

Artículo Original

Inducción de la biosíntesis local de antocianinas en frutos de *Myrciaria dubia* mediante lesiones mecánicas

[Induction of local biosynthesis of anthocyanins in fruits of *Myrciaria dubia* "camu camu" by mechanical injury]

Daniel Edgar Motta-Santillán¹, Hernán Pierr Torrejón Dávila¹, Ligia Beatriz Tello Ruíz¹, Jorge Luis Marapara del Aguila¹, Marianela Cobos Ruíz^{1,2}, Sixto Imán Correa³, Juan Carlos Castro Gómez^{1*}

¹Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Psje. Los Paujiles S/N AAHH Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Iquitos, Perú.

²Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética, Universidad Científica del Perú (UCP), Av. Abelardo Quiñones km 2,5, San Juan Bautista, Iquitos, Perú.

³Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA). Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Estación Experimental Agraria "San Roque". Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Calle San Roque 209, San Juan Bautista, Loreto, Perú.

*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

Resumen

En las plantas las antocianinas cumplen roles fundamentales en sus interacciones con el medio ambiente, son una de las líneas de defensa contra los radicales libres, la radiación ultravioleta y el ataque de patógenos. Observaciones realizadas muestran que los frutos de *M. dubia* acumulan antocianinas alrededor de lesiones mecánicas probablemente causadas por insectos. Por tanto, hemos probado la hipótesis que produciendo lesiones mecánicas en frutos verdes de *M. dubia* se induce la biosíntesis local de antocianinas. De tres plantas en fructificación de la colección de germoplasma del INIA se seleccionaron aleatoriamente 40 frutos verdes (25 ± 5 mm de \emptyset) y se causaron lesiones mecánicas con estilete o bisturí al 75% de ellos. Posteriormente, se registró el porcentaje de acumulación de antocianinas por área superficial del fruto a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se observó acumulación de antocianinas en ~10% (24 horas), ~30% (48 horas) y ~70% (72 horas) del área superficial de los frutos. En conclusión, las lesiones mecánicas causadas en frutos de *M. dubia* inducen la biosíntesis local de antocianinas, probablemente como un mecanismo de defensa efectivo desarrollado por esta especie. La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en esta respuesta fisiológica nos permitirá establecer las bases para la mejora genética de esta especie.

Palabras clave: Biosíntesis de antocianinas, camu-camu, frutal amazónico, lesiones mecánicas.

Abstract

Anthocyanins in plants have key roles in their interactions with the environment, are one of the lines of defense against free radicals, ultraviolet radiation and pathogen attack. Observations show that fruits of *M. dubia* accumulate anthocyanins around mechanical injury probably caused by insects. We tested, therefore, the hypothesis that mechanical injury of unripe fruits of *M. dubia* induced local anthocyanin biosynthesis. From three plants in fructification of the germplasm collection of INIA were randomly selected 40 unripe fruits (25 ± 5 mm of \emptyset) and were caused mechanical injuries with stilets or scalpel in 75% of them. Then, the percentage of anthocyanin accumulation was recorded for surface area of fruits at 0, 24, 48, and 72 hours. Was observed anthocyanin accumulation in ~10% (24 hours), ~30% (48 hours), and ~70% (72 hours) for fruits surface area. In conclusion, mechanical injury of fruits of *M. dubia* induces local anthocyanin biosynthesis, probably as an effective defense mechanism developed by this species. Understanding the molecular mechanisms involved in the physiological response will allow us to establish the basis for genetic improvement of this species.

Keywords: Anthocyanin biosynthesis, camu-camu, Amazonian fruit, mechanical injury.

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia "camu-camu" es un arbusto nativo de la Amazonía que sobresale por sus frutos con alto contenido de ácido L-ascórbico, comúnmente conocido como vitamina C (Bradfield y Roca 1964; Imán et al., 2011). Adicionalmente, sus frutos contienen diversos compuestos fitoquímicos de interés farmacológico (Akachi et al., 2010; Akter et al., 2011; Fracassetti et al., 2013). Entre estos compuestos están las antocianinas (Castro et al., 2013; Zanatta et al., 2005). El gran interés por las antocianinas radica en que tiene múltiples beneficios para la salud humana, porque su consumo regular está asociado con un riesgo reducido de enfermedades crónicas, como el cáncer, enfermedad cardiovascular y desórdenes neurodegenerativos (Kozłowska y Szostak-Wegierek 2014). Además, en las plantas las antocianinas cumplen roles fundamentales en sus

interacciones con el medio ambiente, son una de las líneas de defensa contra los radicales libres, la radiación ultravioleta y la invasión de patógenos (Cheynier et al., 2013; Mouradov y Spangenberg 2014). Estudios recientes muestran que la biosíntesis (Fig. 1) y acumulación de antocianinas, principalmente cianidina-3-glucósido sucede en varios tejidos y en diferentes etapas de maduración de los frutos de *M. dubia* (Castro et al., 2013). Asimismo, observaciones de campo indican que los frutos verdes con lesiones, probablemente causadas por insectos plaga, muestran acumulación de antocianinas a su alrededor. Por tanto, en esta investigación reportamos los resultados de un experimento realizado para probar la hipótesis que produciendo lesiones mecánicas en frutos verdes de *M. dubia* se induce la biosíntesis local de antocianinas.

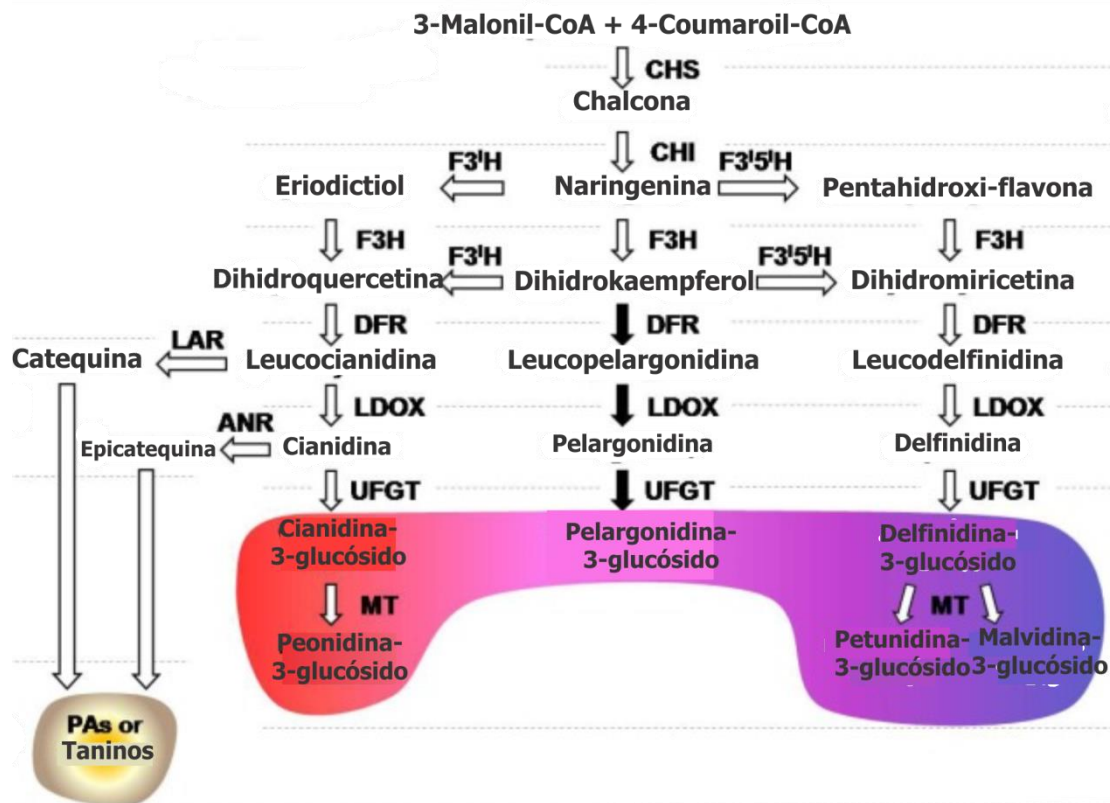


Figura 1. Esquema de la vía biosintética de flavonoides en plantas. CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H: flavonoide 3',5'-hidroxilasa; DFR: dihidroflavonol reductasa; LDOX: leucoantocianidina oxidasa; UFGT: UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosil transferasa; MT: metiltransferasa. Ramas para la síntesis de Proantocianidinas (PAs); LAR: leucoantocianidina reductasa; ANR: antocianidina reductasa; STS: estilbeno sintasa. Fuente: modificado de Petrusa et al., 2013.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las plantas en fructificación de *M. dubia* fueron de la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, Estación Experimental San Roque-Loreto, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el Km 25½ de la carretera Iquitos- Nauta (03°57'17" LS, 73°24'55" LO). Esta colección está conformada por 43 accesiones obtenidas de ocho cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas), establecidas hace aproximadamente 20 años.

Lesiones mecánicas de frutos

Se identificaron tres plantas de *M. dubia* en fructificación, con predominancia de frutos verdes (50 a 60 días después de la antesis). De cada planta se seleccionaron al azar 40 frutos (25 ± 5 mm de Ø), de estos 10 fueron mantenidos intactos (grupo control), 15 fueron picados con estiletes y 15 fueron cortados con bisturíes (Figura 2). Después de provocar las lesiones se registraron fotográficamente *in situ* a las 0, 24, 48 y 72 horas entre las 7 y 9 am.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las lesiones provocadas en los frutos verdes de *M. dubia* indujeron la biosíntesis local de antocianinas (Figura 3). Con ambos tratamientos que se causaron las lesiones (estilete y bisturí) indujeron la biosíntesis local de antocianinas a las 24 horas (~10% del área superficial de los frutos). Adicionalmente, en ambos tratamientos se evidenció un aumento gradual de la acumulación de

antocianinas en el área superficial de los frutos a las 48 (~30%) y 72 (~70%) horas (Fig. 3B y 3C), en contraste con los frutos que no fueron lesionados (Fig. 3A). Con este experimento realizado y los resultados obtenidos demostramos que la hipótesis formulada "la producción de lesiones mecánicas en frutos verdes de *M. dubia* induce la biosíntesis local de antocianinas" queda demostrada. Además, estos hallazgos corresponden con investigaciones previamente realizadas en plantas en general, donde se indica que las antocianinas tienen funciones de vital importancia en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés provocadas por factores bióticos o abióticos (Cheynier *et al.*, 2013; Mouradov y Spangenberg 2014).

La acumulación de las antocianinas en los frutos de *M. dubia* lesionados se puede atribuir a la biosíntesis de *novo* de las antocianinas como la cianidina-3-glucósido. La biosíntesis de este compuesto se realiza en la vía de los flavonoides (Figura 1). En esta vía metabólica participan enzimas que pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados a membranas (Petruzza *et al.*, 2013). Entre estas enzimas figuran la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintetasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona-3-hidroxilasa (F3H), flavanona-3'-hidroxilasa (F3'H) dihidroflavonol reductasa (DFR), leucoantocianidina oxidasa (LDOX) y UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa (UFGT). Esta última enzima convierte la cianidina en cianidina-3-glucósido (Petruzza *et al.*, 2013).



Figura 2. Tratamientos aplicados a los frutos verdes de *M. dubia*. A: grupo control (sin lesiones mecánicas), B: lesión de frutos con estilete y C: lesión de frutos con bisturí.

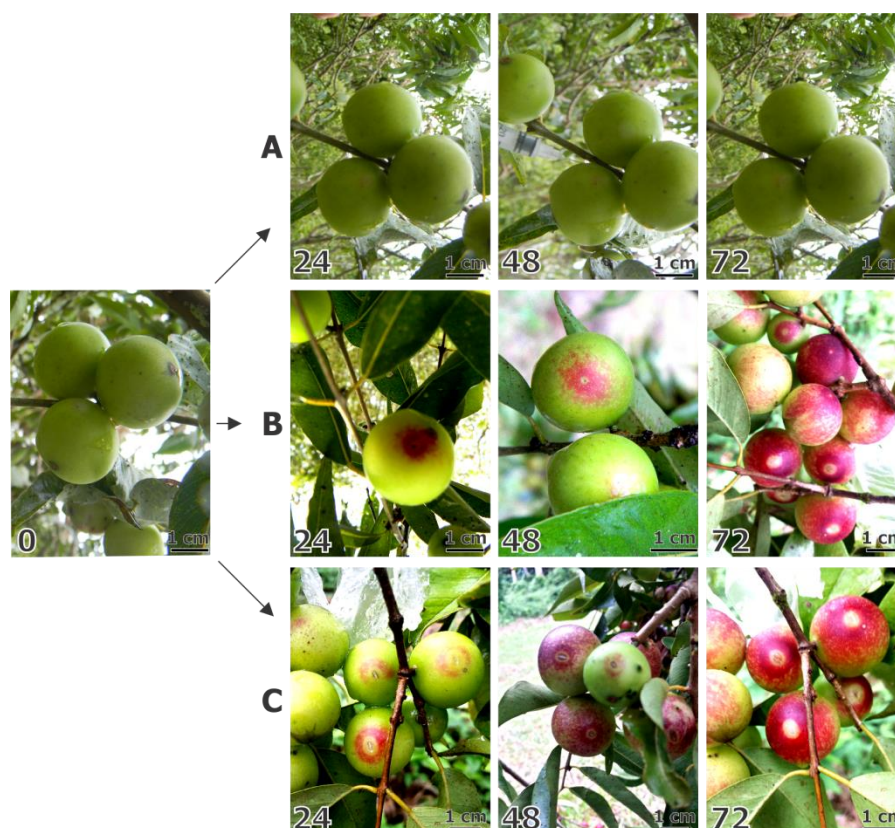


Figura 3. Inducción de la biosíntesis local de antocianinas en frutos de *M. dubia* por un periodo de 72 horas. A: grupo control (sin lesiones mecánicas), B: frutos lesionados con estilete y C: frutos lesionados con bisturí.

CONCLUSIONES

Las lesiones mecánicas causadas en frutos de *M. dubia* inducen la biosíntesis local de antocianinas, probablemente como un mecanismo de defensa efectivo desarrollado por esta especie. La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en esta respuesta fisiológica nos permitirá establecer las bases para la mejora genética de esta especie

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por el financiamiento de la investigación y al Instituto Nacional de Innovación Agraria por el acceso a la colección de germoplasma de *Myrciaria dubia*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akachi T, Shiina Y, Kawaguchi T, Kawagishi H, Morita T, and Sugiyama K. 2010. 1-methylmalate from camu-camu (*Myrciaria dubia*) suppressed D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 573-578.
- Akter MS, Oh S, Eun J-B, Ahmed M. 2011. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Res Int* 44: 1728-1732.
- Bradfield RB, and Roca A. 1964. Camu-camu - a fruit high in ascorbic acid. *J Am Diet Assoc* 44: 28-30.
- Castro JC, Gutierrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Cobos M, Imán SA. 2013. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* "camu camu." *Rev Soc Quím Perú* 79(4): 319-330.

- Cheyrier V, Comte G, Davies, KM, Lattanzio V, Martens S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* 72: 1-20.
- Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomás-Barberán FA. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chem* 139: 578-588.
- Imán S, Bravo L, Sotero V, Oliva C. 2011. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci Agropecu* 2: 123-130.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. 2014. Flavonoids--food sources and health benefits. *Rocz Państw Zakładu Hig* 65: 79-85.
- Mouradov A, Spangenberg G. 2014. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front Plant Sci* 5: 620.
- Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A. 2013. Plant Flavonoids-Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int J Mol Sci* 14: 14950-14973.
- Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. 2005. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J Agric Food Chem* 53: 9531-9535.