

Conceptos básicos en biotecnología de la palma de aceite

Useful Basic Concepts in Oil Palm Biotechnology

Pedro J. Rocha S.¹

Resumen

La biotecnología vegetal es un área extensa de conocimiento que se ha constituido en una herramienta de utilidad para la resolución de problemas agronómicos de algunos cultivos. Muchas de las técnicas han sido estandarizadas en sistemas modelo (como *Arabidopsis*). Sin embargo, dichas técnicas se han introducido a cultivos de interés, y se practican en forma rutinaria. Su aplicación ha permitido la exploración de nuevas alternativas de análisis y ha mejorado la precisión de los mismos. En el presente trabajo se incluye una descripción teórica general con ejemplos de la aplicación de grandes áreas biotecnológicas: marcadores moleculares e ingeniería metabólica (clonación de genes y transformación genética).

Summary

Plant biotechnology is a wide area of knowledge, which has become a usefulness tool for the resolution of agronomic problems of some crops. Many of the techniques have been standardized in model systems (as *Arabidopsis*). Nevertheless, such techniques have been introduced to crops of interest, have become a routine and their application has allowed the exploration of new analysis alternatives and have improved their accuracy. In this work we have included a general theoretical description with examples of the application of large biotechnological areas: molecular markers and metabolic engineering (cloning of genes and genetic transformation).

Palabras Clave

Biotecnología de la palma de aceite,
Marcadores moleculares,
Ingeniería metabólica,
Biodiversidad,
Transformación genética.

1 . Ph.D., Investigador Titular, Área de Fisiología y Mejoramiento, Cenipalma.
E-mail: pedro.rocha@cenipalma.org

Introducción

La biotecnología vegetal es la aplicación de la ciencia y la ingeniería al uso directo de plantas, sus partes o sus productos, en sus formas naturales o modificadas. Constituye un grupo de técnicas desarrolladas mediante investigación básica, que usan procesos biológicos para solucionar problemas o generar productos útiles. Bajo el concepto de biotecnología vegetal se incluyen el cultivo de tejidos, la generación y uso de biorreactores, el desarrollo y uso de marcadores moleculares, la identificación y aislamiento de genes, la ingeniería metabólica, la transformación genética y la bioinformática. Todas estas áreas están sustentadas por diversas disciplinas, como la genética, la fisiología, la bioquímica y la informática, y en la actualidad están estrechamente relacionadas con la ecología, la economía, el derecho y con las industrias química, agrícola, farmacéutica, etc.

El uso de la biotecnología vegetal permite mejorar la productividad agrícola (Rajanaidu, 2003), mediante la inclusión de programas de selección asistida por marcadores moleculares (Rocha, 2003) posibilita la inserción de genes que confieren resistencia a insectos y a herbicidas (Christou, 1996). Gracias a las nuevas técnicas introducidas en el campo de la biotecnología, es posible alterar las propiedades de la materia prima industrial, por ejemplo, la calidad de aceites (Ohlrogge, 1994; Akmar *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002, Sambanthamurthi *et al.*, 2002), almidones y metabolitos secundarios (Rocha, 2000; Nessler, 1994). Además, es posible hacer manipulación molecular directa de rutas metabólicas para generar diversidad química o incrementar la producción de compuestos normalmente encontrados en cantidades muy bajas (Rocha *et al.*, 2002; Rocha, 2000). Un área de particular interés involucra el uso de plantas como reactores en la producción farmacéutica y de vacunas (área conocida como *molecular pharming*), en la cual se han obtenido resultados trascendentales. Ejemplos de ello son el *golden rice*, arroz que produce provitamina A (Ye *et al.*, 2000) o el arroz, arveja y tabaco productores de anticuerpos contra cáncer y caries dental (Stoger *et al.*, 2000). Es de resaltar que todos los avances y usos de las técnicas biotecnológicas han fortalecido la comercialización y el manejo de la

propiedad intelectual (patentes) relacionada con organismos vivos y su información genética (Rocha, 2003b).

Desde el punto de vista molecular, la biotecnología trabaja en la actualidad en cuatro niveles: ADN, ARN, proteínas y metabolitos. Para estudiar cada uno de estos elementos se han generado diferentes herramientas. Por ejemplo, el análisis de los genomas (dotación genética completa de un individuo) puede ser hecho utilizando marcadores moleculares, la clonación de fragmentos muy grandes de ADN en bibliotecas genómicas (BACs y YACs) y la secuenciación. La enorme cantidad de secuencias generadas ha sido incluida en bases de datos públicas y privadas, y su acceso se hace por medio de herramientas sencillas pero muy eficientes generadas por una nueva disciplina conocida como bioinformática. El estudio a profundidad de los genomas de las especies mediante herramientas de bioinformática es lo que se conoce como “genómica” (*genomics* en inglés).

El ADN es transcrito a ARN y la expresión de esta molécula se constituye en un objeto de estudio muy valioso para el entendimiento de la regulación de múltiples procesos biológicos. La inducción o inhibición de los genes puede ser estudiada a nivel de ARN mediante técnicas que involucran la transcripción reversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con la interacción de estas metodologías es posible construir bibliotecas de ADN complementario (ADNc) o emplear técnicas como los ADNc-AFLPs. Adicionalmente, el empleo de robots junto con las herramientas bioinformáticas permite generar y secuenciar miles de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) y conocer la secuencia y nivel de expresión de miles de potenciales genes dispuestos en microarreglos (*microarray technology*). En términos generales, al área que estudia la expresión de los genes mediante técnicas que utilizan ARN se conoce como “genómica funcional” y al grupo de todos los ARN expresados (o transcritos) en un estado particular de desarrollo se le conoce como “transcriptoma”.

El ARN es traducido a proteínas, las cuales son moléculas con múltiples funciones que intervienen en todos los procesos biológicos conocidos. Las proteínas se han venido convirtiendo en uno de los objetos de estudio de la biotecnología. En

la actualidad, merece especial atención el “proteoma”, que no es más que el grupo de todas las proteínas que están siendo expresadas en un estado particular de desarrollo o bajo determinadas condiciones en un tejido u órgano específico. La disciplina que estudia al proteoma se conoce como “proteómica” (*proteomics* en inglés) y utiliza técnicas de bioquímica analítica avanzada, que incluyen la electroforesis en dos dimensiones, secuenciación de péptidos, diferentes técnicas cromatográficas y técnicas de Elisa (interacción con anticuerpos), entre otras.

Uno de los objetos más recientes de estudio de la biotecnología son los metabolitos. De igual manera se ha introducido el término “metaboloma” para referirse a la dotación de moléculas resultantes del metabolismo primario (carbohidratos y lípidos) o secundario (en plantas metabolitos secundarios tipo terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos) que se encuentran en un tejido o estado particular de desarrollo bajo determinadas condiciones del medio ambiente. Los metabolitos secundarios han sido estudiados por la química orgánica y la bioquímica desde hace muchos años, y como resultado de dispendiosas labores se han aislado, descrito y caracterizado más de 30.000 terpenoides (que incluyen aceites esenciales, caucho, glicósidos, etc.), alrededor de 12.000 alcaloides y cerca de 5.000 compuestos fenólicos (entre los cuales están los flavonoides, antocianinas, ligninas, taninos, etc.) (Rocha, 2000). Si bien la biotecnología moderna está utilizando las mismas técnicas empleadas por la química y la bioquímica (HPLC, GC-MS, NMR, etc.), también está introduciendo técnicas y equipos de alta eficiencia (MALDI-TOF, SELDI, etc.) que permiten analizar en masa miles de muestras, y generar una cantidad desbordante de información con aplicación potencial en agricultura, farmacia y otras industrias.

En esta introducción se han esbozado algunas de las áreas de mayor relevancia de la biotecnología. En los siguientes párrafos se introducirán conceptos generales que permitirán familiarizar al lector, de un lado, con una de las áreas más empleadas por la biotecnología vegetal: los marcadores moleculares (revisado en detalle por Rocha, 2003) y, de otra, un área de enormes perspectivas: la ingeniería metabólica.

Marcadores moleculares

En términos generales, las variaciones a nivel del genotipo se pueden detectar a escala molecular. Tales variaciones (o polimorfismos) se constituyen en herramientas útiles para determinar los grados de parentesco, la variación y la diversidad genética de individuos de una población y entre poblaciones. Los marcadores moleculares se definen como fragmentos de ADN de función desconocida que permiten detectar diferencias o semejanzas y, por ende, comparar individuos en la misma población o especie.

Los polimorfismos reflejan un hecho simple pero esencial de la herencia: Un gen sobre un cromosoma donado por uno de los padres no es necesariamente idéntico al gen complementario (el “alelo”) sobre el correspondiente cromosoma del otro padre. La variación alélica (o polimorfismo) es crucial para el trabajo de especialistas en biotecnología agrícola. Cuando los marcadores se registran en la forma de un mapa genético, esta información dota a los científicos de una poderosa herramienta que permite mejorar la base genética de los cultivos y diseñar mejor germoplasma para los agricultores. Los marcadores moleculares tienen varias aplicaciones claves en la construcción de mapas moleculares, el análisis de la variación genética dentro y entre poblaciones específicas, el control de calidad y la asistencia en el mejoramiento convencional.

Como se dijo (Rocha, 2003), los marcadores moleculares más comunes son los RFLP y los basados en PCR (RAPDs, AFLPSS, y microsatélites). Estudios con RFLPs han sido reportados en palma de aceite para análisis de diversidad genética (Barcelós, 1998) y estudios de mapeo genético (Jack y Mayes, 1993; Mayes *et al.*, 1997). Marcadores tipo AFLP han sido reportados en experimentos de mapeo (Chua *et al.*, 2001; Billotte *et al.*, 2001) y análisis de diversidad (Purba *et al.*, 2000; Maizura *et al.*, 2001; Billotte *et al.*, 2001; Barcelós, 1998). Marcadores tipo RAPD han sido reportados por Shah y colaboradores (1994). Cenipalma ha estandarizado y en la actualidad utiliza de manera cotidiana marcadores tipo RAPD, AFLP y microsatélites en análisis de diversidad genética.

La utilidad de los marcadores moleculares en palma de aceite radica en la posibilidad de

brindar apoyo a los programas de fitomejoramiento, mediante el reconocimiento y posterior selección de materiales élite en estado de previvero o vivero, acelerando así el mejoramiento convencional.

Ingeniería metabólica y palma de aceite

La ingeniería metabólica es una nueva aproximación para entender y usar procesos metabólicos mediante las modificaciones o la introducción de reacciones bioquímicas específicas con el uso de tecnología de transformación genética (Stephanopoulos, 1999). La aplicación de la ingeniería metabólica beneficiará a la sociedad en cuanto que, por ejemplo, mejorará la habilidad de modificar rutas metabólicas para generar sustitutos de productos biológicos con características químicas específicas, mejorará la productividad agrícola, permitirá la producción eficiente de energía más segura y proveerá mejor entendimiento de las bases metabólicas de enfermedades en plantas y animales (Rocha, 2000; Nessler, 1994; Bailey, 1991; Stephanopoulos y Vallino, 1991).

En plantas, las manipulaciones de las rutas biosintéticas mediante la generación de plantas transgénicas ofrece un número elevado de oportunidades para rediseñar la generación de productos de valor específico (Sambanthamurthi, 2002; Tanaka *et al.*, 2002; Siti Nor Akmar *et al.*, 2001; Nessler, 1994; Ohlrogge, 1994). Para cumplir con este objetivo, la ingeniería metabólica requiere de genes disponibles y de sistemas de transformación genética de alta eficiencia. A continuación se revisa cada uno de estos requerimientos.

Disponibilidad de genes

El género *Palmae* incluye más de 2.700 especies. Cada una de ellas posee una dotación genética única. Sin embargo, muchos de los procesos biológicos llevados a cabo por tales especies son comunes y están mediados por la presencia de enzimas codificadas por genes que tuvieron ancestros comunes. Como consecuencia, dichos genes codifican enzimas que pueden ser consideradas variaciones sobre la misma estructura. Esta relación de parentesco y las actividades catalíticas propias de cada enzima hacen posible que una enzima determinada

pueda ser expresada ectópicamente en un sistema diferente y que pueda cumplir con su función o con funciones similares en otro fondo bioquímico (Rocha *et al.*, 2002; Rocha, 2000). Como consecuencia, la importancia de tener una gran batería de genes similares, derivados de organismos de especies relacionadas, radica en la posibilidad de encontrar genes que codifiquen para enzimas que realicen funciones específicas de manera más eficiente que la enzima normalmente encontrada en la especie objeto de mejora (Rocha, 2000).

Los genes pueden estar disponibles mediante dos estrategias. Una es la exploración de la diversidad biológica y la otra es mediante la modificación o ingeniería de cada gen de interés utilizando técnicas de biología molecular (mutagénesis dirigida). La biodiversidad debe ser vista como la fuente de genes, enzimas y metabolitos, razón por la cual es necesario explorarla, conservarla y utilizarla en forma racional. Cenipalma ha constituido el banco de germoplasma de *E. oleifera* y *E. guineensis* con el objetivo de tener una fuente de germoplasma lo suficientemente amplia para cubrir gran parte de la variabilidad presente en palma (Rey *et al.*, 2003).

La exploración de genes en las diferentes especies puede hacerse mediante técnicas de biología molecular, como la RT-PCR, la construcción de genotecas de ADNc, la utilización de EST y la secuenciación, entre otras. Particular interés recae sobre la identificación y aislamiento de genes mediante la utilización de herramientas de bioinformática que permiten identificar - basándose en homologías de procesos biológicos-enzimas o genes presentes en una especie y, con esta información, poder aislar su homólogo en otra especie.

Un área de rápido crecimiento en la investigación genómica y de particular interés para la ingeniería metabólica es la generación de *expressed sequence tags* (EST) en los cuales grandes números de clones seleccionados aleatoriamente, obtenidos de estadios de desarrollo o tejidos específicos, son parcialmente secuenciados. El análisis de EST constituye una aproximación muy útil para el descubrimiento de genes y brinda un perfil de genes expresados durante estados particulares de desarrollo. La estrategia generalmente involucra la construc-

ción de librerías de ADNc y secuenciación a gran escala de los clones de ADN seleccionados aleatoriamente. Las secuencias de nucleótidos parcialmente resueltas son posteriormente utilizadas para búsquedas de homología de secuencias de nucleótidos en las bases de datos públicas. Uno de los primeros usos de las colecciones de EST fue la identificación de genes involucrados en rutas metabólicas específicas en plantas. Alias y colaboradores (2001) generaron 3.399 EST de tejidos de callos y de embriones de palma de aceite. Sus objetivos eran implementar una aproximación de identificación de genes a gran escala, comparar genes específicamente expresados, usar EST como sondas para mapeo genético y como blanco para análisis de microarreglos de ADN y, finalmente, crear una base de datos para palma de aceite (Alias *et al.*, 2001). Estos trabajos demostraron la efectividad y la eficiencia de la estrategia de EST en el descubrimiento de genes.

La alternativa de generar nuevos genes sin explorar la diversidad biológica también es posible mediante la modificación de genes con técnicas de biología molecular. Un ejemplo de mutagénesis dirigida en una enzima que participa en la ruta metabólica de producción de aceites fue reportado para la proteína transportadora de acilo D⁹-16:00 (ACP, por sus siglas en inglés), una desaturasa de ácidos grasos que introduce un doble enlace de manera regioespecífica en un sustrato acyl-ACP saturado. La acción de esta enzima es vital para mantener la fluidez de las membranas celulares. Whittle y Shanklin (2001) identificaron seis aminoácidos que afectaban la especificidad del sustrato de la enzima. Mediante mutagénesis dirigida sobre estos seis aminoácidos se generaron decenas de variantes de la enzima original. Las enzimas resultantes fueron introducidas en un ensayo para identificar aquellas que podían modificar grasas de cadena corta sin perder eficiencia. De este ensayo, varias enzimas fueron identificadas con actividades específicas incrementadas desde 15 hasta 100 veces. Con estos resultados los autores generaron una enzima modificadora de aceite altamente eficiente y demostraron que es posible hacer ingeniería en una enzima arquetipo con función vital incrementando su actividad.

Como se ve, existe la posibilidad de convertir cualquier sistema biológico en una fuente valiosa de genes. Una vez los genes son aislados de otra especie, son secuenciados e incorporados en las bases de datos públicas o privadas. Sin embargo, para la ingeniería metabólica este es sólo un primer paso, pues la utilización de esta información (gen) depende de que sea posible introducirla en la planta de interés mediante un sistema de transformación genética eficiente.

Transformación genética

Bajo el término de “transformación genética” se incluye una serie de técnicas que hacen posible la introducción de genes foráneos a otras especies. Debido a las propiedades universales del ADN es posible introducir genes de bacterias, virus, animales y plantas a cualquier sistema viviente. En plantas, los genes pueden ser introducidos mediante una de dos vías: *Agrobacterium* o biobalística. En la primera, se emplea la característica de la bacteria *Agrobacterium* de utilizar su mecanismo natural de transformación genética. En la segunda, también conocida como bombardeo de partículas, se aceleran partículas de oro (que previamente han sido cubiertas con el ADN de interés) mediante una descarga eléctrica (sistema Accelgun de 10 a 16 KV) o de aire a presión (sistema de helio de BioRad de 1000 a 2500 psi). Las partículas aceleradas transportan el ADN, el cual es liberado al interior del núcleo e insertado aleatoriamente en el genoma mediante un mecanismo aún no dilucidado (Leech *et al.*, 2000; Christou, 1996).

Los tejidos bombardeados con el gen (o genes) de interés son sometidos a incubaciones y tratamientos hormonales previamente estandarizados en un laboratorio de cultivo de tejidos. Una vez las plantas transgénicas son regeneradas, se llevan a invernaderos o a campo para ser evaluadas. Posteriormente son cruzadas y la descendencia es analizada mediante técnicas moleculares (Southern o con marcadores moleculares) para determinar la estabilidad del transgén(es). En estas plantas, derivadas de las transgénicas iniciales (T0), es en las que se debe evaluar los procesos biológicos alterados (Rocha, *et al.* 2002).

Consideraciones finales

En este artículo se mostró a la biotecnología vegetal como un instrumento poderoso y de gran utilidad para mejorar la calidad y productividad de los cultivos. Se presentaron los marcadores moleculares como las herramientas más empleadas para asistir al fitomejoramiento tradicional. También se describieron algunos aspectos de relevancia de la nueva área conocida como ingeniería metabólica. Las perspectivas son enormes y las posibilidades para incorporar y explotar racionalmente estas tecnologías en palma de aceite son promisorias. Sin embargo, la biotecnología aislada no es la solución milagrosa a los múltiples problemas de un cultivo. Para utilizarla de manera inteligente y óptima, es indispensable considerar de manera

holística la problemática de cada cultivo y definir claramente las prioridades de manejo y de interacción, junto con los aspectos económicos del cultivo.

Agradecimientos

El autor expresa sus agradecimientos a Colciencias, por el apoyo brindado durante su formación doctoral. Adicionalmente, agradece a la Dra. Esperanza Torres (Centro Internacional de Física, CIF) por su opinión crítica sobre este texto. Esta publicación hace parte del proyecto financiado por Cenipalma y Fontagro, Convenio de Cooperación Técnica IICA-BID-FTG-5811999, FTG-0111999 y FTG-2411999. La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fondo de Fomento Palmero. ☼

Bibliografía

- ALIAS, H.; AMOS TAN CHI YEE; MOHD SYARIFF, E.; LOW ENG TI, L.; WAN KIEW LIAN; SINGH, R.; CHEAH SUAN CHOO. 2001. Generation of expressed sequence tags (ESTs) from callus and embryoid tissues of oil palm (*Elaeis guineensis*). Proceedings of the 2001 PIPOC International Palm Oil Congress (Agriculture), Malasia, p.468-478.
- BAILEY, J.E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. Science (Estados Unidos) v.252, p.1668-1675.
- BARCELÓS, E. 1998. Etude de la diversité génétique du genre *elaeis* (*E. oleifera* (Kunth) Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Tesis doctoral. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 137p.
- CHRISTOU, P. 1996. Transformation technology. Trends in Plant Science. Reino Unido, v.1, p.423-431.
- JACK, P.L.; MAYES, S. 1999. Use of molecular markers for oil palm breeding II. Use of DNA markers (RFLPs). Oleagineux. Francia, v.48, p.1-8.
- LEECH, M.; BURTIN, D.; HALLARD, D.; HILLIOU, F.; KEMP, B.; PALACIOS, N.; ROCHA, P.; O'CALLAGHAN, D.; VERPOORTE, R.; CHRISTOU, P. 2000. Particle gun methodology as a tool in metabolic engineering. En: Verpoorte, R; Alfermann, A.W. (eds.) Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, p.69-86.
- MAIZURA, I.; CHEAH, S.C.; RAJANAIDU, N. 2001. Genetic diversity of oil palm germplasm collections using RFLPs. Proceedings of the 2001 PIPOC International Palm Oil Congress (Agriculture), p.526-535.
- MAYES, S.; JACK, P.L.; MARSHALL, D.F.; CORLEY, R.H.V. 1997. Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Genome. Canadá, v.40, p.116-122.
- NESSLER, C.L. 1994. Metabolic engineering of plant secondary products. Transgenic Research. Holanda, v.3, p.109-115.
- OHLROGGE, J.B. 1994. Design of new plant products: Engineering of fatty acid metabolism. Plant Physiology, v.104, p.821-826.
- REY, L.; AYALA, I.; DELGADO, W.; ROCHA, P. 2003. Colecta de material genético de la palma americana noli *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortez en el Trapecio Amazónico. Ceniavances, Colombia, no.101, p.1-4.
- ROCHA, P. 2003a. Marcadores moleculares, una herramienta de útil para la selección genética de palma de aceite. Palmas, Colombia, v.24, no.2, p.11-25.
- ROCHA, P. 2003b. Derechos de propiedad intelectual, la manera de proteger invenciones. Palmas (Colombia) v. 24 no.1 p.9-17.
- ROCHA, P. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Palmas, Colombia, v.23, no.3, p.9-17.
- ROCHA, P.; STENZEL, O.; PARR, A.; WALTON, N.; CHRISTOU, P.; DRÄGER, B.; LEECH, M.J. 2002. Functional expression of tropinone reductase I (*trI*) and hyoscyamine-6 β -hydroxylase (*h6h*) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. Plant Science, Irlanda, v.162, p.905-913.

- ROCHA, P.J. 2000. Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* and isolation of *Myb* sequences from *Catharanthus roseus*. Tesis Ph.D. University of East Anglia, Norwich, Reino Unido, 161p.
- SAMBANTHAMURTHI, R.; SITI NOR AKMAR ABDULLAH; AHMAD PARVEEZ GHULAM KADIR. 2002. Genetic manipulation of the oil palm – Challenges and prospects. *The Planter*, Malasia, v.78, no. 919, p.547-562.
- SITI NOR AKMAR, SAMBANTHAMURTHI, R.; PARVEEZ, G.K.A. 2001. Genetic modification of oil palm for producing novel oils. Proceedings of the 2001 PIPOC International Palm Oil Congress (Agriculture) A3.
- STEPHANOPOULOS, G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, v.1, p.1-11.
- STEPHANOPOULOS, G.; VALLINO, J.J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, Estados Unidos, v.252, p.1675-1681.
- STOGER, E.; VAQUERO, C.; TORRES, E.; SACK, M.; NICHOLSON, L.; DROSSARD, J.; WILLIAMS, S.; KEEN, D.; PERRIN, Y.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, v.42, p.583-590.
- TANAKA, A.; MURASE, M.; SANO, H.; SAKAMOTO, A.; MASDUKI, A.; HASKA, N.; KOESNANDAR; REFI, E.; RAMELAN, S.W. 2002. Genetic engineering of oil palm and its application to future palm business. 2002 International Oil Palm Conference. G-05, p.1-6.
- WHITTLE, E.; SHANKLIN, J. 2001. Engineering Δ^9 -16:0-Acyl Carrier Protein (ACP) desaturase specificity based on combinatorial saturation mutagenesis and logical redesign of the castor Δ^9 -18:0-ACP desaturase. *The Journal of Biological Chemistry*, Estados Unidos, v.276, no. 24, p.21500-21505.
- YÉ, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTL, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, Estados Unidos, v.287, p.303-305.