



## INGENIERÍA METABÓLICA DE FOLATOS EN TOMATE

Rocío Díaz de la Garza\*, Eoin Quinlan<sup>§</sup>, Sebastian Klaus\*, Gilles Basset\*, Jesse Gregory III<sup>§</sup> y Andrew Hanson\* Horticultural Sciences\* and Food Science and Human Nutrition<sup>§</sup> Departments, University of Florida, Gainesville, FL, 32611, PO.Box 110690, Fax (352) 392 5653, adha@mail.ifas.ufl.edu

Palabras clave: folatos, ingeniería metabólica, tomate.

**Introducción.** Tetrahidrofolato (THF) y sus derivados (folatos) son cofactores esenciales para las reacciones de transferencia de un carbono necesarias para formar metionina, serina, purinas y timidilato (1). Mientras que las plantas y los microorganismos son capaces de producirlo, el ser humano carece de la ruta completa para su síntesis y requiere consumirlo en la dieta. La principal fuente de folatos para el ser humano son los vegetales (1), siendo las semillas y las hojas los tejidos con mayor contenido de esta vitamina, en contraste con los frutos y tubérculos, los cuales son popularmente consumidos y son relativamente pobres en folato. Así, el consumo de folato es inadecuado en países pobres y es subóptimo aún en países desarrollados. Las consecuencias de un bajo consumo de folatos incluyen, defectos de nacimiento, anemia e incremento en el riesgo de enfermedades vasculares y algunos cánceres (2).

Nuestro objetivo es aumentar el contenido de folatos en tomate por medio de ingeniería metabólica. La molécula del folato está formada por pteridina, *p*-aminobenzoato (PABA) y uno o varios glutamatos en cadena (Fig. 1). En plantas, la pteridina es formada en el citoplasma, PABA es sintetizado en plástidos y ambos son condensados y glutamilados en mitocondria. En tomate, la primera enzima en la síntesis de pteridinas es la GTP ciclohidrolasa I (GCHI). Esta enzima desaparece en tomate cuando éste empieza a madurar (3), por lo que nuestra estrategia de ingeniería es la expresión dirigida a fruto en maduración de una enzima no vegetal que no esté regulada en plantas, con el fin de aumentar el flujo de pteridinas en fruto, y en consecuencia de folatos.

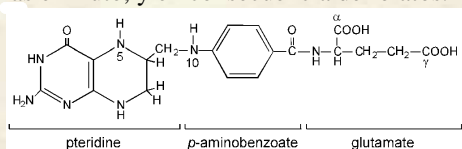


Fig. 1. Estructura química del tetrahidrofolato

**Metodología.** Se transformó *Lycopersicon esculentum* var. Microtom utilizando *Agrobacterium tumefaciens* llevando el vector de expresión pMON10086 que contiene el gen modificado de GCHI (GenBank BE136861) así como el promotor específico para en fruto maduración E8 y el gen *npt II* de resistencia a kanamicina. Las plantas transgénicas fueron regeneradas mediante cultivo de tejidos. Los análisis de pteridinas, PABA y folatos en fruto maduro, fueron hechos con técnicas de HPLC con detectores de fluorescencia (para pteridinas y PABA) y electroquímico (para folatos).

**Resultados y discusión.** Se obtuvieron doce plantas transformadas las cuales fueron PCR positivas para el gen sintético GCHI. Se utilizaron como control plantas transfor-

mas con el vector vacío. La enzima GCHI fué detectada en tomate en maduración por medio de técnica Western. Las pteridinas fueron caracterizadas en fruto, siendo éstas neopterinina, monapterina y 6-hidroximetilpterina, las cuales son precursoras de folatos. En comparación con el control, los tomates GCHI<sup>+</sup> acumularon de 3 a 140 veces más pterinas. El contenido de folatos en los tomates control estuvo en el rango de 0.8-2.3 nmol/g de peso fresco, mientras que casi todos los frutos transformados excedieron estos valores (Fig. 2). La media para la población GCHI<sup>+</sup> fue el doble que la del control (2.99 vs. 1.47 nmol/g, diferencia significativa a  $P < 0.001$ , prueba *t*). Se determinó el contenido PABA en los frutos y se comparó con el contenido de folatos, encontrándose una correlación negativa significativa. Con el fin de comprobar que PABA es un factor limitante para lograr mayores aumentos de folatos en tomate, se alimentó el fruto transformado con PABA en solución (o agua, como control) a través del pedúnculo y se le dejó madurar. El contenido de folatos en frutos alimentados con PABA fue de 2.5 a 10 veces más alto que los controles con agua.

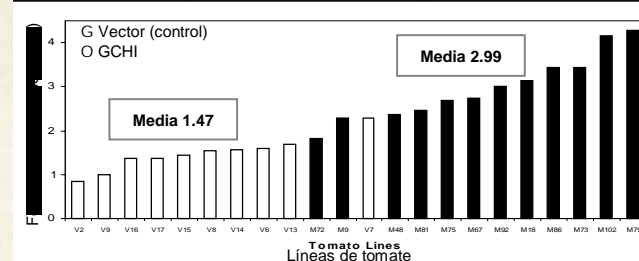


Fig. 2. Contenido total de folatos en tomates maduros de 12 plantas transgénicas GCHI<sup>+</sup> independientes y 10 plantas control

**Conclusiones.** La expresión de la enzima GCHI insensible a inhibición en células vegetales en tomate, ocasionó un aumento en el flujo de pteridinas en fruto de hasta 140 veces el promedio de los frutos controles. Esta hiperacumulación causó un incremento de hasta 3 veces en el contenido de folatos en frutos GCHI<sup>+</sup>. Estos resultados confirman el éxito de la estrategia de ingeniería. Sin embargo, para obtener mayores incrementos en folatos, es necesario aumentar el contenido de PABA en fruto ya que hemos demostrado que este precursor es también limitante para la síntesis de la vitamina.

**Bibliografía.** 1.Scott J, Rébeillé F, Fletcher J (2000) Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* 80: 795-824  
2.Lacock, M (2004) Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* 328:211-214  
3.Basset G, Quinlan EP, Ziemak MJ, Díaz de la Garza R, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory JF, Hanson AD (2002) Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *PNAS* 99: 12489-94