



CAMBIO EN EL PERFIL DE FENOLES Y ACIDOS GRASOS EN CULTIVO DE RAÍCES DE *Capsicum* spp TRANSFORMADAS CON UN GEN DE PAL

Emily Zamudio Moreno¹, Josefina Pérez Vargas¹, María Aurora Martínez Trujillo¹, Mayola Gracia Rivero¹, Octavio Gómez Guzmán², Graciano Calva Calva². ¹Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Posgrado en Ingeniería Bioquímica, ²Biotecnología CINVESTAV-IPN, Ingeniería Metabólica. Av. IPN 2508, San Pero Zacatenco, México D. F. Fax 50613313, gcalva@cinvestav.mx

Palabras clave: Fenilalanina amonio liasa, PAL, Fenilpropanoides.

Introducción. El chile, plantas del género *Capsicum*, es la única fuente natural de capsaicinoides, compuestos producidos y acumulados en los frutos de esta planta y que les confieren su sabor pungente característico. Según la literatura se forman vía la ruta de los fenilpropanoides por condensación de vainillilamina con una serie de acil-ácidos grasos-CoA de 9-11 carbonos en el tonoplasto de vesículas especializadas denominadas capsisomas. La vainillilamina proviene del ácido ferúlico, mientras que el acil-acido graso-CoA proviene de la activación del ácido graso respectivo con la CoA. Se ha sugerido que la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) que cataliza la conversión de fenilalanina a ácido cinámico, en los frutos de *Capsicum* también puede estar participando en la regulación del flujo metabólico hacia la síntesis de capsaicinoides.

El objetivo de este trabajo fue investigar esta hipótesis, evaluando el efecto de la expresión de un gen foráneo de PAL en cultivos de raíces transformadas de *Capsicum* spp sobre el perfil de compuestos fenólicos y ácidos grasos relacionados a la ruta de biosíntesis de capsaicinoides.

Metodología. Se usaron tres variedades de *Capsicum*: habanero, jalapeño y pimiento morrón. Los cultivos de raíces transformadas se establecieron mediante punción del hipocotilo de plántulas de 15-20 días con *Agrobacterium rhizogenes* 9402 previamente transformada con el gen de PAL1 de *Petroselinum crispum* (perejil) introducido en vector pCAMBIA 3301. Este último tiene el promotor CaMV del virus del mosaico de la coliflor, el gen de resistencia al herbicida BASTA (*bar*), y el de resistencia a kanamicina (*kan*). Tanto en estos cultivos transgénicos como en cultivos de raíces sin transformar se evaluó el perfil de compuestos fenólicos por HPLC y de ácidos grasos por GC, ambos crecidos en medio SH, sin reguladores de crecimiento o con ácido naftalenacético 1 μ M según el caso.

Resultados y discusión. En estudios previos se demostró que las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* 9402 y AR1500 fueron las más efectivas para la inducción de raíces transformadas en cualquiera de cinco variedades de *Capsicum*. Con estos datos se transformó *A. rhizogenes* 9402 con el vector vacío (pCAMBIA) y llevando el gen de PAL1 (PAL) para la transfección de *Capsicum* mediante la infección de hipocotilos de un promedio de 120 plántulas. Después de 27 y 33 días la variedad de *Capsicum chinense* mostró presencia de raíces en los puntos de la punción. El

perfil de compuestos fenólicos en biomasa y medio de cultivo de estas raíces transformadas fue en general menos complejo que el de las raíces no transformadas, sin embargo también se obtuvieron líneas que mostraban perfiles más complejos que los cultivos normales. Típicamente, en los extractos de raíces transformadas el análisis por HPLC mostró la presencia de flavonoides (quercetina y luteolina), y acumulación sustancial de ácido ferúlico y vainillina, precursores inmediatos de la vainillilamina en la biosíntesis de capsaicinoides. Por otra parte, aunque el perfil de ácidos grasos varió mucho entre los cultivos (Tabla I), su contenido fue significativamente menor que en frutos. Los ácidos precursores de la cadena alifática de los capsaicinoides se observaron en los cultivos de raíces transformadas de *Capsicum chinense*, el más pungente de las variedades estudiadas. Sin embargo, interesantemente, también se detectaron estos ácidos en los cultivos de *Capsicum grossum* (Pimiento morrón), un fruto que normalmente no produce capsaicinoides. Esta observación está bajo análisis y reproducción experimental.

Tabla I. Ácidos grasos en cultivos de raíces de *Capsicum*

Acido graso	Frutos* <i>Capsicum</i> annuum	<i>Capsicum</i> <i>grossum</i> 9402	<i>Capsicum</i> annuum 9402	<i>Capsicum</i> annuum PAL	<i>Capsicum</i> <i>chinense</i> 9402	<i>Capsicum</i> <i>chinense</i> CAMBIA
Caproico C ₁₀	0.2	nd	nd	nd	nd	nd
8-Me-Nonanoico	nd	0.001	nd	nd	nd	nd
6t-8M-Nonenoico	nd	0.520	nd	nd	nd	0.003
Laurico C ₁₂	0.2	0.005	0.005	nd	nd	nd
Mirístico C ₁₄	0.6	0.001	0.002	0.002	nd	nd
Palmitico C ₁₆	16.0	0.137	0.036	0.036	0.020	nd
Esteárico C ₁₈	3.3	0.036	0.018	0.018	nd	nd
Aráquidico C ₂₀	1.8	0.002	0.004	0.004	nd	0.015
Palmitoléico C _{16:1}	1.6	0.137	0.036	nd	0.020	nd
Oléico C _{18:1}	17.0	0.008	0.018	nd	nd	0.005
Linoléico C _{18:2}	52.2	0.017	nd	nd	0.012	nd
Linoléico C _{18:3}	4.5	0.017	nd	nd	0.017	nd

Conclusiones. El perfil de fenoles y ácidos grasos relacionados a capsaicinoides fue dependiente del constructo de DNA transferido a las raíces. Aunque se detectó la presencia de varios fenilpropanoides y otros fenoles comúnmente observados en frutos de *Capsicum*, no se detectó la presencia de vainillilamina y otros precursores inmediatos de capsaicinoides. De cualquier forma, y aunque no se observó la presencia de capsaicinoides en ninguno de los cultivos, los resultados sugieren que es posible establecer cultivos transgénicos útiles para el estudio de puntos o nodos específicos dentro de la vía de capsaicinoides.

Agradecimientos. A CONACYT, por la beca otorgada al primer autor y por apoyar el proyecto CONACYT 47678.