

CONCLUSIONES

1. El cDNA de la trehalasa de alfalfa codifica para 553 aminoácidos, y su homología entre las trehalasas reportadas es mas cercana a la trehalasa de soya.
2. La trehalasa se expresa mayormente en tallo y hojas en alfalfa.
3. La expresión del RNAs para trehalasa disminuyó la actividad de esta enzima en las plantas transgénicas de tabaco.
4. El RNAs de alfalfa puede ser utilizado para inhibir la expresión de trehalasa de otras especies.
5. El promotor rd29A de *Arabidopsis thaliana* funcionó adecuadamente para la expresión de RNAs.
6. La expresión transgénica del RNAs mejoró la capacidad de crecimiento de las plantas de tabaco *in vitro*.
7. La expresión transgénica del RNAs eliminó la auxotrofia para sacarosa del cultivo de plantas de tabaco *in vitro*.
8. La expresión transgénica del RNAs permite la regeneración de brotes de tabaco en ausencia de sacarosa.

LITERATURA CITADA

Citas Bibliográficas

- Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T. y A. Wiemken. 1999. Purification of trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE1* is expressed at low level in multiple tissues. *Plant Physiology*, **119**: 489-495.
- Andersson, U., Levander, P. y P. Rådström. 2001. Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 42707-42713.
- Austin, S., Bingham, E.T., Koegel, R.G., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Straub, R.J. y Burgess, R.R. 1994. An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. *Ann N Y Acad Sci.*, **721**: 234-244.
- Bajaj, Sh., Targolli, J., Liu, L-F., Ho, T.H.D., y R. Wu. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration stress tolerance in plants. Artículo de revisión. *Molecular Breeding*, **5**: 493-503.
- Bent, A.F. 2000. Arabidopsis in Plant Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiol.*, **124**: 1540-1547.
- Bevan, M.W., Rook, F., Baier, M., Hemmann, G., Hadingham, S. y R. Holman. P2.2- Genetic analysis of sugar-mediated gene expression in *Arabidopsis*. En Halford, N.G. e I.A. Graham, 2002. P2- Regulation of carbon metabolism: sensing, signaling and partitioning. ELSIEVER Abstracts/Comparative Biochemistry and Physiology Part A 132: S101-S114.
- Birch, R.G. 1997. Plant Transformation: Problems and strategies for practical application. *Ann Rev Plant Physiol.*, **48**: 297-326.
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C-L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J. y C. Gancedo. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Short communication. *The Plant Journal*, **13**: 685-689.
- Buell, C.R., Wing, R.A., McCombie, W.R., Messing, J. y Q. Yuan. 2003. In-depth view of structure, activity and evolution of rice chromosome 10. *Science*, **300**: 1566-1569.
- Cabib, E. y F.L. Leloir. 1958. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **231**: 951-959.

- 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.
- Carnici, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M. y Y. Hayashizaki. 1998. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Biochemistry*, **95**: 520-524.
- Chiou-Fen, Ch. y Meyerowitz, E.M., 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **97**: 4985-4990.
- Colaco C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. Y B. Roser. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (NY)*, **10**: 1007-1011.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **54**: 579-599.
- Cueto W., J.A. y Quiroga G., H.M. 2000. Fertilización de la alfalfa. Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México. Libro técnico No 2. *SAGAR, INIFAP, CIRNOC-CELALA*. Octubre 2000. pp. 19-28.
- De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. y A. Wiemken. 1993. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. Jour. Of Biochem.*, **212**: 315-323.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. y Paiva N.L. 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses --a review. *Gene*, **179**: 61-71.
- Dougherty W.A. y T.D. Parks. 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new?. *Current Opinion y Cell Biology.*, **7**: 399-405.
- Eastmond, P.J., van Dijken, Anja J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C. y I.A. Graham. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal*, **29**: 225-235.
- Eastmond, P.J., y I.A. Graham. 2003. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate. *Curr Op Plant Biol.*, **6**: 231-235.

- Elbein, A.D., 1974. The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **30**: 227-256.
- Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R., y A.M. Dandekar. 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *PNAS*, **98**: 13437-13442.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.-B., Bellini, C. y H. Vaucheret. 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *PNAS*, **97**: 11650-11654
- Goddijn, O.J.M., 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 Physiol.*, **113**: 181-190.
- Goddijn, O. y S. Smeekens. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, **14**: 143-146.
- Goddijn, O.J.M., y K. van Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Sci.*, **4**: 315-319.
- Haer, F. 1969. An introduction to chromatography. Ann Arbor Science Pub. Michigan.
- Hamilton, A.J., Brown, S., Han, Y.H., Ishizuka, M., Lowe, A., Solis, A.G.A. and Grierson, D. 1998. A transgene with repeated DNA causes high frequency post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant J.*, **15**: 737-746.
- Hansen, G. y M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.*, **4**: 226-231.
- Herrera-Estrella, L. y J. Simpson. 1988. Forcing gene expresión in plants. *Plant Molecular Biology. A practical approach.* Oxford, C.H. Shaw Eds. IRL Press. Pp: 131-160.
- Hooykas, P.J.J. y R.A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol.*, **19**: 15-38.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. y K.G. Scrimgeour. 1993. Bioquímica. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Edición en español, 1995. Capítulo 16: Fotosíntesis.
- Inzunza I. M.A. 1991. Respuesta de la alfalfa a diferentes contenidos de humedad del suelo. *Terra*, **9**: 129-138.
- Jorgensen, R.A.; Cluster, P.D.; English, J.; Que, Q. and Napoli, C.A. 1994. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, **31**: 957-973.

- Kassen, I., Mcdougall, J. Y A.R. Strom. 1994. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, **145**: 9-15.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1999. *Nature Biotechnology*, **17**: 287-291.
- Kidd, G. y J. Devorak. 1994. Trehalose is a sweet target for agrobiotechnology. *Bio/Technology*, **12**: 1328-1329.
- Kinney, A.J. 1998. Manipulating flux through plant metabolic pathways. *Curr. Op. In Plant Biol.*, **1**: 173-178.
- Liu, Q., Jasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., y K. Shinozaki. 1998. *The Plant Cell*, **10**: 1391-1406.
- Mandaci, S. y Dobres, M.S. 1997. A promoter directing epidermal expresión in transgenic alfalfa. *Plant Mol Biol.*, **34**: 961-965.
- Matzke, M.A. y J.M. Matzke. 1993. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *CMLS.* , **54**: 94-103
- McKersie, B.D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S.R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. Y Botterman, J. 1993. Superoxide dsmutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, **103**: 1155-1163.
- Müller, J., Boller, T. y A., Wiemken. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.*, **112**: 1-9.
- Müller, J., Boller, T. y A., Wiemken. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. Short communication. *J Plant Phy.*, **153**: 255-257.
- Müller, J., Wiemken, A. y R. Aeschbacher. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci.*, **147**: 37-47.
- Müller, J., Aeschbacher , R.A., Wingler, A., Boller, T. y A., Wiemken. 2001. Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Phy.*, **125**: 1086-1093.
- Nessler, C.L., 1994. Metabolic engineering of plant secondary products. *Transgenic Research.*, **3**: 109-115.
- Nuccio, M., Rhodes, D., McNeil, S.D. y A.D. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Op.in Plant Biol.*, **2**: 128-134.

- Nwaka, S. y H. Holzer. 1998. Molecular biology of trehalose and trehalases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Ac. Res. and Mol. Biol.*, **58**: 197-237.
- Paiva C.L. y A.D. Panek, 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotech. Annu. Rev.*, **2**: 293-314.
- Paul, M., Pellny, T. Y O. Goddijn. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *TRENDS Plant Sci.*, **6**: 197-200.
- Peixoto, D. y A.D. Panek. 1999. The involvement of hexokinases in trehalose síntesis. *Bioch Mol Biol Intl.*, **47**: 873-880.
- Pellny, T.K., Paul, M.J. y J.M. Goddijn. P2.6- Unravelling the role of trehalose-6-phosphate in metabolic signalling in photosynthetic tissue. En Halford, N.G. e I.A. Graham, 2002. P2- Regulation of carbon metabolism: sensing, signalling and partitioning. ELSIEVER Abstracts/Comparative Biochemistry and Physiology Part A 132: S101-S114.
- Penna, S. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalosa in transgenic plants. *TRENS Plant Sci.*, **8**: 355-357.
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A., y R. Mittler. 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, **31**: 319-330.
- Quiroga G., H.M. y R.F. Contreras. 2000. Efectos de la suspensión de riegos durante el verano en la alfalfa en su año de establecimiento. XVIII Congreso Nacional de Fitogenética. Notas Científicas. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Pp 273.
- Ramanjulu, S., y D. Bartels. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 141-151.
- Rolland, F., Moore, B. y J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. Suplemento. *The Plant Cell*, S185-S205.
- 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.
- Roser, B. J. 1991. Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **2**:166-169.
- Roser, B.J. y C. Colaco. 1993. A sweeter way to fresher food. *New Scientist*, **138**:24-28.

- Salinas, S. 2000. La producción de alfalfa en México: pasado, presente y futuro. Memorias del congreso mundial de la leche. Querétaro, Qro. pp:53-54.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Capítulo 11: Fijación de dióxido de carbono y síntesis de carbohidratos. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. 4ª edición. México.
- Sambrook J. y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. Volúmenes 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor, New York, USA. Tercera edición.
- Sato S., Okamoto, K., Minami, R., Kohri, H. Y S. Yamamoto. 1999. Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits. *The Journal of Nutrition*, **129**: 158-164.
- Smeekens, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr Op Plant Biol.*, **1**: 230-234.
- Smeekens, J.C. 1998. Regulating metabolism by modifying the level of trehalose-6-phosphate by inhibiting endogenous trehalase levels. Smeekens Josephus Christianus (NL); MOGEN INT (NL). Patent WO 985061-A. 12 Nov 1998.
- Tabe, L.M., Wardley-Richardson, T., Ceriotti, A., Aryan, A., McNabb, W., More, A. e Higgins, T.J. 1995. A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. *J Anim Sci.*, **73**: 2752-2759.
- Thakur, A. 2002. RNA interferente revolution. Review article. *Elect J Biotech.*, **6**: 39-49.
- Vaucheret H., y M. Fagard. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.*, **17**: 29-35.
- Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T. y A. Wiemken. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *The Plant journal*, **13**: 673-683.
- Uritani, M., Takai, M. y K. Yoshinaga. 1995. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying vacuum. *Journal of Biochemistry*, **117**: 774-779.
- Voinnet, O. y D.C. Baulcombe. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, **389**: 553
- Wesley, S.V., Helliwell, Ch.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Gleave, A.P., Green, A.G. y P.M. Waterhouse. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. TECHNICAL ADVANCE. *The Plant Journal*, **27**: 581-590.
- Wigdorovitz A., Carrillo, C., Dus Santos M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Ríos, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M. y Borca M.V. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral

immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, **255**: 347-353.

Wingler, A., Fritzius, Th., Wiemken, A., Boller, Th. Y R.A. Aeschbacher. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **124**: 105-114.

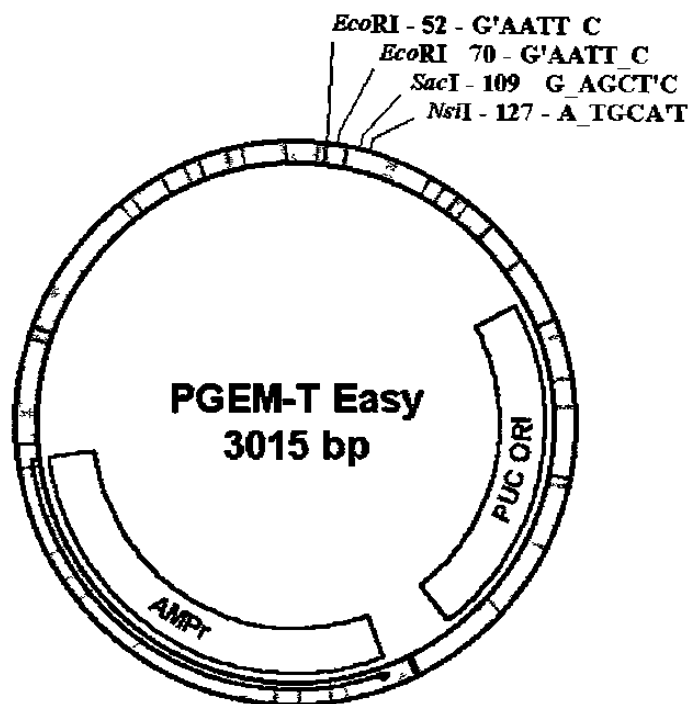
Wingler, A. 2002. The function of trehalosa biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, **60**: 437-440.

Xiong, L., Ishitani, M. y J-K. Zhu. 1999. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. *Plan Physiology.*, **119**: 205-211.

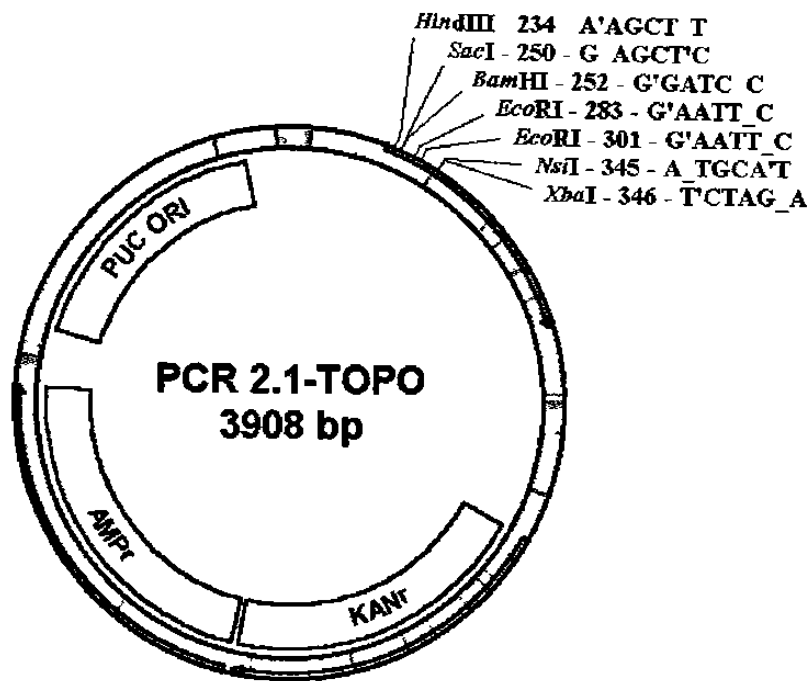
Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1992. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29A gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, **236**: 331-340.

Citas en Internet

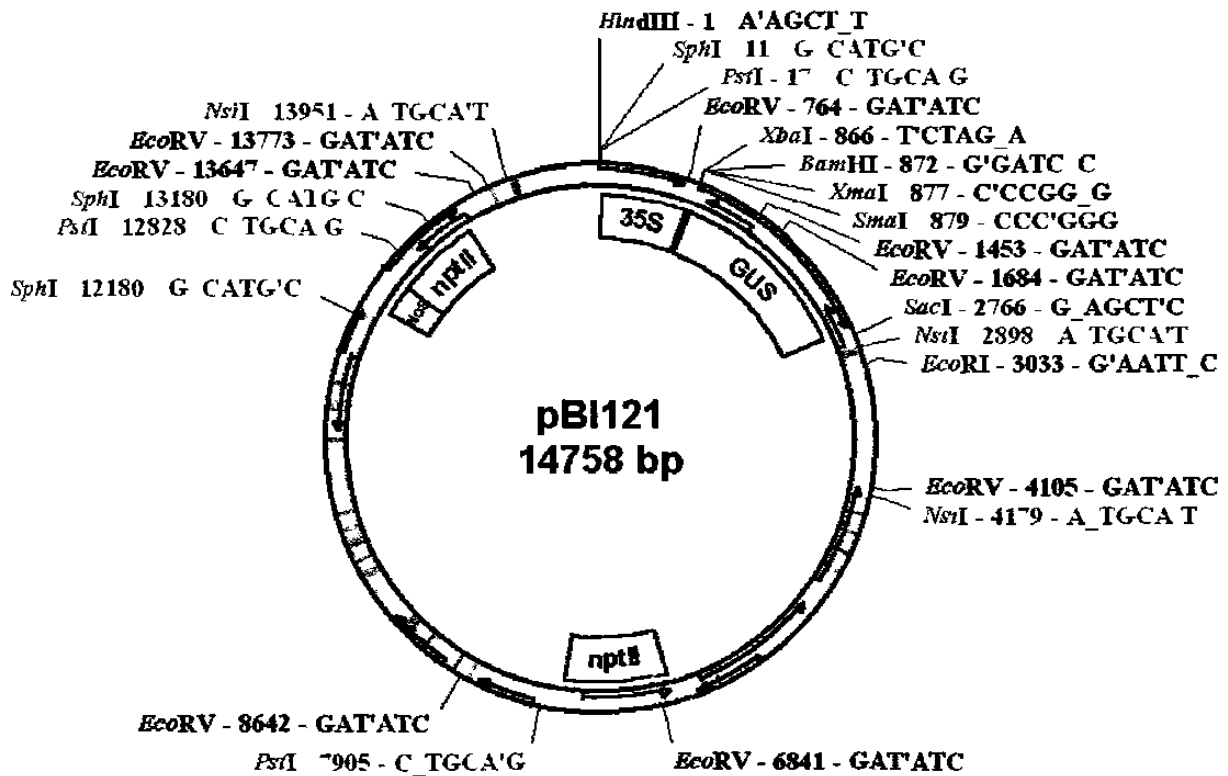
NCBI, National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



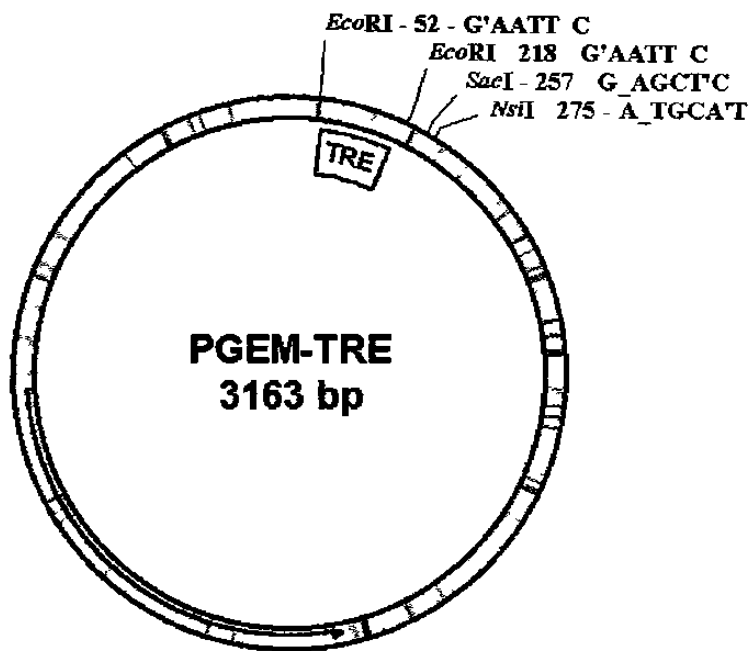
Mapa 1. Vector pGEMT Easy vector para clonación de productos de PCR (PROMEGA, Inc.).



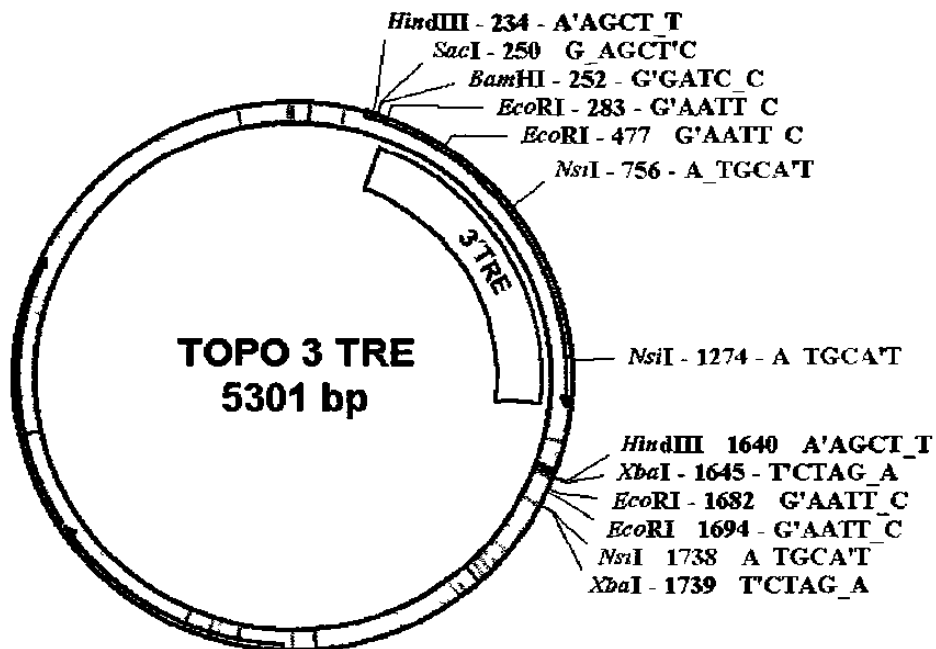
Mapa 2. Vector TOPO TA pCR2.1 para clonación de productos de PCR (Invitrogen, Inc.).



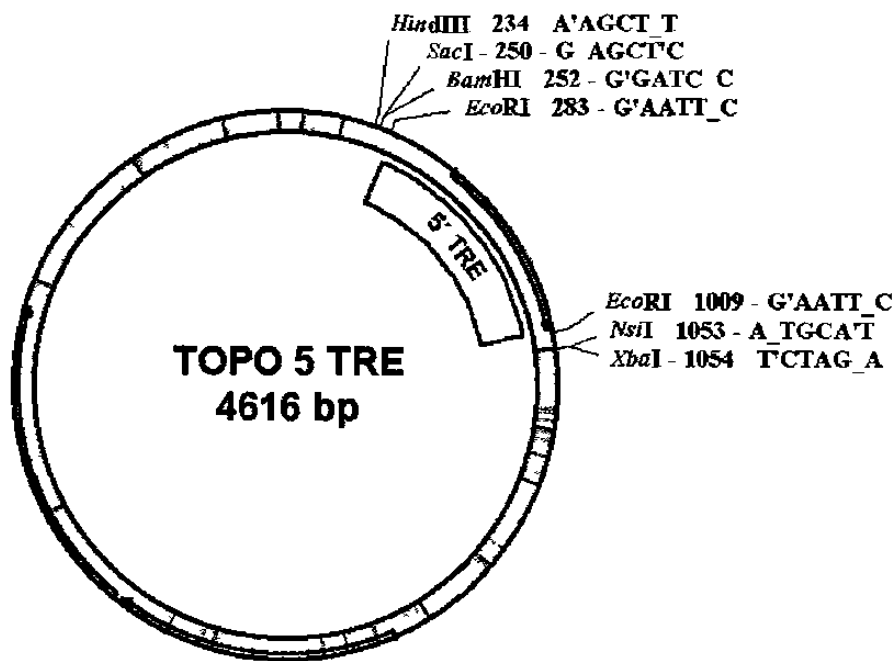
Mapa 3. Vector para expresión en plantas pBI-121 (Clontech, Inc.).



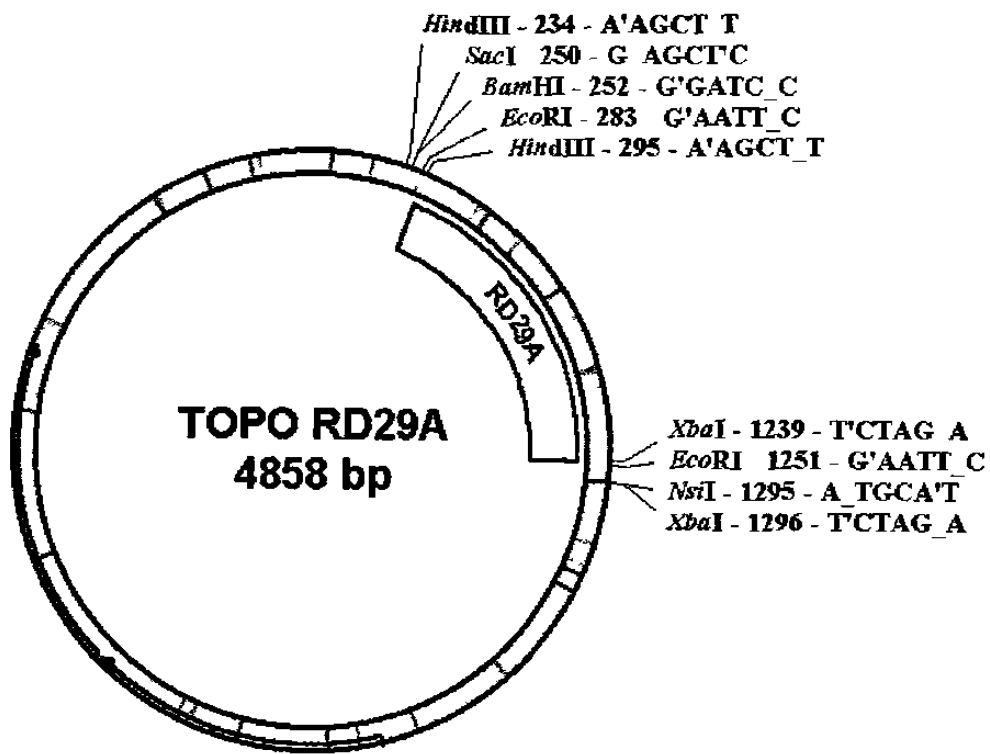
Mapa 4. Plásmido pGEM-TRE resultante de la clonación del fragmento de PCR de 150 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa, en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega^{MR}).



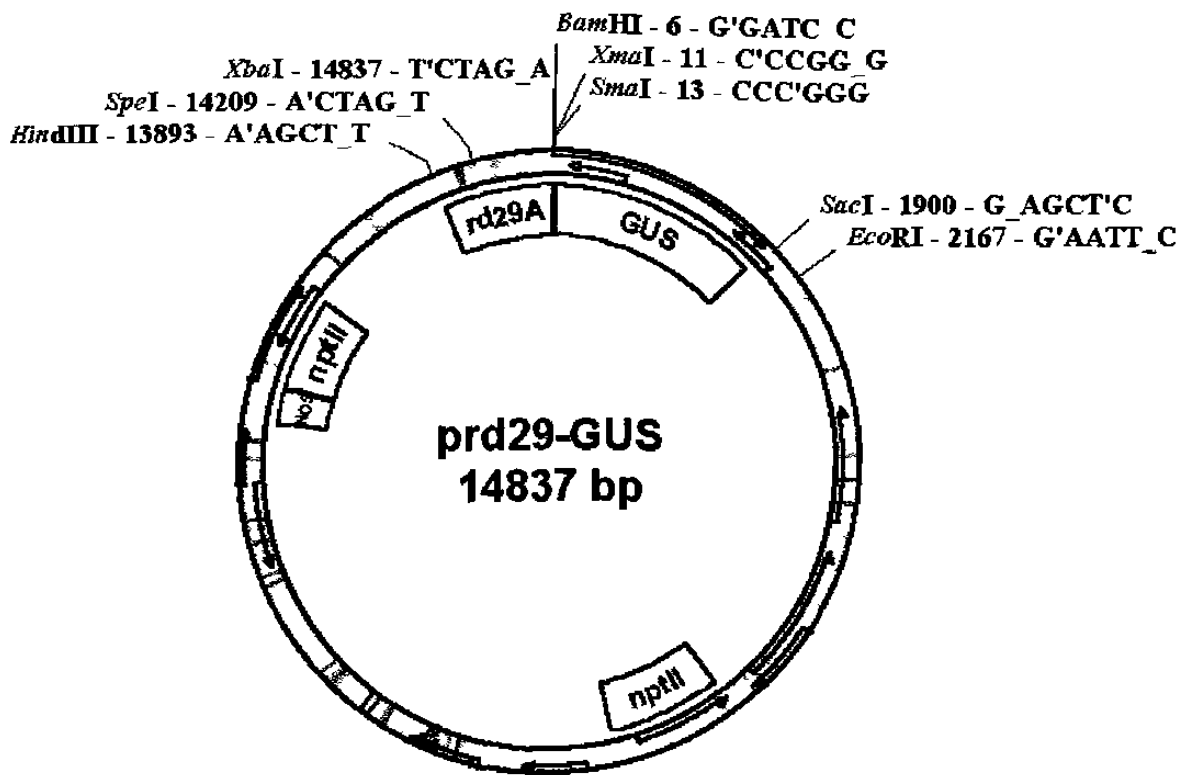
Mapa 5. Plásmido pTOPO-3TRE resultante de la clonación del producto del protocolo 3'RACE de 1.2 Kb del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa, en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Inc.).



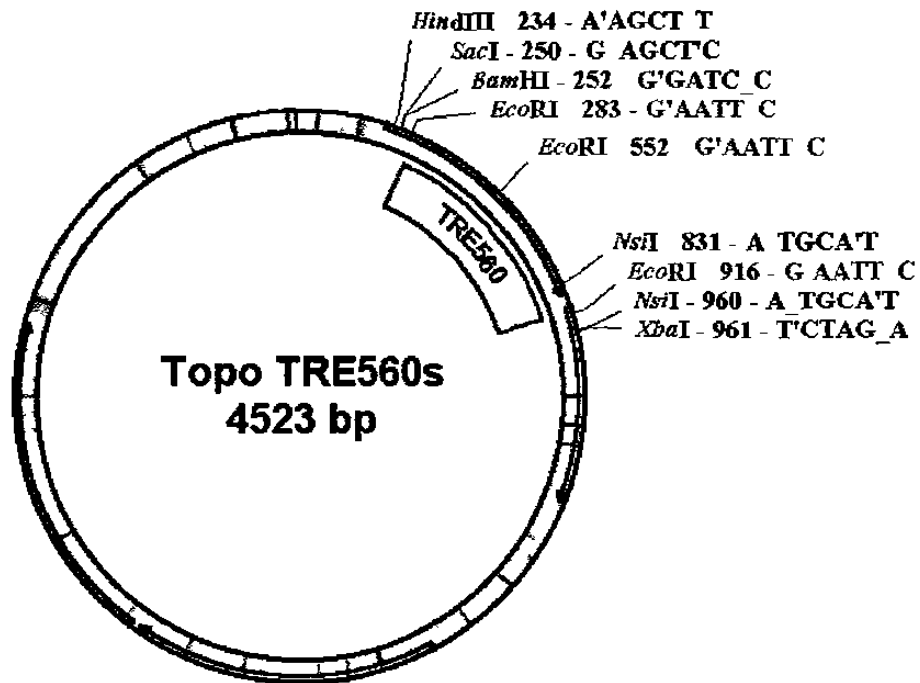
Mapa 6. Plásmido pTOPO-5TRE resultante de la clonación del producto del protocolo GeneRacer de 0.5 Kb del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa, en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Inc.).



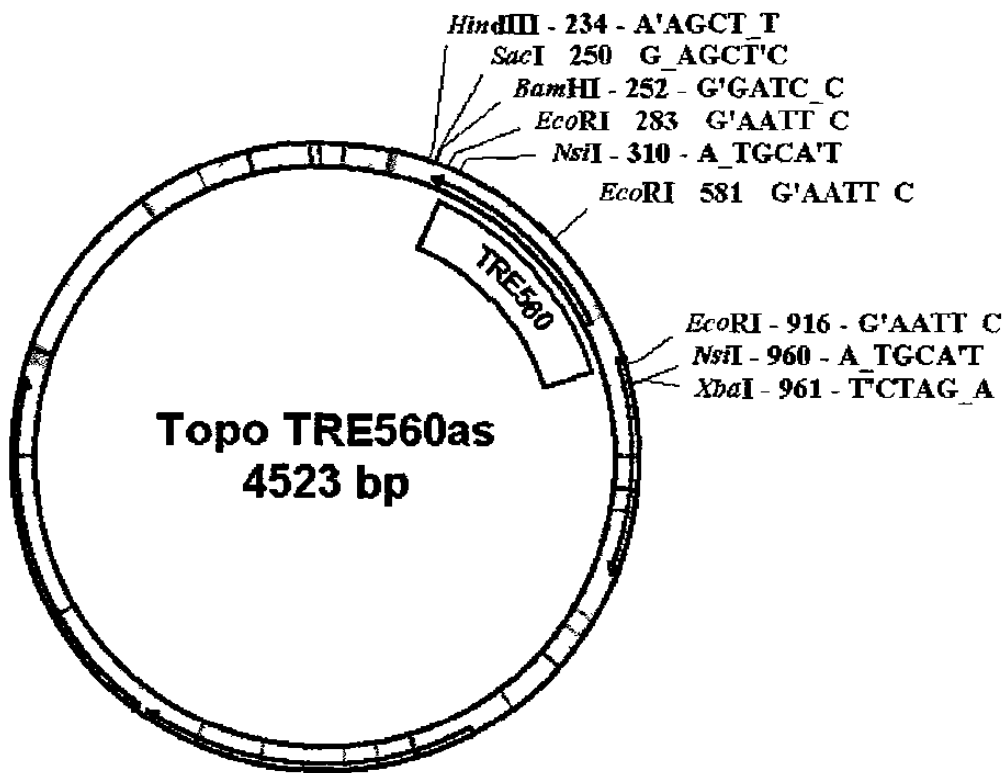
Mapa 7. Plásmido TOPO-RD29, producto de la clonación del fragmento de PCR de la secuencia promotora rd29A de *A. thaliana* en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen^{MR}).



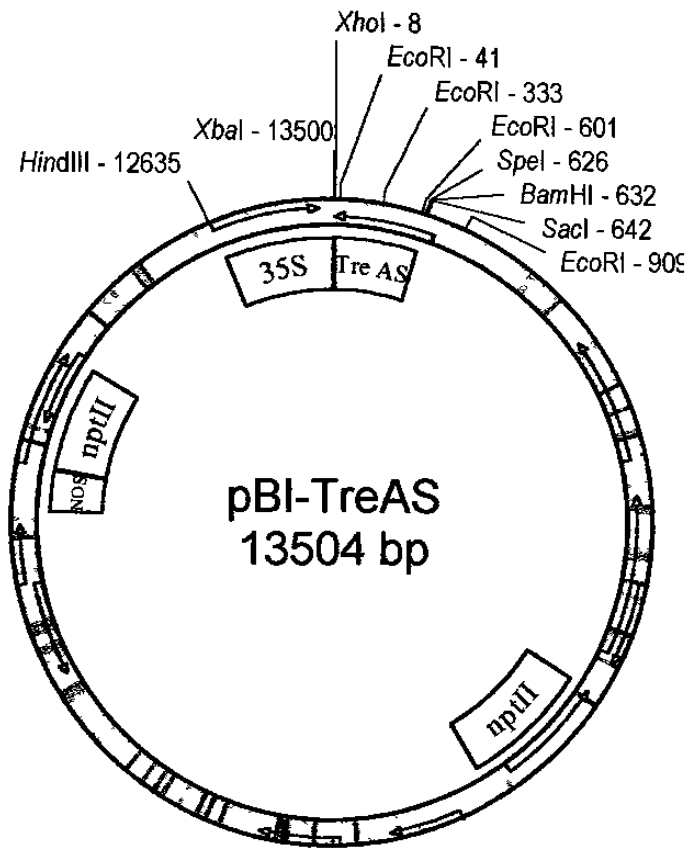
Mapa 8. Plásmido prd29-GUS, producto de la clonación de la secuencia promotora rd29A de *A.thaliana* en los sitios HindIII-XbaI del vector pBI-121, sustituyendo la secuencia promotora 35S CaMV.



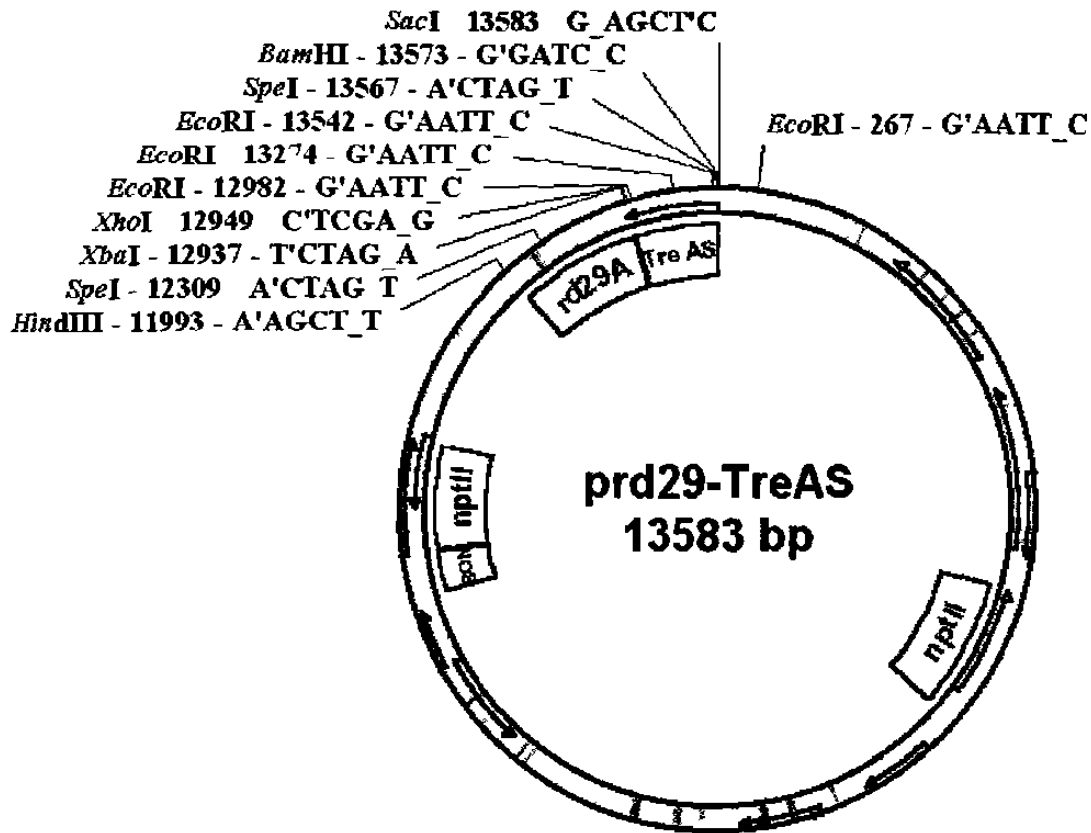
Mapa 9. Plásmido TOPO-TRE560s, producto de la clonación en sentido *Sac*I-*Xba*I del fragmento de PCR de 560 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa.



Mapa 10. Plásmido TOPO-TRE560s, producto de la clonación en sentido *SacI*-*XbaI* del fragmento de PCR de 560 pb de la secuencia interna de la trehalasa de alfalfa.



Mapa 11. Plásmido pBI:TREas producto de la clonación de la secuencia TRE de 560 pb de la trehalasa de alfalfa en los sitios XbaI-SacI del vector pBI-121, sustituyendo el gen GUS.



Mapa 12. Plásmido prd29:TREas, producto de la clonación en antisentido de la secuencia TRE de 560 pb de la trehalasa de alfalfa, en los sitios XbaI-SacI del plásmido prd29:GUS, sustituyendo la secuencia del gen GUS.

TTATTACTGGGATTCTTATTGGGTAATTAGGGGGTTGTTGGCGAGTAAAATGTATAAGACTGCTAAATCTATT
GTCACCAATCTCATTTCATTGATTGAGGAATACGGGTTTGTGCTTAATGGTGCTAGAGCTTACTACACTAACA
GA

Secuencia 1. Fragmento de 148 pb de la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

ACCAATCTCATTTCATTGATTGAGGAATACGGGTTTGTGCTTAATGGTGCTAGAGCATACTACACTAACAGGA
GCCAGCCTCCCTTTTAAAGCGCTATGATTATGAGATATACGCTAGGACTGGTGATATAGAATTAGTTAAAAG
GTCTCTGCCTGCACTACTGAAAGAGCAGGATTTTGGAAATTCAGATATACATAAAGTGAACATTTCCGGATGCT
CAAGGTTGCACTCGCACCTTAAATCGCTATTATGCAAGGTGGGACAAACCAAGGCCAGAATCGTCCACAATGG
ACAAGGCATCTGCTTCCAAGTTCAGGACTGTTTCAGAAAAACAACATTTTXACCGTGAAGTAGCATCAGCTGC
TGAATCAGGATGGGATTTTCAGCACAAAGATGGATGAGACACCCTCCTAACTTCACAACATTTGTCTACAACATCA
GTGATACCTGTTGATTTAAATGCATTTCTACTTGGGATGGAACCTTAATATTGCCCTTCTTTGCAAATGTTACTG
GAGATAATAGGACTGCTGAAACACTTCCTGCAAATTTCCGATGTTAGAAAGGAGGCAATTAACCTCGGTTTTCTG
GAATGCAAACATGAACCAATGGCTTGATTTCCTGGCTCAGCAATACCACACATGAGAAGGTTCAAGTTTGGGAT
ACCCTGCACCAGAATCAAAATGATTTGCTTCCAATTTTGTTCCTTTGTGGATGAAGCCATTTTACTCAGATG
CTTTGCTAGTGAGTAATGTTCTCGAAAGTCTCAAAACCTCTGGCCTGCTTCGTGCTGCTGGAGTTGCAACTTC
TTTGAGTGATTGAGGACAGCAGTGGGACTTCCCGAATGGTTGGGCTCCACTTCAACACATGTTAGTTGAAGGC
CTTGTAAAATCAGGGTTGGAAGAAGCAAGTTCGTTGGCTGAAGAAATTGCCATAAGATGGATCACAACCAAT
ATATCGTTTACAAAAAACAGGTGTAATGCATGAAAAGTTTGACGTGGAACATTGCGGAGAATTTGGAGGTGG
GGTGAAATATGTACCCAGACTGGTTFGGCTGGTCAAATGGAGTTGTGCTGGCATTCTTGGAGGAGTTTGGG
TGCCCCGAAGATCGTAAAATAGAATGCTAATGTGCTAAAAAATGAAAGGTACAATAAGTTTGGTATGCTTTAA
GAATTTACTTAGTAAATCAATTTTTCCACAAGTGGGTGAAGAAAAATGTTTATAATTGCTTGTGAAAAGC
TACTTGTAAAAGCTATAAATAAAGCAGAGATAATGAAGAACTTGATTGGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTCTAGAGTCGACACCATTAAGCACAAACCCGAGGGC
GAATTC

Secuencia 2. Extremo 3' de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

GGACACTGACATGGACTGAAAGGAGTAGAAAATTCCTTCTTGTTGGCATTGATTTTGCATTGTTCTCTTCATTC
CTCATTGGTGGAAGGAAGCAAGGAGGGGGAACATTGAAAAGACATTCCAAGCAAAGCAAACAAAAGTCCGCCA
CTTTGCTTCAAGTCAACTGCCGACTCTACAGTGACAGCATCAACTATGGACGACGACGTGAAGCCTTCAACTC
CACTCGTATCCTTTCTCGAAATTCTCAAACACACCGCATTCAACACATTCGGCAATCACAATTTCGATCCTAA
AACCTACGTCGATTTACCTCTCAAATTCCTTCCGATACGGATCACGCTTCCAGAATCTTCTTAAATCC
TCGACTGGTTCAGTGTCCGTTTCATGATTTGAATCGTTTTATAGAACTTATTTTGATGGTGCAGGTGATGATC
TCGTTACTCTGATCCAGAGGATTTTGTCCCTGAGCCTGAGGGTTTTTGCCTAAAGTAAAAACCTGAGGT
CAGAGCATGGGCGATTAAGGTTCAATCTCTTTGGAAAACTTGAGTAGGAAAGTATCCACTGAGGTCAAGACT
CACCTAACTACCATACTCTGCTTCTGTTCTGTTCTGTTGTTATCCCTGGTTTCGCGATTTCTGTAAGTAT
ATTACTGGGATTCCTACTGGGTAATTAGGGGGTTGTTGGCGAGTAAAATGT

Secuencia 3. Extremo 5' de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa.

PROTOSCOLOS

Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala por lisis alcalina

- a) Levantar una colonia transformante y crecerla en medio LB (Tifco, Inc.) líquido con antibiótico de selección a 37°C 200 rpm durante toda la noche.
- b) recuperar la pastilla bacteriana por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 seg.
- c) resuspender la pastilla bacteriana en 100 µl de Solución I (glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.6, EDTA 10 mM pH 8.0).
- d) Agregar 200 µl de Solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) y mezclar suavemente por inversión.
- e) Agregar 150 µl de Solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 12%) y mezclar por agitación.
- f) Decantar sobrenadante en un tubo nuevo y agregar 1 vol de isopropanol. Incubar 2 min a temperatura ambiente.
- g) Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. Descartar sobrenadante.
- h) Lavar pastilla con 1 ml de etanol 70% y remover el exceso de alcohol. Dejar secar al aire 2 min.
- i) Resuspender la pastilla en 50 µl de agua desionizada estéril. Almacenar a -20°C.

Extracción de ácidos nucleicos de origen vegetal

1.- Extracción de RNA total mediante TriReagent^R

- a) Homogenización de tejido. Utilizando un homogenizador o Polytron, homogenizar 50-100 mg de tejido en 1 ml de TriReagent.
- b) Separación de fases. Incubar el homogenizado por 5 min. a temperatura ambiente, para permitir una completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, añadir 200 µl de cloroformo por ml de TriReagent y agitar por 15 seg. Incubar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2-15 min, y centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de centrifugar, la mezcla se separa en una fase inferior roja de fenol:cloroformo, la interfase, y la fase acuosa superior incolora. El volumen de la fase acuosa es cerca del 60% del

volumen de TriReagent utilizado para la homogenización.

c) Precipitación de RNA. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y precipitar el RNA con isopropanol. Para remover las proteoglicanos y polisacáridos que contaminan la muestra de RNA, añadir a la fase acuosa 250µl de isopropanol, seguido de 250µl de una solución de alta salinidad para precipitación (0.8M de citrato de sodio y 1.2M de NaCl) por ml de TriReagent utilizado. Mezclar la solución e incubar de 5-10 min a temperatura ambiente, y centrifugar a 12,000g por 8 min a 4-25°C. Esta modificación precipita el RNA, mientras que los polisacáridos y proteoglicanos se mantienen en forma soluble.

d) Lavado del RNA. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla de RNA con etanol al 75% en vortex y centrifugar a 7,500g por 5 min a 4-25°C. Agregar al menos 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TriReagent utilizado en la homogenización. Si la pastilla de RNA se acumula en la pared del tubo y tiene tendencia a flotar, sedimentar la pastilla a 12,000g.

e) Solubilización de RNA. Remover el etanol del lavado y secar la pastilla de RNA al aire de 3-5 min. Es importante no secar completamente la pastilla de RNA, ya que esto disminuye su solubilidad. No seque la pastilla por centrifugación al vacío. Disuelva el RNA en agua o SDS 0.5% pipeteando un poco, e incubar por 10-15 min a 55-60°C. El agua o la solución de SDS utilizadas deben ser libres de RNasas, tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC).

2.-. Extracción de DNA genómico.

a). Moler 3 gr de tejido en nitrógeno líquido y transferir a un tubo Falcon de 50 ml.

b) Agregar 9 ml de buffer NTES (100mM NaCl, 100mM Tris pH 7.5, 100mM EDTA pH 8.0, 1% SDS). Y mezclar suavemente.

c) agregar 6 ml de fenolcloroformo (1:1; v/v) y mezclar suavemente.

d) Centrifugar a 8,000 rpm por 20 min a 4°C.

e) Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo. Agregar 0.1 vol de acetato de sodio 2M (pH 4.8) y 1 vol de isopropanol. Mezclar e incubar 30 min a -20°C.

f) Centrifugar a 8,000 rpm por 30 min a 4°C.

e) Recuperar el sobrenadante y agregar 2 vol de etanol. Incubar 30 min a -20°C, y precipite por centrifugación.

f) Enjuagar la pastilla con 1-2 ml de etanol 70%. Remover el excedente de alcohol y dejar secar al aire por 5 min.

g) Disolver la pastilla en 2.5 ml de agua y agregar 2.5 ml de cloruro de litio 4M. Mezclar bien e incubar en hielo toda la noche.

h) Centrifugar a 8,000 rpm por 10 min a 4°C.

i) recupere la pastilla y enjuage en 2 ml de etanol 70%.

j) disolver la pastilla en 2 ml de agua desionizada estéril.

Síntesis de secuencias nucleotídicas: 3' RACE.

1. Manejo de RNA. Utilizar RNA total en buenas condiciones. Trabajar con puntillas y tubos esteriles en un área limpia, y utilizar guantes para evitar contaminar con RNasa.

2. Síntesis de cadena complementaria. Utilizar de 1 a 5 µg de RNA total, y llevar a cabo la síntesis por transcripción reversa, utilizando el sistema Avian Enhanced RT (SIGMA), utilizando el oligo d[Γ]23.

3. Primer PCR. Utilizar 3 µl del cDNA obtenido para llevar a cabo el primer PCR utilizando el oligo específico para la secuencia y el oligo 18HXS.

4. PCR semianidado. Utilizar de 1 µl de producto de PCR obtenido para una reacción semianidada utilizando un oligo específico más interno de la secuencia y el oligo 18HXS.

5. Clonar el producto de PCR en un vector de clonación.

Transformación de material vegetal.

1.- Preparación de partículas de Tungsteno.

La técnica utilizada fue de acuerdo a Tomes *et al.*, 1995, y modificada por Cabrera *et al.*, 1997, como sigue:

a) Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.

b) Resuspender en 2 ml de HNO₃ 0.1N y sonicar por 20 min.

c) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.

d) Eliminar el sobrenadante y aplicar 2 ml de etanol absoluto, sonicar brevemente.

- e) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.
- f) Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua desionizada estéril.
- g) Tomar 4 alicuotas de tungsteno de 250 μ l, resuspender en 750 μ l de agua desionizada estéril en cada uno de los tubos.
- h) La concentración final de tungsteno en cada uno de los tubos es de 15 μ g/ μ l.
- i) Almacenar a -20°C.

2.- Recubrimiento de partículas de tungsteno con DNA.

La técnica utilizada fue de acuerdo a Tomes *et al.*, 1995, y modificada por Cabrera *et al.*, 1997, como sigue:

- j) Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.
- k) Resuspender en 2 ml de HNO₃ 0.1N y sonicar por 20 min.
- l) Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.

3.- Regeneración de transformantes.

Los explantes bombardeados con el DNA se colocaron para su diferenciación en medio IBA (MS [Murashige y Skooge], Sac [sacarosa] 2%, BAP [bencil amino purina] 1.5 μ M, Kan [kanamicina] 100 μ g/ml), y se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad, por 5 semanas cuando se obtuvo la diferenciación del tejido en brotes. Dichos brotes se pasaron a medio IBA (MS 0.5X, Sac 2%, IBA [ácido indol butírico] 2 μ M, Kan 100 μ g/ml) para la diferenciación del sistema radicular. Una vez regenerada la planta por completo, se mantuvieron en medio MS Sac 2% Kan 100 μ g/ml, en el cual se propagaron vegetativamente hasta obtener suficientes individuos de cada línea transformante.

Determinación de la actividad trehalasa en plantas.

- a) Congelar 1 gr de muestra en nitrógeno líquido y moler. Disolver en 4 ml de buffer extracción MES (MES [KOH] 0.1M pH 6.3, PMSF 2mM, EDTA 2mM) (Sambrook y Russell, 2001).
- b) centrifugar por 20 min a 12,000 rpm a 4°C.
- c) preparar en un tubo de 1.5 ml la siguiente reacción:

700 μ l de buffer de ensayo (MES [KOH] 50mM pH 6.3)

100 μ l de trehalosa 100 mM

200 μ l de extracto protéico vegetal

d) incubar la mezcla de reacción por 30 min a 37°C y detener la reacción por calentamiento a 70°C durante 10 min.

e) centrifugar por 20 min a 12,000 rpm a 4°C

f) recuperar el sobrenadante y cuantificar la producción de glucosa con el sistema GO-Assay (SIGMA).

