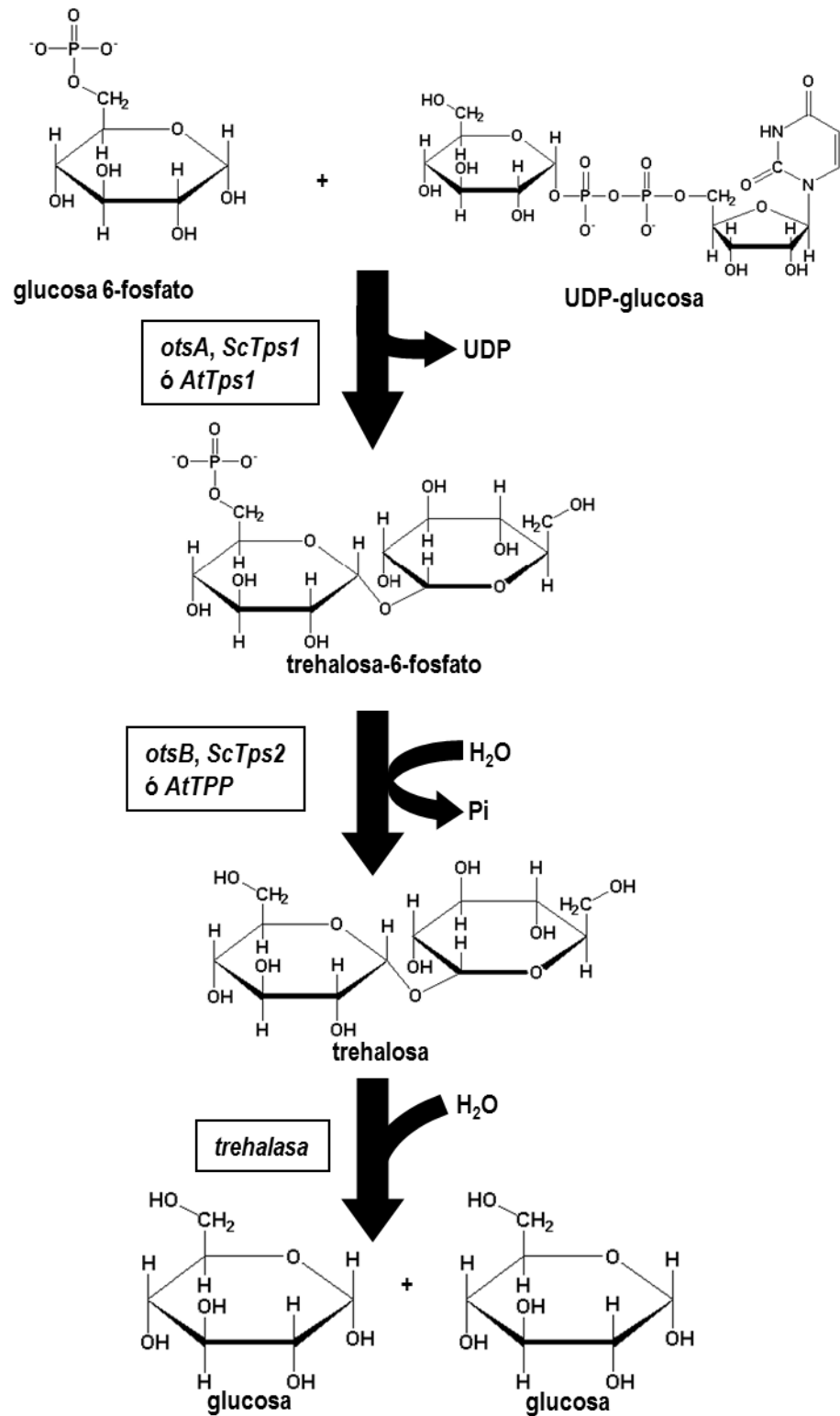


Figura 1. Ruta de biosíntesis y degradación de trehalosa más frecuentemente encontrada en bacterias, hongos y plantas.

La trehalosa es común en levadura y hongos, en forma de esporas, cuerpos fructíferos y células vegetativas. Por ejemplo, las esporas de *Dictyostelium mucoroides* Bref contienen el 7% del peso seco de trehalosa y las ascosporas de *Neurospora tetrasperma* Dodge hasta 10% (Iturriaga *et al.*, 2009). La trehalosa está presente en levadura de pan y cerveza, en altas concentraciones; en estos organismos los niveles de trehalosa dependen de la edad de las células, así como de la etapa de crecimiento y estado nutricional. Diversas especies de líquenes y algas contienen este disacárido, aunque en concentraciones considerablemente menores que las descritas para levadura. La trehalosa se localiza en plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Blázquez *et al.*, 1998) y en algunos pastos nativos de México (Iturriaga *et al.*, 2000).

La trehalosa se acumula en diferentes especies de bacterias, micobacterias y corinebacterias. En micobacterias y corinebacterias éste disacárido juega un papel estructural como componente de la pared celular. Es común encontrar trehalosa en bacterias como *E. coli*, *Rhizobium* sp., *Sulfolobus*, *Pimelobacter* sp. (Tsusaki *et al.*, 1996) y *Arthrobacter* sp. (Maruta *et al.*, 1996).

En el reino animal, la trehalosa fue descubierta en insectos, en donde está presente en la hemolinfa y en larvas o pupas. En los insectos adultos, los niveles de

trehalosa decaen rápidamente durante ciertas actividades que requieren energía, como el vuelo, en el que participa como una fuente de energía. Además de insectos, la trehalosa se acumula en huevos del gusano redondo *Ascaris lumbricoides* en donde puede llegar a comprender hasta 8% del peso seco (Fairbairn y Passey, 1957). La amplia distribución de la trehalosa en organismos vivos, sugiere que juega un papel importante en el mundo biológico.

La presencia de trehalosa es común en bacterias y hongos en ciertas etapas de su desarrollo y, en cantidades considerables, en organismos anhidrobiontes como el tardígrado *Echiniscus blumi* Richters, el crustáceo *Artemia salina* L., la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev. Spring), así como en las angiospermas *Myrothamnus flabellifolius* Welw y *Sporobolus atrovirens* Kunth (Weisburd, 1988; Crowe *et al.*, 1992; Drennan *et al.*, 1993; Iturriaga *et al.*, 2000). Estos organismos tienen en común la propiedad de sobrevivir en estado de, prácticamente, total desecación; además, tienen la capacidad de soportar condiciones extremas de altas o bajas temperaturas, salinidad y radiación, para recuperar sus funciones vitales tan pronto como se rehidratan de nuevo. A éste fenómeno se le conoce como anhidrobiosis o criptobiosis y, en el caso de las especies del reino vegetal que lo presentan, se les denomina "plantas de Resurrección".

Biosíntesis y degradación de la trehalosa

La biosíntesis fue dilucidada por el premio Nobel Luis F. Leloir y su grupo, quienes encontraron en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una vía en la que intervienen dos enzimas: a) trehalosa-fosfato-sintasa (TPS) que produce trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de glucosa-6-fosfato y; b) UDP-glucosa y la trehalosa-fosfato-fosfatasa (TPP) que genera trehalosa al desfosforilar a la T6P (Cabib y Leloir, 1958). La Figura 1 describe esta vía, conocida como TPS/TPP, y se ha encontrado también en insectos, nemátodos y plantas; en bacterias se le conoce como la vía OtsA/OtsB.

Aunque la vía TPS/TPP representa la ruta más ampliamente distribuida para sintetizar trehalosa en los seres vivos, algunas otras rutas de síntesis han sido caracterizadas en bacterias que producen trehalosa (Avonce *et al.*, 2006). En una de éstas, conocida como la vía TreY/TreZ, se utilizan las malto-

dextrinas (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, para originar una unidad trehalosil terminal (Maruta *et al.*, 1996). En un segundo paso, mediante hidrólisis, se libera una molécula de trehalosa. Las enzimas involucradas en esta vía son malto-oligosil-trehalosa sintasa y malto-oligosil-trehalosa hidrolasa. En la otra vía (vía TreS), el sustrato es el azúcar maltosa en el cual, el enlace $\alpha(1-4)$, es modificado a $\alpha(1-1)$ por una glicosil transferasa (Streeter y Gomez, 2006).

La degradación de la trehalosa se lleva a cabo en la levadura y en bacterias, plantas y animales, mediante la enzima trehalasa que origina dos moléculas de glucosa (Figura 1). En vertebrados y humanos no se ha detectado actividad enzimática de TPS ni de TPP,

aunque sí existe una trehalasa que degrada trehalosa y que se expresa en el tracto digestivo y en riñón. Keller *et al.* (1982) describieron que *S. cerevisiae* posee al menos dos trehalasas, una localizada en el citosol y la otra en vacuolas. Estas dos trehalasas fueron separadas y caracterizadas parcialmente: la enzima citosólica posee un pH óptimo, alrededor de 7, y fue llamada trehalasa neutra; en tanto que la proteína vacuolar mostraba su máxima actividad a pH de 4.5, por lo que fue denominada trehalasa ácida. Además, se sabe que la actividad de ambas enzimas en fase de crecimiento exponencial es baja, pero ésta se incrementa en la fase estacionaria, una vez que la glucosa se ha agotado.

Inicialmente, la biosíntesis de trehalosa había sido relacionada sólo con organismos anhidrobiontes o criptobiontes; sin embargo, gracias a la disponibilidad de secuencias en las bases de datos, ha sido posible

identificar genes de síntesis de trehalosa en muchos otros organismos (Avonce *et al.*, 2006). En las bacterias existen cinco rutas biosintéticas diferentes, mientras que en hongos, plantas e invertebrados sólo existe una vía. Los análisis filogenéticos de TPS y TPP mostraron una relación cercana entre los dominios de estas proteínas en diversos organismos. Es de notar que, en las bacterias, los genes TPS y TPP forman generalmente un operón o están en una región cercana en el cromosoma, mientras que en eucariote estos dominios están fusionados en una sola proteína (Avonce *et al.*, 2006). La distribución de éstos genes 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 adquirieron los organismos desde tiempos remotos, probablemente poco después del origen de la vida (Figura 2).

La trehalosa como preservador

Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa explican, por sí solas, las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica (Paiva y Panek, 1996). Se ha demostrado que es capaz de preservar la estructura y 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 (Lins *et al.*, 2004). La trehalosa posee estabilidad alta en condiciones extremas, debido a que el enlace glicosídico posee una energía de 1 kcal mol^{-1} , en comparación con la sacarosa, con 27 kcal mol^{-1} (Clegg, 2001; Crowe *et al.*, 1992). Las proteínas preservan mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de trehalosa, ya que reemplaza a el agua para formar una especie de cápsula protectora alrededor de la proteína deshidratada, con lo que preserva su estructura terciaria y actividad (Figura 3a). La interacción entre ambas moléculas es resultado del enlace por puente de hidrógeno que ocurre entre grupos polares de la proteína e hidroxilos del azúcar. Adicionalmente, el hecho de 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, con lo se produce el típico color café asociado a la degradación de las proteínas, reacción que se acelera conforme la temperatura se incrementa (Crowe *et al.*, 1984).

La capacidad de la trehalosa para proteger a las membranas durante la deshidratación, radica en que interactúa con éstas para favorecer la permanencia del estado fluido de los lípidos y evitar así la fusión, separación de fases y ruptura de membranas. 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, por lo que mantiene a las membranas en forma de cristal líquido (Crowe *et al.*, 2001). La trehalosa funciona en éste 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 (Figura 3b).

Las propiedades de la trehalosa la han convertido en un apreciado producto biotecnológico, con múltiples aplicaciones, algunas de las cuales ya se han desarrollado hasta nivel comercial (Schiraldi *et al.*, 2002). El uso masivo de este disacárido como sustituto de sacarosa, como aditivo, estabilizador, etc., se ha incrementado a partir de que la empresa japonesa Hayashibara desarrolló un procedimiento de producción enzimática basado en el uso del almidón como sustrato, empleando las enzimas malto-oligosil-trehalosa sintasa y a la malto-oligosil trehalosa hidrolasa, provenientes de *Arthobacter ramosus*, una bacteria del suelo (Higashiyama, 2002).

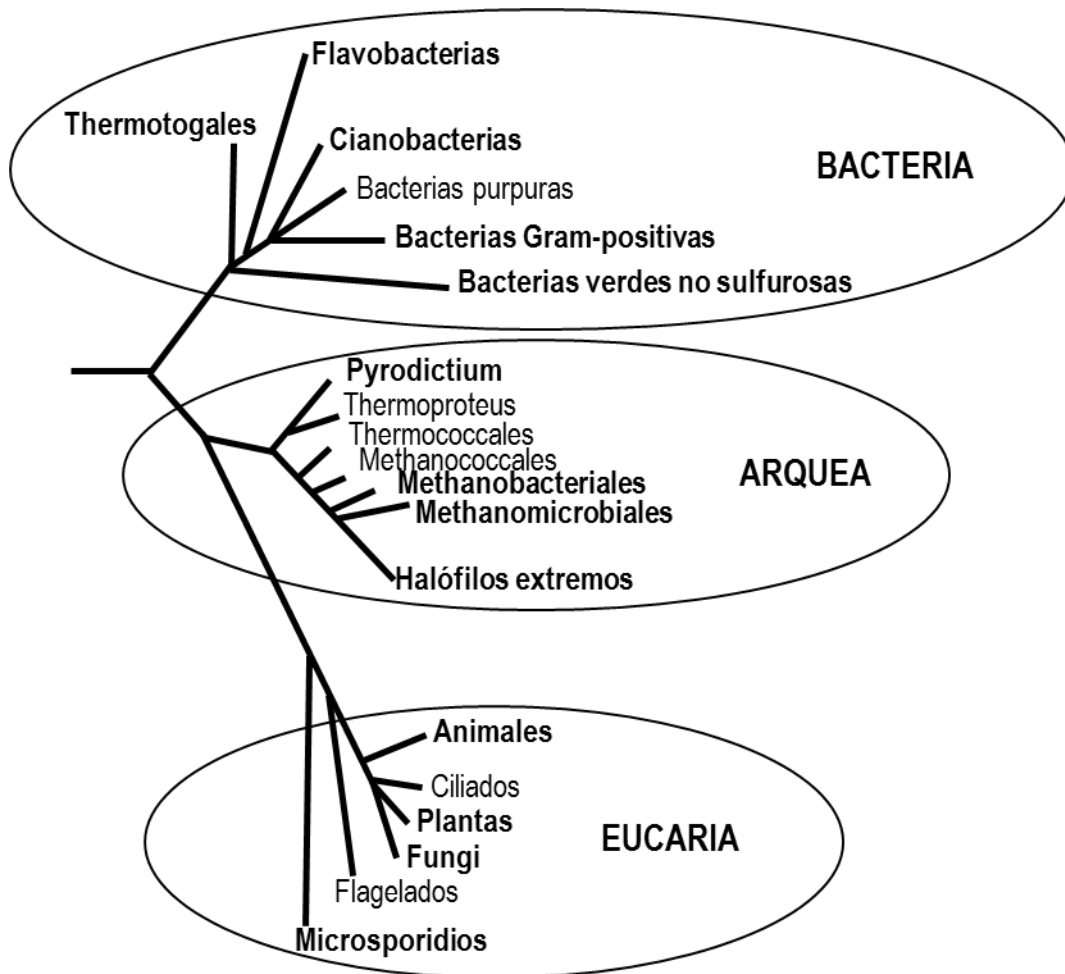


Figura 2. Historia evolutiva de la síntesis de trehalosa. La biosíntesis de trehalosa se realiza en organismos muy distantes en la historia evolutiva. Los *phyla* que son resaltados agrupan organismos que tienen al menos una de las tres vías de biosíntesis de trehalosa.

Los usos más comunes y prometedores de la trehalosa son: preservador de la actividad enzimática (Colaço *et al.*, 1992), estabilizador y preservador de moléculas complejas, aditivo en diversos alimentos, sustituto de azúcar, preservador de células, tejidos y órganos (Eroglu *et al.*, 2000), aumento de vida de anaquel de flores de ornato (Iwaya-Inoue y Takata, 2001), criopreservador de plantas ornamentales (Osorio-Saenz *et al.*, 2014), osmoprotector en plantas

transgénicas (Miranda *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2009) y marcador de selección en la producción de plantas transgénicas (Leyman *et al.*, 2006). La trehalosa también es un aditivo importante en la industria de cosméticos y tiene uso potencial en el tratamiento de enfermedades como corea de Huntington, Alzheimer y resequedad de los ojos (Katsuno *et al.*, 2004; Luyckx y Baudouin, 2011; Richards *et al.*, 2002).

Funciones de los genes de trehalosa en plantas

La planta de resurrección, *S. lepydophylla* (Figura 4), tiene propiedades anhidrobióticas asociadas a su capacidad para acumular grandes cantidades de trehalosa, que al biosintetizarla permitió el aislamiento

de los genes involucrados. A partir de una genoteca de ADNc, se aisló una clona que mostró alta homología con las proteínas OtsA y ScTSP1, de *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. El alto valor

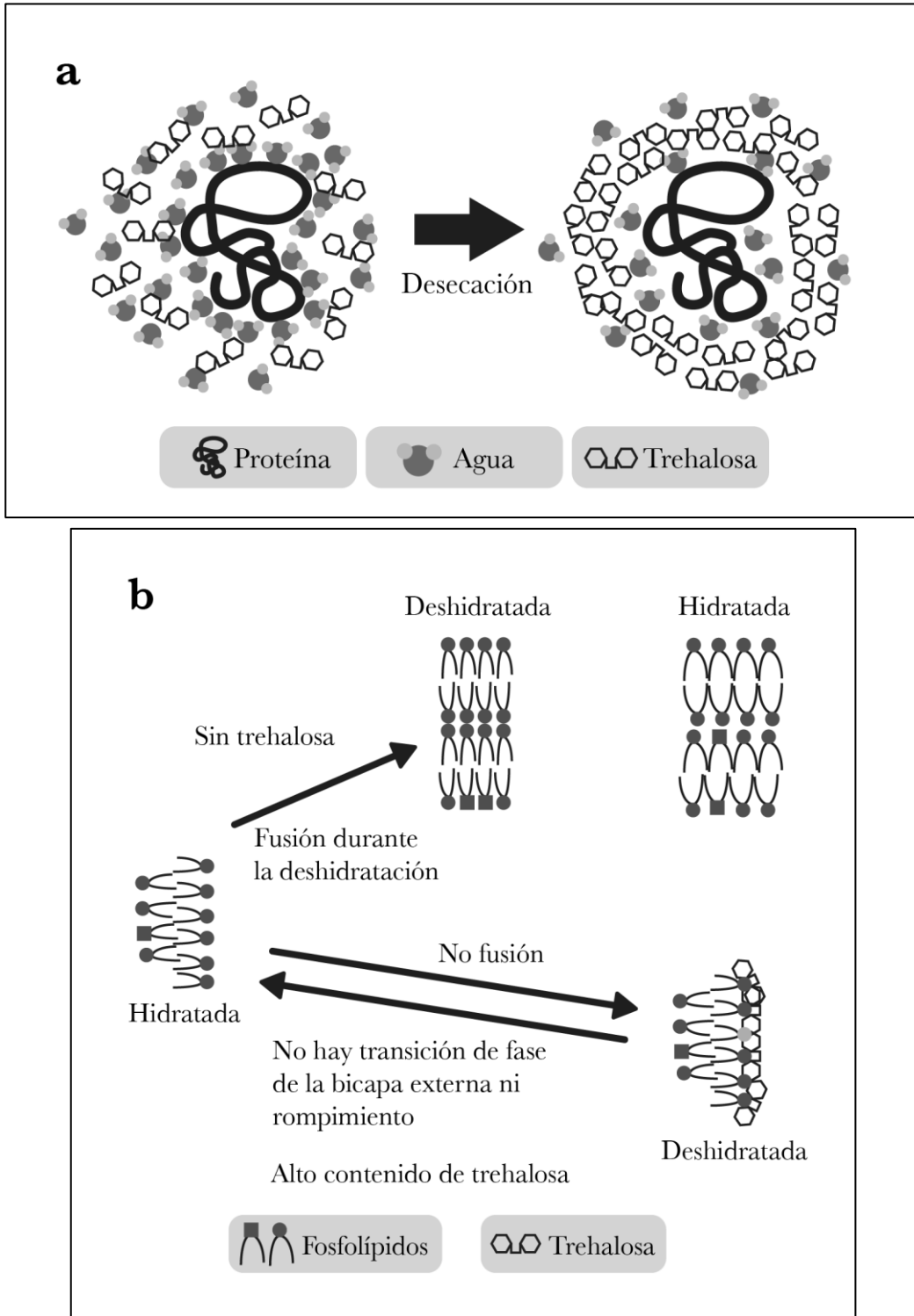


Figura 3. Modelo de osmoprotección de trehalosa en: a) proteínas, al disminuir el agua se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible que así queda en contacto con la proteína. En la vecindad de la proteína, se incrementan los enlaces de hidrógeno entre trehalosa-agua y trehalosa-trehalosa. 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).

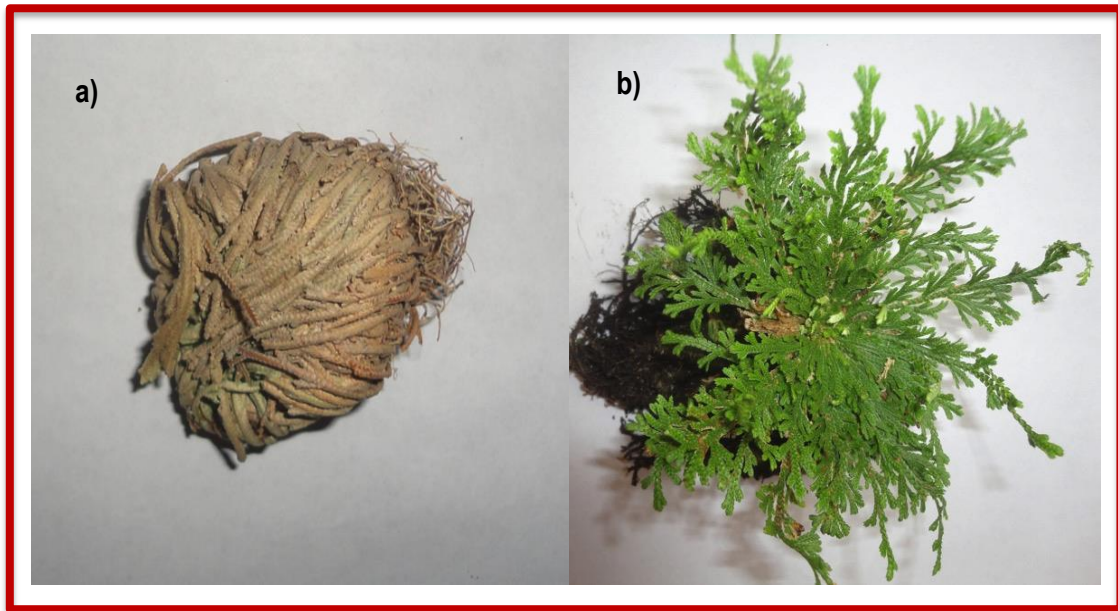


Figura 4. Planta de Resurrección, *Selaginella lepidophylla*, **a)** deshidratada y **b)** rehidratada.

porcentual de identidad con ScTPS1 sugirió que podría aprovecharse el modelo de la levadura *S. cerevisiae* para caracterizar bioquímica y molecularmente a este gen y su proteína (Zentella *et al.*, 1999). La levadura posee 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. Una vez clonando al gen *SITPS1* en un vector de expresión adecuado para la levadura, se procedió a complementar a la mutante *tps1Δ* y la doble mutante *tps1Δ/tps2Δ*, 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 mutante para sintetizar trehalosa, que corrigió otros defectos asociados a esta carencia, como la capacidad de crecer en glucosa y recuperación de la tolerancia a temperaturas altas y estrés osmótico (Zentella *et al.*, 1999). También se ha descrito la purificación y determinación de la actividad enzimática de la TPS de *S. lepidophylla*, que aumenta significativamente al deshidratar la planta (Figueroa-Soto *et al.*, 2004; Valenzuela-Soto *et al.*, 2004).

Para 2001 ya estaba completa la secuencia del genoma de *A. thaliana*, así que fue posible hacer una búsqueda sistemática de homólogos de TPS y descubrir una familia multigénica de 11 genes, divididos en cla-

se I y clase II, debido a que contienen dos dominios: uno similar a TPS en los genes *AtTPS1* a *AtTPS4*, y otro hacia el extremo carboxilo similar a TPP en los genes *AtTPS5* a *AtTPS11* (Leyman *et al.*, 2001). La clase I posee un dominio TPS con alta homología con OtsA de *E. coli* y con ScTPS1 de *S. cerevisiae* y un dominio TPP con baja similitud al mismo; mientras que en la clase II las proteínas codificadas contienen un dominio TPP con similitud significativa a OtsB y ScTPS2 y poca similitud a TPS. Hasta ahora, sólo se ha demostrado la función de cuatro de los 11 genes TPS. El gen *AtTPS1* está involucrado en el desarrollo del embrión y la señalización por azúcares y ácido abscísico (ABA) (Eastmond *et al.*, 2002; Avonce *et al.*, 2004). Se ha descrito que la proteína AtTPS5 interactúa con el coactivador transcripcional MBF1c, ambos inducibles por calor, y las mutantes deficientes en *AtTPS5* son termosensibles (Suzuki *et al.*, 2008). Por otro lado, *AtTPS6* regula la arquitectura de la planta, la forma de las células epidérmicas y la ramificación de los tricomas (Chary *et al.*, 2008). En el caso de *AtTPS11*, está involucrado en la defensa contra áfidos (Singh *et al.*, 2011).

Respecto a los homólogos TPP en *A. thaliana*, se identificó una familia multigénica de 10 elementos, de los cuales sólo se ha demostrado actividad catalítica para AtTPPA y AtTPPB, con base a la complementa-

ción de la mutante *tps2Δ* de la levadura (Vogel *et al.*, 1998; Avonce *et al.*, 2006).

En las TPS de plantas, como AtTPS1 y SITPS1 de *Arabidopsis* y *S. lepidophylla*, respectivamente, además del dominio TPS destacan otros dos dominios: una región de alrededor de 100 aminácidos (N-terminal) y otra en el extremo carboxilo de mayores dimensiones que muestra cierta homología con TPP. Ante la interrogante del posible significado de los dominios N-terminal y carboxilo de las TPS de plantas, se obtuvieron distintas variantes en tamaño de los genes y las proteínas SITPS1 y de AtTPS1 por medio de la ingeniería genética (Van Dijck *et al.*, 2002). Se demostró que podían eliminarse tanto el extremo N-terminal como el carboxilo y mantener la actividad catalítica de la proteína, prácticamente al mismo nivel de la enzima nativa, al probarse en el sistema heterólogo de 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 T6P, al expresarse en el mismo sistema de levadura. También se incrementó el contenido de trehalosa, atribuible a la actividad endógena de la TPP (Van Dijck *et al.*, 2002). Como complemento al trabajo anterior, se describió el aislamiento y caracterización de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa de *S. lepidophylla*, que demostró que la estructura del gen y su actividad catalítica son similares a las de sus homólogos en *A. thaliana* (Pampurova *et al.*, 2014). Recientemente, se clonó el gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Selaginella pulvinata* y se comprobó que, al igual que como se había demostrado para *S. lepidophylla* y *A. thaliana*, aumenta significativamente la actividad de la enzima al trincar su extremo N-terminal (Zhao *et al.*, 2013).

La transformación genética de plantas con el gen de la TPS, si bien confiere tolerancia a sequía provoca, además efectos secundarios no deseables que pueden ser leves o graves, según el gen empleado. Por ejemplo, si se utiliza el gen de *S. cerevisiae* o de *E. coli* en

tabaco, aparecen alteraciones morfológicas severas (Holmström *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997). En el caso de la sobreexpresión del gen *AtTPS1* de *A. thaliana* en la misma planta, no se observaron los defectos anteriores pero sí un retraso en la floración (Avonce *et al.*, 2004). Estas alteraciones en el desarrollo y morfología han sido atribuidos al contenido elevado del intermediario T6P, que no alcanza a ser convertido a trehalosa por las fosfatasa endógenas, aunque ahora se sabe que está involucrado en la regulación de la glicólisis y desarrollo del embrión (Rolland *et al.*, 2006). Con la intención de construir una enzima más eficiente que evite la acumulación de T6P y sus consecuentes efectos no deseados, se han obtenido genes quiméricos que contienen los dominios TPS y TPP en una sola enzima bifuncional. Seo *et al.*, (2000) fusionaron traduccionalmente OtsA y OtsB de *E. coli* y obtuvieron una nueva enzima bifuncional, capaz de producir trehalosa sin acumular niveles detectables de T6P, lo cual ha permitido obtener plantas transgénicas de arroz con tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003). También, se ha descrito una enzima bifuncional, a través de la fusión de genes de *S. cerevisiae* que codifican para TPS1, con el dominio carboxilo de la TPS2 (Miranda *et al.*, 2007). La nueva proteína ScTPS1-TPS2 pudo complementar a la doble mutante *tps1Δ/tps2Δ* de levadura, que restauró por completo la capacidad de biosintetizar trehalosa. Esta construcción quimérica que codifica para una proteína bifuncional, fue usada para transformar *A. thaliana* y *Medicago sativa* L. Los resultados en ambos casos mostraron que las plantas son capaces de tolerar sequía extrema, salinidad, congelamiento y altas temperaturas (Miranda *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2009). También se obtuvieron plantas transgénicas de banano (*Musa acuminata* 'Grand Nain') con el gen mencionado, aunque en este caso sólo se ensayó tolerancia a salinidad (Santamaría *et al.*, 2009). Actualmente se trabaja, en el Instituto Tecnológico de Roque, en colaboración con otros grupos, para evaluar la enzima bifuncional ScTPS1-TPS2 en cultivos de importancia agronómica.

La trehalosa como molécula señal

Para analizar los efectos de la sobreexpresión del gen *AtTPS1* en *A. thaliana*, se crecieron plantas durante cuatro 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 de 90% de agua (Avonce *et al.*, 2004). Sin embargo, al adicionar nuevamente agua, las plantas que sobreexpresaban el gen *AtTPS1* fueron capaces de rehidratarse y continuar su ciclo de vida normal

hasta floración y producción de semillas fértiles, mientras que las plantas tipo silvestre murieron por deshidratación (Figura 5).

De manera inesperada, además del papel del gen *AtTPS1* como responsable de la tolerancia al estrés por sequía, se encontró otra función del mismo que es fundamental para las plantas. Eastmond *et al.* (2002) generaron en *Arabidopsis* una mutante recesiva *tps1-1* que, en condición homocigota, resultó letal para el desarrollo del embrión. El desarrollo embrionario pudo ser parcialmente rescatado *in vitro* al reducir el suministro de sacarosa, no así al proporcionar trehalosa o T6P, tal vez debido a la falta de transporte hacia el interior de la célula de este último.

En otro trabajo se encontró que la actividad catalítica de *AtTPS1* también es esencial para que *Arabidopsis* pase del estado vegetativo a la etapa de floración, ya que la mutante *tps1* puede rescartarse con el gen *otsA* de *E. coli* (que tiene el dominio TPS pero carece de los dominios extras presentes en *AtTPS1*), bajo el control de un promotor inducible por dexametasona. La adición o suspensión del inductor en distintas etapas de desarrollo de la planta mostró que, además de ser esencial para el desarrollo del embrión, también es clave para la floración, ya que al suspender el suministro de dexametasona al finalizar el desarrollo vegetativo, la planta es incapaz de desarrollar yemas florales (Van Dijken *et al.*, 2004).

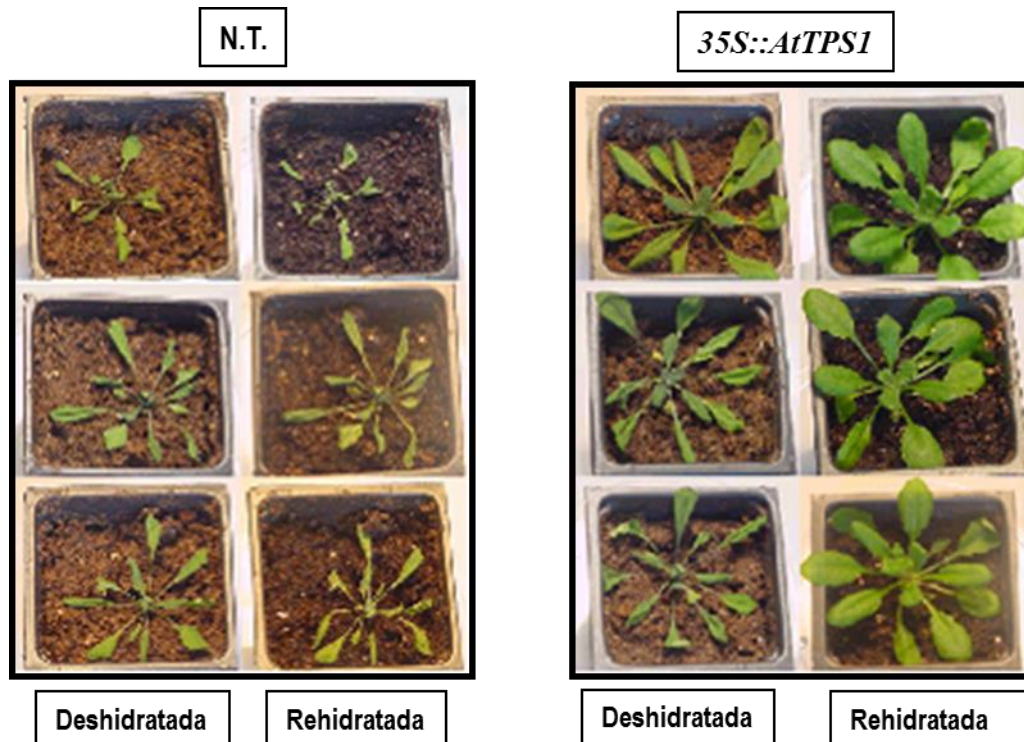


Figura 5. Efecto de la sobre-expresión del gen *AtTPS1* en la tolerancia a sequía en *Arabidopsis thaliana*. Plantas de cuatro semanas sometidas a deshidratación durante 14 días. Después de 24 horas de la adición de agua (rehidratación), las plantas transgénicas continuaron con su ciclo de vida, mientras que las plantas silvestres murieron. 35S::AtTPS1, líneas transgénicas. N.T., plantas no transformadas de *A. thaliana* cv. Columbia.

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que las enzimas HXK1 y *AtTPS1* están involucradas en una vía de transducción celular, encargada de la percepción de glucosa (Avonce *et al.*, 2004). En ese trabajo se observó que la sobreexpresión de *AtTPS1* produjo insensibilidad tanto a glucosa como a ácido abscísico (ABA) en plántulas, y que el gen *AtTPS1* se inhibe en pre-

sencia de glucosa, pero esta inhibición es superada en un fondo genético con *knock-out* de *HXK1* (Jang *et al.*, 1997). Más adelante se encontró que la sobreexpresión de *otsA* de *E. coli* en *Arabidopsis* no era capaz de contrarrestar la inhibición ejercida por glucosa (Schluepmann *et al.*, 2003). Esta aparente contradicción se explica si se compara la estructura de

OtsA con AtTPS1: la segunda proteína posee un extremo amino y otro carboxilo, adicional al dominio catalítico que es equivalente a OtsA. El extremo amino terminal de la enzima (de alrededor de 100 aminoácidos), ejerce una regulación negativa en la actividad enzimática, ya que cuando se elimina esta región, la actividad enzimática de AtTPS1 se incrementa hasta 40 veces (Van Dijck *et al.*, 2002). Esto implica que, adicionalmente a los efectos regulatorios del intermediario T6P y su efecto en glicólisis, la proteína AtTPS1, y en particular su dominio N-terminal, debe jugar un papel en una o varias vías de transducción de la percepción de glucosa y de ABA. Se ha propuesto un modelo en el que AtTPS1 regularía negativamente la transcripción del gen *ABI4*, en una cascada de señalización que tiene que ver con la germinación, desarrollo de la parte aérea y expansión y desarrollo normal de cotiledones, y que concluye con el desarrollo temprano de la plántula (Avonce *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que la T6P es una señal de disponibilidad y concentración apropiada de sacarosa en la planta (Delatte *et al.*, 2011). Por medio de la inhibición de la proteína cinasa SnRK1, la T6P influye

en las cantidades relativas de sacarosa y almidón acumulados en hojas durante el día, y regula la velocidad de degradación de almidón por la noche para que coincida con la demanda de sacarosa. La inhibición de SnRK1 mediada por T6P, es parte de un circuito regulador del crecimiento de tejidos jóvenes, metabólicamente activos. SnRK1 es una proteína cinasa activada por AMP presente en eucariontes y que funciona como un regulador central de los niveles de energía y estatus metabólico de la célula (Ghillebert *et al.*, 2011). La acumulación de T6P en respuesta a los altos niveles de sacarosa en una célula inhibe la actividad de la cinasa SnRK1 y promueve así procesos anabólicos y crecimiento. Cuando los niveles de T6P caen debido a la baja de glucosa-6-fosfato, uridina difosfoglucosa y NADPH, SnRK1 promueve procesos catabólicos requeridos para responder a necesidades de energía de la planta y privación de carbono (Delatte *et al.*, 2011). El metabolismo de trehalosa está regulado por el factor de transcripción bZIP11, que regula el metabolismo, inhibe el anabolismo y promueve el catabolismo ante falta de luz y carbono y condiciones de estrés (Ma *et al.*, 2011).

La trehalosa en la interacción planta-microorganismo

Desde hace varios años se sabe de la presencia de trehalosa en algunos tipos de interacciones, simbioses y patogénicos. Por ejemplo, Streeter (1985) describió que las bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de sintetizar trehalosa, al detectar su acumulación en bacteroides y nódulos. Müller *et al.* (1995) descubrieron la existencia de mayor actividad de la enzima trehalasa en el citosol que en bacteroides de nódulos de soya, infectados con *Rhizobium*. Por otra parte, se ha visto que durante la senescencia de los nódulos de soya, la trehalosa aumenta y la actividad de la enzima nitrogenasa disminuye, al igual que sacarosa y almidón. Sin embargo, el contenido de trehalosa no es consumido y el número de bacterias reaisladas del nódulo permanece constante. Con el fin de estudiar la función de la trehalosa acumulada en rizobios durante simbiosis con las leguminosas, se generó una cepa de *Rhizobium etli* que sobreexpresa el gen *OtsA*, y un mutante de la misma bacteria en el gen homólogo, con el fin de analizar su efecto sobre la supervivencia de vida libre de *R. etli* y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* (Suárez *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que las bacterias en vida libre que tienen mayor contenido de trehalosa, mostraron mayor tolerancia al estrés osmótico y, por el contrario,

la mutante *otsA* era osmosensible. Además, las plantas de frijol inoculadas con la cepa que sobreexpresa *OtsA*, formaron mayor número de nódulos y actividad de la nitrogenasa, mayor biomasa, aumento en tolerancia a sequía e incremento de 56% de rendimiento de grano, en condiciones de riego o de estrés. Los datos anteriores se confirmaron en otro sistema planta-microorganismo, donde también se observó un aumento de tolerancia a la sequía y biomasa de plantas de maíz, inoculadas con *Azospirillum brasilense* modificada genéticamente con genes de la biosíntesis de trehalosa (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009). Las pruebas en los estudios anteriores se realizaron en invernadero, por tratarse de una cepa modificada genéticamente; por lo que, por ahora, no es posible evaluar si el incremento en trehalosa en las rizobacterias tiene impacto en el rendimiento en condiciones de campo. En otro trabajo, se inoculó *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner, con mayor contenido de trehalosa a plantas de tomate en condiciones hidropónicas, y se observó que las plantas fueron capaces de tolerar hasta 200 mM de cloruro de sodio (Cortés-Jiménez *et al.*, 2014), lo que abre la posibilidad de utilizar agua salada para el riego de hortalizas.

La presencia de trehalosa en algunos tipos de interacciones planta-patógeno también juega un papel importante. Se sabe que grandes cantidades de trehalosa se acumulan en raíces e hipocotilos de *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. colonizados por el hongo *Plasmiodiophora brassicae* Woronin (Keen y Williams, 1969). El papel de la trehalosa durante el proceso de infección, proviene de los estudios realizados por Zaragoza *et al.* (1998), en donde la disrupción del gen *TPS1* (que codifica para TPS) en *Candida albicans*, que produce la candidiasis en animales y humanos inmunosuprimidos, ocasionó un descenso en la infección del patógeno, al afectar el desarrollo de las hifas. También la disrupción del gen *TPS2* (que codifica para TPP) en *C. albicans*, redujo la infección y convirtió a las cepas en termo sensibles (Zaragoza *et al.*, 2002). Las enzimas *TPS1* y *TPS2*, son candidatos interesantes como blancos para agentes terapéuticos antifúngicos, ya que ambas enzimas no se encuentran

en humanos ni en otras especies animales.

Al analizar con detalle el proceso de infección de *A. thaliana* con *P. brassicae*, agente causal de la agalla de la raíz, Brodmann *et al.* (2002) determinaron que se acumula trehalosa y que ésta es, aparentemente, producida por el hongo y que, además, se induce la expresión de la trehalasa en la planta. Se propone que la trehalosa del hongo puede alterar el metabolismo de carbono de la planta e inducir, como mecanismo de defensa de la planta, la expresión de la trehalasa. En otro reporte, Foster *et al.* (2003), eliminaron el gen *TPS1* del hongo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr agente causal de la roya del arroz; la mutante mostró esporulación pobre y patogenicidad reducida. La disminución de la patogenicidad se atribuyó a una falta de trehalosa al inicio de la infección, insuficiente para generar la presión osmótica necesaria para que los apresorios penetren la pared celular.

Perspectivas

El descubrimiento de la capacidad para biosintetizar trehalosa en la mayoría de las especies de los distintos dominios del árbol de la vida, ha sido un hallazgo sorprendente e inesperado. Por otro lado, se ha encontrado que la trehalosa, el intermediario T6P y la proteína TPS1, están involucrados en procesos tan importantes como desarrollo embrionario, floración, percepción de azúcares, fotosíntesis, tolerancia a estrés abiótico e interacciones planta-microorganismo. Además de haber revelado su importancia en tales procesos, siguen pendientes varias preguntas, como por ejemplo, cuál es la función de la mayoría de los genes TPS en plantas, ya que hasta ahora sólo se conoce la función de cuatro genes en la planta modelo *Arabidopsis*, restando por averiguar la función de los otros siete genes *TPS1* y los ocho restantes de *TPP*. Desde hace algunos años éste se ha convertido en uno de los campos de investigación más novedosos en la fisiología y biología molecular de las plantas.

Como consecuencia de estas investigaciones básicas, 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 toleran-

cia a sequía, salinidad, frío y calor. También, es probable que en un futuro cercano se pueda manipular la fotosíntesis y distribución de carbohidratos, al ser modificado el metabolismo de la trehalosa. En el caso de especies frutales, hortalizas y plantas ornamentales, sería interesante mejorar la conservación post-cosecha de tejidos y órganos que acumulan trehalosa endógenamente, mediante manipulación genética. Un campo interesante sería el desarrollo de 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 aplicación en la conservación de recursos genéticos vegetales, al obviar costos altos por refrigeración.

Se vislumbra, también, que comprender el papel del metabolismo de la trehalosa en las interacciones planta-microorganismo, contribuiría al diseño de nuevas estrategias para el control de algunas enfermedades causadas por hongos y bacterias, tanto de animales como plantas, así como un mejoramiento de la eficiencia de procesos simbióticos como el de frijol-*Rhizobium* (*Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli*), o el de otras rizobacterias en interacción con gramíneas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avonce N; Leyman B; Mascorro-Gallardo JO; Van Dijck P; Thevelein JM; 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 JM; Iturriaga G (2005). Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 276-279.
- Avonce N; Mendoza-Vargas A; Morett E; Iturriaga G (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6: 9.
- Blázquez MA; Santos E; Lisset-Flores C; Martínez-Zapater JM; Salinas J; Gancedo C (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
- Brodmann A; Schuller A; Ludwig-Müller J; Aeschbacher RA; Wiemken A; Boller T; Wingler A (2002). Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with trehalose-producing pathogen *Plasmiodiophora brassicae*. *MPMI* 15: 693-700.
- Cabib E; Leloir L (1958). The biosynthesis of trehalose-phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275.
- Clegg JS (2001). Cryptobiosis-a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol.* 128: 613-624.
- Chary SN; Hicks GR; Choi YG; Carter D; Raikhel NV (2008). Trehalose-6-Phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 97-107.
- Colaço C; Sen S; Thanagavelu M; Pinder S; Roser B (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technol.* 10: 1007-1111.
- Cortés-Jiménez D; Gómez-Guzmán A; Iturriaga G; Suárez R; Montero Alpírez G; Escalante FME (2014). Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant. *Braz. J. Microbiol.* 45: 613-620.
- Crowe JH; Crowe LM; Chapman D (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science* 223: 209-217.
- Crowe JH; Hoekstra FA; Crowe LM (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Crowe JH; Crowe LM; Oliver AE; 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.
- Delatte TL; Sedijani P; Kondou Y; Matsui M; de Jong GJ; Somsen GW; Wiese-Klinkenberg A; Primavesi LF; Paul MJ; Schlupepmann H (2011). Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol.* 157: 160-174.
- Drennan P; Smith MT; Goldsworthy D; van Staden J (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* 142: 493-496.
- Eastmond PJ; Van Dijken AJH; Spielman M; Kerr A; Dickinson HG; Jones JDG; Smeekens S; Graham IA (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 AD; Pan YT; Pastuszak I; Carroll D (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- Eroglu A; Russo MJ; 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.
- Fairbairn D; Passey RF (1957). Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. *Exp. Parasitol.* 6: 566-574.
- Figuerola-Soto CG; Iturriaga G; Valenzuela-Soto EM (2004). Actividad de Trehalosa 6-fosfato Sintasa en Respuesta a Hidratación y Desecación en Plantas de *Selaginella lepidophylla*. *Rev. Fitotec. Mex.* 27: 17-22.
- Foster AJ; Jenkinson JM; Talbot NJ (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.* 22: 225-235.
- Garg AK; Kim JK; Owens TG; Ranwala AP; Choi YD; Kochian LV; Wu RJ (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15898-15903.
- Ghillebert R; Swinnen E; Wen J; Vandesteene L; Ramon M; Norga K; Rolland F; Winderickx J (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J.* 278: 3978-3990.
- Higashiyama T (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* 74: 1263-1269.
- Holmström KO; Mäntylä E; Welin B; Mandal B; Palva E; Tunnela O; Londesborough J (1996). Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- Iturriaga G; Gaff DF; Zentella R (2000). New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Austral. J. Bot.* 48: 153-158.
- Iturriaga G; Suárez R; Nova-Franco B (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Inter. J. Mol. Sci.* 10: 3793-3810.
- Iwaya-Inoue M; Takata M (2001). Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 36: 946-950.
- Jang JC; León P; Zhou L; Sheen J (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9: 5-19.
- Jang IC; Oh SJ; Seo JS; Choi WB; Song SI; Kim CH; Kim YS; Seo HS; Choi YD; Nahm BH; Kim JK (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 tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- Katsuno M; Adachi H; Sobue G (2004). Sweet relief for Huntington disease. *Nature Med.* 10: 123-124.
- Keller F; Schellenberg M; Wiemken A (1982). Localization of trehalase in vacuoles and of trehalase in the cytosol of yeast. *Archives Microbiol.* 131: 298-301.
- Keen NT; Williams PH (1969). Translocation of sugars into infected cabbage tissues during club root development. *Plant Physiol.* 44: 748-754.
- Leyman B; Van Dijck P; Thevelein JM (2001). An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 6: 510-513.
- Leyman B; Avonce N; Ramon M; Van Dijck P; Iturriaga G; Thevelein JM (2006). Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *J. Biotechnol.* 121: 309-317.
- Lins RD; Pereira CS; Hunenberger PH (2004). Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55: 177-186.
- Luyckx J; Baudouin C (2011). Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. *Clin. Ophthalmol.* 5: 577-581.
- Ma J; Hanssen M; Lundgren K; Hernández L; Delatte T; Ehlert A; Liu CM; Schlupepmann H; Dröge-Laser W; Moritz T; Smeekens S; Hanson J (2011). The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytol.* 191: 733-745.
- Maruta K; Hattori K; Nakada T; Kubota M; Sugimoto T; Kurimoto M (1996). Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *BBA* 1289: 10-13.
- Miranda JA; Avonce N; Suárez R; Thevelein JM; Van Dijck P; Iturriaga G (2007). A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411-1421.
- Müller J; Boller T; Wiemken A (1995). Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor and phytohormones on trehalose metabolism in roots and roots nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197: 362-368.
- Orosio-Saenz A; Mascorro-Gallardo JO; González-Arao MT; Iturriaga G; Engelmann F (2014). Evaluation of endogenous and exogenous effect of trehalose on regeneration of cryopreserved chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) shoot-tips. *Acta Hort. (ISHS)* 1039: 99-105.
- Paiva CLA; Panek AD (1996). Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 293-314.
- Pampurova S; Verschooten K; Avonce N; Van Dijck P (2014). Functional screening of a cDNA library from the desiccation-tolerant plant *Selaginella lepidophylla* in yeast mutants identifies trehalose biosynthesis genes of plant and microbial origin. *J. Plant Res.* 127: 803-813.

- Richards AB; Krakowka S; Dexter LB; Schmid H; Wolterbeek APM; Waalkens-Berendsen DH; 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.
- Rodríguez-Salazar SJ; Suárez R; Caballero-Mellado J; Iturriaga G (2009). Trehalose accumulation in *Azospirillum* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 52-59.
- Rolland F; Baena-Gonzalez E; Sheen J (2006). Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.
- Romero C; Bellés JM; Vayà JL; Serrano R; Culiáñez-Macià FA (1997). Expression of the phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.
- Santamaría JM; Hernández-Portilla D; Chi-Manzanero B; Espadas F; Castaño E; Iturriaga G; Rodríguez-Zapata LC (2009). Incorporation of two trehalose biosynthetic genes in banana increases trehalose levels and protects the photosynthetic apparatus from salt-stress damage. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 84: 665-671.
- Schiraldi C; Di Lernia I; De Rosa M (2002). Trehalose production : exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 2: 420-425.
- Schluepmann H; Pellny T; Van Dijken A; Smeekens S; Paul M (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6849-6854.
- Seo HS; Koo YJ; Lim JY; Song JT; Kim CH; Kim JK; Lee JS; Choi YD (2000). Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2484-2490.
- Singh V; Louis J; Ayre BG; Reese JC; Shah J (2011). Trehalose phosphate synthase11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *Plant J.* 67: 94-104.
- Streeter J (1985). Accumulation of alpha-alpha-trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J. Bacteriol.* 164: 78-84.
- Streeter JG; Gomez ML (2006). Three enzymes for trehalose synthesis in *Bradyrhizobium* cultured bacteria and in bacteroids from soybean nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4250-4255.
- Suárez R; Wong A; Ramírez M; Barraza A; Orozco MC; Cevallos MA; Lara M; Hernández G; Iturriaga G (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *MPMI* 21: 958-966.
- Suárez R; Calderón C; Iturriaga G (2009). Improved tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Sci.* 49: 1791-1799.
- Suzuki N; Bajad S; Shuman J; Shulaev V; Mittler R (2008). The Transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 283: 9269-9275.
- Tsuzaki 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. *BBA* 1290: 1-3.
- Valenzuela-Soto EM; Márquez-Escalante JA; Iturriaga G; Figueroa-Soto CG (2004). Trehalose 6-phosphate Synthase from *Selaginella lepidophylla* plants: Purification and Properties. *BBRC* 313: 314-319.
- Van Dijk P; Mascorro-Gallardo JO; De Bus M; Royackers K; Iturriaga G; Thevelein JM (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 Dijken AJH; Schluepmann H; Smeekens SCM (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 RA; Müller 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: 673-83.
- Weisburd S (1988). Death-defying dehydration. *Science News* 133: 107-110.
- Zaragoza O; Blázquez MA; 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.
- Zaragoza O; de Virgilio C; Ponton J; Gancedo C (2002). Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiol.* 148: 1281-1290.
- Zentella R; Mascorro-Gallardo JO; Van Dijk P; Folch-Mallol J; Bonini B; Van Vaecq C; Gaxiola R; Covarrubias AA; Nieto-Sotelo J; Thevelein JM; 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.
- Zhao SM; Fu FL; Gou L; Wang HG; He G; Li WL (2013). Cloning and truncation modification of trehalose-6-phosphate synthase gene from *Selaginella pulvinata*. *Gene* 512: 4141-421.