



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional de
Ciencias Biológicas

**“CORRELACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *PAL*, *CHS* y
UFGT CON LA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS DE
Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

Autora:

Cindy Patricia López Lozano

Iquitos – Perú
2016

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



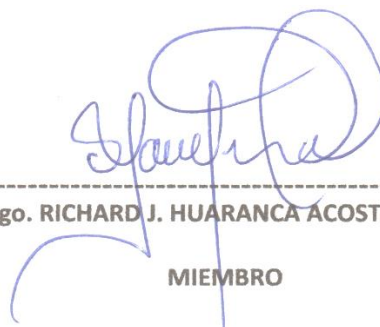
Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.

PRESIDENTE



Blgo. JORGE L. MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.

MIEMBRO



Blgo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.

MIEMBRO

ASESOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Juan Carlos Castro Gómez', written over a horizontal dashed line.

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS


Iquitos, 12 de agosto de 2016

En la ciudad de Iquitos, a los doce (12) días del mes de agosto de 2016 y, siendo las 11.10 horas; se reunió en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 105-2014-DEFP-B-UNAP, presidido e integrado por: Blga. **JANETH BRAGA VELA**, Dra., (Presidente); Blgo. **JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA**, Dr., (Miembro); Blgo. **RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA**, M.Sc. (Miembro); para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: "**CORRELACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES PAL, CHS Y UFGT CON LA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh**", realizado por la bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas-Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas: **Cindy Patricia López Lozano** de la Promoción II-2013, graduada de Bachiller con R.R. N° 0738-2014-UNAP de fecha 14 de abril de 2014; reconociendo como asesor: Blgo. **JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ**, Dr.


Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño de la bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por la bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dio como veredicto: APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS, CALIFICADA COMO MUY BUENA; quedando en consecuencia la candidata apta para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12.30 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.


Blga. **Janeth Braga Vela**, Dra.
PRESIDENTE


Blgo. **Jorge Luis Marapara del Águila**, Dr.
MIEMBRO


Blgo. **Richard Javier Huaranca Acostupa**, M.Sc.
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e – mail: fccbb@unapiquitos.edu.pe

DEDICATORIA

A Dios, por sostener mi mano y protegerme siempre.

A mi vidita, mi amado hijito Sebastián, con todo mi amor, por tu sonrisa y tu amor incomparable que me regalas todos los días.

A mi querida mamá Angelita Lozano, gran mujer y soporte para la familia, por su apoyo incondicional; así como a cada uno de mis hermanos, sobrinos y a mi mamita Julia Sánchez, mi querida abuelita.

A Jorge, mi compañero y amigo, por su confianza y apoyo constante, por estar conmigo en todo momento, por animarme y compartir juntos importantes acontecimientos.

A un hombre maravilloso que con su tierna mirada y sonrisa nos transmitía tanto amor, mi padre Joel Agustín, que Dios lo tenga en su gloria.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores: Blgos. Juan Carlos Castro Gómez y Jorge Angulo Quintanilla, por la dedicación, paciencia y asesoramiento brindados en todas las etapas de mi tesis. Grandes profesionales, investigadores y seres humanos que me motivaron a conocer y formar parte de la ciencia.

Al Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía – CIRNA, Unidad Especializada de Biotecnología; por concederme las instalaciones para el desarrollo de mi tesis; mención especial al Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila, coordinador de la UEB.

A la Dra. Marianela Cobos Ruiz, jefa del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú; por el apoyo con equipos del laboratorio.

A mis compañeros y amigos que forman parte del Área de Biotecnología, en especial a Ligia Tello, Anderson Medina, Napoleon Rodriguez, Brucee Jiu, Brian Petterman; sin olvidar a Jhoao Fasabi, Andry Mavila y Almendra Panaifo.

A mi madre, mis hermanos y a todas aquellas personas que confiaron en mí y de alguna manera contribuyeron con el desarrollo del presente trabajo.

Al MSc. Sixto Alfredo Imán Correa y al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por brindarnos el acceso a la colección de germoplasma de *Myrciaria dubia* del INIA para la obtención de las muestras botánicas.

A Vanessa Del Castillo y Aurora Romero, compañeras y amigas que me brindaron su compañía y ayuda durante mis años de estudio y estuvieron conmigo en los momentos difíciles.

ABREVIATURAS

<i>PAL</i>	Fenilalanina amonio liasa
<i>CHS</i>	Chalcona sintetasa
<i>UFGT</i>	UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agraria
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNhn	ARN heterogéneo nuclear
IDT	Integrated DNA Technologies
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
qPCR	PCR cuantitativo o PCR en tiempo real
T _m	Temperatura media de fusión
CT	Ciclo Umbral

dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
CM	Cáscara de fruto maduro
CP	Cáscara de fruto pintón
CV	Cáscara de fruto verde
PM	Pulpa de fruto maduro
PP	Pulpa de fruto pintón
PV	Pulpa de fruto verde
pb	Par de bases

RESUMEN

Myrciaria dubia es un frutal amazónico que produce diversas sustancias nutritivas y bioactivas. Sobresale por su alto contenido de vitamina C, seguido de las antocianinas, principalmente de cianidina-3-glucósido, que se acumula en la cáscara de frutos pintones y maduros. Sin embargo, aún desconocemos qué genes participan en la biosíntesis y acumulación de cianidina-3-glucósido en esta especie y cuál es la relación del nivel de expresión de estos genes con el contenido de antocianinas. El principal objetivo de esta investigación fue determinar la correlación entre el nivel de expresión de los genes fenilalanina amonio liasa (*PAL*), chalcona sintetasa (*CHS*) y UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa (*UFGT*) con la concentración de antocianinas en frutos de *Myrciaria dubia*. Los frutos (verdes, pintones y maduros) se obtuvieron de la colección de germoplasma de *M. dubia* del INIA, de los cuales se extrajo y cuantificó las antocianinas. Asimismo, se purificó el ARN total. Luego por transcripción reversa se sintetizó el ADNc y amplificaron los genes de interés y un gen de referencia (*SAND*) mediante PCR en tiempo real (qPCR). Los resultados indican que el contenido de antocianinas es mayor en la cáscara de frutos maduros (759,98 mg/L), seguido por la cáscara de frutos pintones (478,91 mg/L) y verdes (40,11 mg/L). El nivel de expresión de los tres genes analizados mostraron correlación positiva y significativa ($r > 0,90$; $p < 0,05$) con el contenido de antocianinas en los frutos de *M. dubia*. En conclusión, el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* muestran correlación positiva con el contenido de antocianinas en frutos de *M. dubia*.

Palabras clave: antocianinas, expresión genética, flavonoides, *Myrciaria dubia*.

ABSTRACT

Myrciaria dubia is an amazonian fruit that produces various nutrients and bioactive substances. Stands out for its high content of vitamin C, followed by anthocyanins, mainly cyanidin-3-glucoside, which accumulates in the fruit peel green-mature and mature. However, we do not yet know which genes involved in the biosynthesis and accumulation of cyanidin-3-glucoside in this species and what is the relationship of the level of expression of these genes in the anthocyanin content. The main objective of this research was to determine the correlation between the expression level of phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL*), chalcone synthase (*CHS*) and UDP- glucose: flavonoid-3-O-glucosyl transferase (*UFGT*) with concentration anthocyanins in fruits of *Myrciaria dubia*. The fruits (green, green-mature and mature) were obtained from the germplasm collection of *M. dubia* INIA, which was extracted and quantified anthocyanins. Also, the total RNA was purified. Then he synthesized by reverse transcription and amplified cDNA genes of interest and reference gene (*SAND*) by real-time PCR (qPCR). The results indicate that the anthocyanin content is higher in the ripe fruit peel (759.98 mg/L), followed by green-mature fruit peel (478.91 mg/L) and green (40.11 mg/L). The level of expression of the three genes analyzed showed significant positive correlation ($r > 0.90$, $p < 0.05$) with the content of anthocyanins in the fruits of *M. dubia*. In conclusion, the level of expression of *PAL*, *CHS* and *UFGT* genes show positive correlation with the content of anthocyanins in fruits of *M. dubia*.

Keywords: anthocyanins, gene expression, flavonoids, *Myrciaria dubia*.

ÍNDICE

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	ii
ASESOR.....	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE	3
2.1.1. Clasificación Taxonómica	3
2.1.2. Distribución Geográfica.....	4
2.1.3. Descripción Botánica.....	5
2.1.4. Las sustancias nutritivas y bioactivas que contiene.....	7
2.1.5. Las Antocianinas en <i>M. dubia</i>	8
2.2. BASES TEÓRICAS.....	9
2.2.1. Expresión de Genes y Regulación.....	9
2.2.2. Las Antocianinas.....	15
2.2.3. Biosíntesis de los Flavonoides	17
2.3. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE EXPRESIÓN DE GENES	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	28
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	28
3.2.1. Población	28

3.2.2. Muestra	28
3.3. ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN	29
3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
3.5. PROCEDIMIENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS.....	30
3.5.1. Lugar de Ejecución	30
3.5.2. Obtención de la Muestra Biológica	30
3.5.3. Extracción y cuantificación de antocianinas	30
3.5.4. Purificación de ARN total	31
3.5.5. Determinación de la Calidad y Cantidad del ARN	34
3.5.6. Evaluación de la Integridad del ARN	34
3.5.7. Diseño de cebadores para PCR en tiempo real.....	34
3.5.8. Transcripción Reversa	35
3.5.9. PCR en tiempo real.....	36
3.6. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS.....	37
IV. RESULTADOS	40
4.1. Concentración de Antocianinas	40
4.2. Expresión relativa de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i>	42
4.3. Correlación del nivel de expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> con el contenido de antocianinas	46
V. DISCUSIÓN	50
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. RECOMENDACIONES.....	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
IX. ANEXOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 01: Estructura y sustituyentes de las antocianinas.....	16
Figura N° 02: Biosíntesis de antocianinas y su regulación en la síntesis de cianidina-3-glucósido.....	22
Figura N° 03: Flujograma metodológico.....	39
Figura N° 04: Contenido de antocianinas en diferentes estadio de maduración de frutos de <i>M. dubia</i>	41
Figura N° 05: Expresión relativa de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en cáscara de frutos de <i>M. dubia</i>	43
Figura N° 06: Expresión relativa de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en pulpa de frutos de <i>M. dubia</i>	45
Figura N° 07: Correlación entre el nivel de expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> con la concentración de antocianinas en cáscara de frutos en los diferentes estadios de maduración de frutos de <i>M. dubia</i>	47
Figura N° 08: Correlación entre el nivel de expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> con la concentración de antocianinas en pulpa de frutos en los diferentes estadios de maduración de frutos de <i>M. dubia</i>	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Del Área de Colecta del Material Biológico.	
Figura N° 01: Ubicación de la colección de Germoplasma de <i>Myrciaria dubia</i> del INIA.....	67
Anexo II: De la Metodología empleada.	
Figura N° 02: Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de ARN total de frutos (cáscara y pulpa) en diferentes estadios de maduración de 3 accesiones.....	68
Figura N° 03: Condiciones del RT-PCR.....	68
Figura N° 04: Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real (qPCR).....	69
Figura N° 05: Condiciones del PCR en tiempo real (qPCR).....	69
Figura N° 06: Perfil de fluorescencia relativa de la amplificación del PCR en tiempo real (qPCR) de los genes de estudio <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> ; y del gen de referencia <i>SAND</i> , de muestras de cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	70
Figura N° 07: Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones de los genes estudiados (<i>PAL</i> 72pb, <i>CHS</i> 85pb y <i>UFGT</i> 70pb) y del gen de referencia (<i>SAND</i> 88pb).....	70
Anexo III: Tablas de concentración de Antocianinas y de ARN; y de datos estadísticos.	
Tabla N° 01: Valores de absorbancias y concentración de antocianinas...71	
Tabla N° 02: Valores de absorbancias, ratios de calidad y concentración de ARN total.....	72
Tabla N° 03: Características de los cebadores diseñados para los genes de estudio.....	73
Tabla N° 04: Resultados del análisis estadístico descriptivo del contenido de antocianinas y la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> de cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	74

Tabla Nº 05: Resultados del ANOVA del contenido de antocianinas y al expresión de lo genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	75
Tabla Nº 06: Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas entre el contenido de antocianinas y la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	76
Tabla Nº 07: Resultados del ANOVA del contenido de antocianinas y al expresión de lo genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	77
Tabla Nº 08: Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas entre el contenido de antocianinas y la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	78
Tabla Nº 09: Resultados de la correlación bivariada de Pearson para determinar diferencias significativas en el contenido de antocianinas y la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	79
Tabla Nº 10: Resultados de la correlación bivariada de Pearson para determinar diferencias significativas en el contenido de antocianinas y la expresión de los genes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> y <i>UFGT</i> en pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de <i>M. dubia</i>	80

I. INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh “camu-camu”, es un frutal amazónico que produce diversas sustancias nutritivas y bioactivas. Pero sobresale por su alto contenido de vitamina C, que varía de 0,6 a 2,5 g/ por 100 g de pulpa (1). Por tanto, el contenido de vitamina C en los frutos del camu-camu es muy superior a cítricos como el limón y la naranja (2). Además, en la cáscara de frutos pintones y maduros se acumulan las antocianinas, principalmente la cianidina-3-glucósido (3).

La biosíntesis de antocianinas como la cianidina-3-glucósido se realiza en la vía de los flavonoides. En esta vía metabólica participan enzimas que pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados a membranas (4, 5). 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*) (6). Esta última enzima convierte la cianidina en cianidina-3-glucósido (7).

Los genes y enzimas que participan en la biosíntesis de las antocianinas, particularmente cianidina-3-glucósido, han sido estudiados en varias especies de plantas. Entre estas especies figuran *Malus domestica* “manzana” (8), *Vitis vinífera* “uva” (9), *Nicotiana tabaco* “tabaco” (10), *Hibiscus sabdariffa* “jamaica” (11), *Zea mays* “maíz” (12), *Arabidopsis thaliana* “arabidopsis” y *Petunia hybrida* “petunia” (4). Todos estos estudios genéticos y bioquímicos han permitido dilucidar por completo

la ruta biosintética de los flavonoides (13), también denominada la ruta del fenilpropanoide (14, 15).

Estudios recientes indican que la producción y acumulación de cianidina-3-glucósido ocurre en varios tejidos y en diferentes etapas de maduración de los frutos de *M. dubia*. Esto ha sido demostrado por Castro *et al.* (1), quienes reportan una amplia variación y gradientes de concentración muy marcadas en los frutos maduros ($F = 34$; $gl = 3$; $p < 0,001$). Sin embargo, aún no se conocen que genes y enzimas están involucrados en la biosíntesis y acumulación de cianidina-3-glucósido en esta especie y cuál es su relación con el contenido de antocianinas en los frutos en diferentes estadios de maduración. Esta falta de información científica nos impide comprender cómo ocurre la biosíntesis y acumulación de cianidina-3-glucósido en los frutos de esta especie. Al conocer cómo se regula y funciona este importante proceso metabólico se podrá desarrollar estrategias para la mejora genética de este importante frutal amazónico.

Por tanto, para cubrir parte de este vacío y contribuir con el conocimiento científico en esta investigación, nos propusimos como objetivo general determinar la correlación entre el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* con la concentración de antocianinas en frutos de *Myrciaria dubia*; y como objetivos específicos: medir el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*; asimismo, cuantificar las antocianinas en la cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE

2.1.1. Clasificación Taxonómica

Los estudios taxonómicos actuales del APG IV (Angiosperm Phylogeny Group 2016) (16) clasifican a la especie estudiada de la siguiente manera:

Dominio	:	Eukaryota
Reino	:	Plantae
Clado	:	Angiosperms
Clado	:	Eudicots
Clado	:	Core eudicots
Clado	:	Rosids
Clado	:	Malvids
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Myrtaceae
Subfamilia	:	Myrtoideae
Género	:	Myrciaria
Especie	:	<i>Myrciaria dubia</i>
Nombre científico	:	<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh
Nombre común	:	“camu-camu” (arbusto)

2.1.2. Distribución Geográfica

Myrciaria dubia (Myrtaceae) es un frutal arbustivo silvestre de la Amazonía. Crece en las riberas inundables de los ríos, lagos, cochas de aguas oscuras formando poblaciones naturales densas y puede permanecer completamente sumergido en agua durante 4 ó 5 meses (2). El hábitat principal son las zonas naturales inundables, aunque se da en suelos de altura en forma de sembríos manejados. En el Departamento de Loreto, las poblaciones naturales se encuentran en los ríos Putumayo, Napo, Curaray, Tigre, Marañón, Yavarí, Ucayali y muchos otros ríos como el Itaya y Nanay (17).

Esta especie se encuentra en las riberas de los ríos Solimoes (Amazonas), Negro, Trombetas, Xingu, Tocantines, Madeira, Tapajos, Acre, Yavarí, Macangana y Urupé, en el Brasil; Amazonas, Ucayali, Marañón, Napo, Tigre, Curaray, Yavarí y Tahuayo, en el Perú; Putumayo e Inírida, en Colombia; así como también en la cuenca superior del Orinoco, en Venezuela. La mayor concentración y diversidad de las poblaciones se encuentra en la Amazonía peruana (2, 18).

En la quebrada "Iricahua" afluente del río Ucayali, existen poblaciones de *M. dubia* tipo árbol relativamente medianas y cuya época de recolección se efectúa entre los meses de enero y marzo. Cabe indicar

que *M. dubia* tipo árbol no se encuentra en poblaciones compactas como el tipo arbustivo, sino en asociación con otras especies forestales como capirona, quinilla, shimbillo, entre otras, a una densidad que oscila entre 20 a 50 individuos por hectárea (19).

2.1.3. Descripción Botánica

M. dubia es una planta arbustiva, perenne de crecimiento indeterminado. Se distinguen tres tipos de plantas: tipo columnar, que se caracteriza por tener poca o nula ramificación; tipo intermedio, cuya ramificación está a una altura de 50 a 70 cm del suelo; y el tipo copa abierta o cónica, que es la planta ideal, tiene muchas ramificaciones desde el suelo, con muchas ramas fructíferas (20).

Los arbustos de *M. dubia* miden de 4 a 8 m de altura, con una ramificación que se inicia desde la base. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricas, lisos de color marrón claro a rojizo, con una corteza que se desprende cumplido su ciclo. Las hojas son simples, de borde liso, opuestas, ovaladas, elípticas, lanceoladas y algo asimétricas. La raíz principal es de forma cónica, y muchos pelos absorbentes. Los frutos son globosos, de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro hasta negro púrpura al madurar, miden de 2 a 4 cm de diámetro, con 1 a 4 semillas por fruto, siendo la más común de 2 a 3 semillas. Las semillas

son reniformes, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud (21, 22, 23).

La floración se inicia cuando alcanzan un diámetro basal de 2,0 cm, que corresponde a los arbustos que tienen entre dos y tres años de edad aproximadamente. La floración de un individuo ocurre en forma continua. Las yemas florales emergen desde las ramas superiores, hacia las ramas inferiores. Por tanto, un individuo puede presentar yemas florales, flores y frutos en varios estados de desarrollo al mismo tiempo (2).

La Región Loreto, presenta las condiciones medioambientales ideales para el crecimiento y desarrollo de este frutal, es así que las mayores poblaciones naturales de *M. dubia* encontradas, se ubican en esta región formando rodales naturales en las orillas de las cuencas del río Amazonas (24).

Considerando sus características morfológicas, *M. dubia* se agrupa en cinco ecotipos: arbusto con hoja ancha (ecotipo 1), arbusto con hoja chica (ecotipo 2), árbol Supay (ecotipo 3), árbol Iricahua (ecotipo 4) y camucamillo (ecotipo 5) (25).

Por los estados de maduración del fruto se clasifican de acuerdo a la coloración rojiza presente en la cáscara: verdes, para aquellos que

tienen menos del 25% de coloración rojiza; verde-pintón 25-50%; pintón 50-75% y maduros, mayor del 75% de coloración rojiza (26).

2.1.4. Las sustancias nutritivas y bioactivas que contiene

Sobresale por su alto contenido de vitamina C, que superan los 1000 mg/100 g de pulpa (22, 24). Son una buena fuente de minerales tales como sodio, potasio, calcio, zinc, magnesio, manganeso, cobre, selenio, cobalto, entre otros (22, 27, 28). Presenta polisacáridos en pequeñas cantidades tales como pectina y almidón (29), glucosa y fructosa como los monosacáridos más abundantes; asimismo, contienen cuatro aminoácidos esenciales (valina, leucina, fenilalanina y treonina), aminoácidos no esenciales y ácidos orgánicos como el cítrico, isocítrico y málico (27).

En el fruto se han reportado carotenoides como β -caroteno en concentraciones entre 72,8 a 142,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y luteína en concentraciones entre 75,6 a 93,1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (30). También contiene ácidos polifenólicos de reconocida actividad antioxidante como el ácido elágico, ácido clorogénico, ácido caféico y ácido ferúlico (31, 32).

Además, se han reportado componentes volátiles en hojas y frutos del camu-camu, siendo mayoritarios el α -pineno y limoneno (33, 34).

2.1.5. Las Antocianinas en *M. dubia*

Después de la vitamina C, son las antocianinas (uno de los diferentes tipos de flavonoides) que le siguen en importancia, debido a que son responsables del color rojo del fruto y constituyen uno de los grupos más importante de antioxidantes naturales. *M. dubia* contiene entre 20 a 100 mg/100 g de antocianinas totales; la principal antocianina de *M. dubia* es la cianidina-3-glucósido, que representa el 90% de las antocianinas totales. Además de las antocianinas, incluyen a varios flavonoides tales como flavanoles (catequina, epicatequina), flavonoles (quercetina, rutina y Kaempferol), flavanonas (naringenina y eriodictiol) (3, 31, 35).

El gran interés por las antocianinas radica en que tiene múltiples beneficios en la salud humana. Por ejemplo, se ha demostrado que tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (36), anticancerígenas, antitumorales y antidiabéticas (37), efectos antigenotóxicos (38) y mejora el perfil bioquímico de obesidad (39). Debido a esta característica *M. dubia* presenta un gran interés para ser explotado en la agroindustria y farmacia (40).

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Expresión de Genes y Regulación (41)

La información genética está contenida en los genes. Estos son segmentos de ADN que contienen información para la biosíntesis de un producto funcional determinado (polipéptido o ARN). Los genes codantes de proteínas en los eucariotas suelen estar interrumpidos. Primero, porque contienen secuencias no traducidas en los extremos 5' y 3' (5' UTR y 3' UTR). Además, contienen exones e intrones. Los exones son las secuencias representadas en el ARNm maduro. Un transcripto maduro se inicia y termina con exones y extremos 5' y 3'. Sin embargo, los intrones son secuencias que son removidas cuando el transcripto primario de ARN es procesado para dar el ARN maduro. Las secuencias de los exones están en el mismo orden en el gen y en el ARN, pero un gen interrumpido es más largo que el producto de ARN maduro por la presencia de intrones.

Por tanto, la expresión de los genes interrumpidos de los eucariotas requiere un proceso adicional que los genes ininterrumpidos de los procariotas. El ADN de un gen interrumpido da lugar a un ARNhn transcripto primario que corresponde exactamente a la secuencia del ADN. Este ARNhn es un precursor, éste no es empleado para sintetizar el polipéptido. Los intrones son removidos del ARN para dar un ARNm que consiste solo de una serie de exones. En este proceso de

maduración, el ARNm tiene modificaciones químicas en los extremos 5' y 3' que van a contribuir a la estabilidad química del ARNm. Luego, el ARNm maduro generado es exportado del núcleo al citosol. Donde el ARNm es empleado en la síntesis del polipéptido.

La expresión de los genes implica el proceso completo por el cual se decodifica la información contenida en un gen con el objetivo de sintetizar un polipéptido o un ARN funcional. La regulación de la expresión genética comprende todos aquellos procesos que determinan qué genes se expresen, con qué intensidad y bajo qué condiciones en una célula específica, lo que en conjunto define el tipo y cantidad de proteínas sintetizadas. La expresión génica se regula a diferentes niveles: pretranscripcional, transcripcional, a nivel del procesamiento, transporte y estabilización del ARN mensajero (ARNm) y a nivel traduccional.

El control pretranscripcional se refiere a la regulación de la disponibilidad del ADN para su transcripción. Puede ser regulado por la condición física o bioquímica del ADN que presenta diferentes niveles de organización estructural. El grado de súper enrollamiento determina las regiones de la cromatina que están disponibles o no para la transcripción. La cromatina presenta nucleosomas conformadas por un núcleo octamérico de proteínas histonas y ADN de doble hebra enrollado alrededor de estas histonas. La

disponibilidad bioquímica del ADN puede variar de acuerdo a modificaciones reversibles del ADN o de sus proteínas asociadas (cambios epigenéticos). Las moléculas de ADN pueden ser metiladas sobre residuos de citosinas localizadas entre residuos de guaninas (islas CpG), y esta modificación conlleva cambios en la afinidad de las proteínas de unión al ADN, este hecho se asocia con el silenciamiento de genes, es decir, con una disminución en la transcripción.

Las histonas son susceptibles a modificaciones covalentes por acetilación, biotilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y poli-ADP-ribosilación. La acetilación es uno de los mecanismos más comunes de control de la expresión génica a nivel epigenético. La acetilación de los residuos de lisina en el extremo amino terminal de las histonas disminuye la carga positiva de estas proteínas, reduciendo su afinidad por el ADN. Lo que facilita la liberación del ADN del nucleosoma y su mayor disponibilidad para la transcripción. La desacetilación de las histonas, por el contrario, se asocia a una menor tasa de transcripción.

La etapa de transcripción es el principal punto de regulación de la expresión de un gen. Cada gen contiene una o varias secuencias promotoras que indican el sitio de inicio de la transcripción, aunque habitualmente cuentan con un promotor basal. El promotor basal es identificado por la ARN polimerasa tipo II ayudada por factores de

transcripción. Esta enzima se une y separa las hebras del ADN e inicia la transcripción empleando como plantilla una de las hebras del ADN, añade los ribonucleótidos trifosfatados en dirección 5'→3' hasta completar su síntesis. En este momento, la molécula de ARN completa (transcrito primario) se libera de la ARN polimerasa y ésta a su vez se disocia del ADN.

Los sitios de control transcripcional son secuencias de ADN de unión a proteínas. Incluyen a los promotores y a secuencias que pueden ubicarse cerca del promotor o a grandes distancias de éste. Entre las más estudiadas se encuentra una secuencia conservada denominada caja TATA. Esta secuencia es reconocida por factores de transcripción que, a su vez, se asocian a la ARN polimerasa indicando el sitio preciso de inicio de la transcripción. Otra secuencia promotora abundante son las islas CpG, regiones ricas en repeticiones CG (citosinas y guaninas). Las islas CpG son características de genes cuya tasa de transcripción es baja. Los factores de transcripción son proteínas que estimulan o reprimen la expresión de un gen. Interactúan con las diversas secuencias reguladoras de la transcripción.

Normalmente un gen tiene secuencias de unión para múltiples factores transcripcionales y un solo factor puede modificar la tasa de transcripción de diversos genes. Por lo tanto, la regulación de la expresión génica a este nivel es resultado de eventos combinatorios,

donde es importante la síntesis, activación y disponibilidad de los diversos factores de transcripción según las condiciones del medio celular.

Una vez que la transcripción ha concluido, la molécula de ARN formada debe modificarse para convertirse en un ARNm funcional. Estas modificaciones consisten en la síntesis del casquete 5' y en la poliadenilación del extremo 3'. La formación del casquete 5' consiste en la adición de un 7-metilguanilato al extremo 5', lo que evita la digestión enzimática del ARNm, participa en su transporte hacia el citoplasma y facilita el inicio de la traducción. En la poliadenilación se agrega una larga cadena de residuos de poliadenilato en el extremo 3'. Estas modificaciones estabilizan a la molécula de ARNm en el citosol, lo que evita su degradación por ARNasas, por lo que prolonga su vida media y facilita su unión a los factores iniciadores de la traducción.

Finalmente, el ARN transcrito sufre modificaciones a través de un proceso de corte y empalme, en donde se eliminan los intrones (secuencias no codificantes) y permanecen los exones (secuencias codificantes) del gen. Esta edición puede variar incluso entre transcritos del mismo gen, lo que da lugar a diferentes variantes de una misma proteína o isoformas. En ambos extremos de la molécula de ARNm permanecen secuencias cortas no codificantes (UTR) que participan en el control de la traducción.

La traducción consiste en transferir el mensaje codificado en el ARNm en forma de nucleótidos hacia una secuencia correspondiente de aminoácidos, con el objetivo de sintetizar un polipéptido. El proceso de traducción puede ser controlado a diferentes niveles. Existen variantes del ARN (microARN y ARN de interferencia) que reprimen la traducción o destruyen a las moléculas de ARNm. Las colas poliA de los ARNm se acortan gradualmente una vez que se encuentran en el citoplasma. Este acortamiento favorece en un momento dado la degradación del ARNm mediada por exonucleasas.

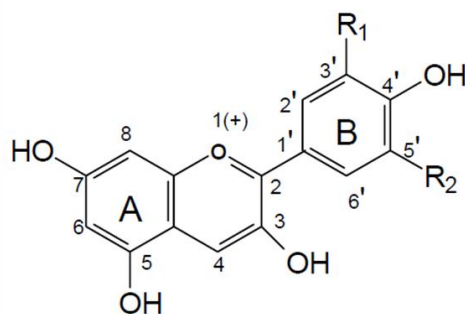
Existen proteínas de control traduccional específicas de secuencia cuyos sitios de unión se encuentran en las regiones UTR no codificantes. Los efectos de estas proteínas adaptadoras sobre el control de la traducción son variados, ya que pueden estabilizar o inducir la degradación del ARNm y aumentar o disminuir la traducción. Este efecto depende del tipo de proteína que se une y de la asociación de otros factores, lo que en conjunto influye en la correcta expresión espacial y temporal de los genes en una célula. Finalmente, la detección de errores de transcripción en la molécula de ARNm favorece su degradación y evita la síntesis de proteínas disfuncionales.

2.2.2. Las Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (42). Pertenecen al complejo grupo de los compuestos fenólicos y confieren a frutos, flores y hojas los colores azul, rojo y violeta (43), se sintetizan a partir de los precursores fenilalanina y acetato, por medio de la ruta fenilpropanoide (44), misma que es regulada a nivel génico y está altamente influenciada por factores ambientales (43).

Su estructura corresponde a heterociclos formados por la combinación de una aglicona y un azúcar generalmente glucosa (45).

La aglicona presenta distintos patrones de hidroxilación y de metilación en las posiciones 3' (R1) y 5' (R2) del anillo B (5), resultando seis antocianidinas conocidas: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delphinidina (Df) (Figura N° 01).



Aglicona	Substitución		λ_{max} (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura Nº 01. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (46).

Además, la naturaleza y el número de azúcares ligados a la molécula (glucosilación), la posición de esta unión, la naturaleza y el número de ácidos alifáticos y aromáticos que se unen al azúcar durante la acetilación, juegan un importante rol en el color y en la estabilidad del compuesto (47). Otros factores de estabilización son la formación de complejos con iones metálicos como aluminio, y la co-pigmentación que es la acetilación con otros flavonoides incoloros (48).

En los frutos se encuentran principalmente Cy (50%), Pg (12%), Pn (12%); con cuatro tipos de glucosilación las antocianinas glucosiladas más frecuentes son: 3-monósidos; 3-biósididos; 3,5-diglicósidos y 3,7 diglucósidos (43).

Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la

protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana. El interés por los pigmentos antociánicos y su investigación científica se ha incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial (49, 50).

2.2.3. Biosíntesis de los Flavonoides

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos. Se sintetizan a partir de la condensación de dos moléculas precursoras: malonil-CoA y p-cumaril-CoA, las que formarán los anillos A y B respectivamente. Cabe resaltar que esta ruta biosintética también es compartida por otros compuestos fenólicos. Se ha establecido experimentalmente que el anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA,

mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta del ácido shikímico (51, 52).

Las antocianinas se sintetizan en determinados tejidos y durante determinadas etapas de la vida de la planta. Normalmente son almacenados en compartimentos distintos a los que ellos son sintetizados, por ejemplo, las antocianinas, flavonoles glicosilados y PAs son almacenados en la vacuola (53). Además de la vacuola, los flavonoides se acumulan en otros compartimentos celulares incluyendo el citosol, el RE, cloroplastos, núcleo, vesículas pequeñas y el espacio extracelular (54). Estos compuestos son objeto de investigaciones genéticas y bioquímicas intensas (55) lo que ha llevado a la elucidación de la ruta de síntesis (56), razón por la que se dispone de información acerca de las reacciones involucradas (10, 57) y sobre algunos genes importantes para la ingeniería metabólica (55).

La acumulación visible de estos compuestos usualmente refleja la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (57), las cuales pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados con las membranas, lo que impacta la regulación, eficiencia y especificidad de la vía metabólica (4, 5).

Estudios en diferentes especies, como *arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), maíz (*Zea mays*), petunia (*Petunia hybrida*) (4), tabaco

(*Nicotiana tabaco*) (10) y vid (58), han generado información acerca de la expresión coordinada de enzimas y genes; la canalización entre intermediarios (59), la interacción física de las enzimas y la asociación de éstas con las membranas del retículo endoplasmático (RE) (60). Estos avances significativos y complejos llevaron a proponer la canalización metabólica como modelo para explicar la relación entre las enzimas e intermediarios involucrados en la biosíntesis de flavonoides. Sin embargo, aún falta suficiente evidencia experimental para sostenerla (10), a pesar de que existe certeza acerca de que estas enzimas se organizan espacialmente en el citoplasma celular, asociadas con el RE (59).

El citado modelo se sustenta en la existencia de un canal metabólico entre fenilalanina amonio liasa (*PAL*) y cianamato 4-hidroxilasa (*C4H*) en la ruta general de los fenilpropanoides (60). *PAL* es la encargada de convertir la fenilalanina en 4-cumaroil~CoA, el precursor activo de los flavonoides (4). Existen dos tipos de *PAL*: *PAL1*, localizada en el RE y *PAL2* en el citosol (10), y ambas interactúan de forma diferencial con *C4H*, enzima del grupo *P450*. Al considerar esta relación diferencial y el concepto de canalización, posteriormente, chalcona sintetasa (*CHS*) condensa los precursores activos malonil~CoA y 4-cumaroil~CoA (4) para formar naringenina-chalcona (61). Tanto *PAL* como *CHS* son inducidas por la luz y por el ataque de patógenos (62), y los genes que

las codifican son activados por estímulos externos a nivel de transcripción (56).

La acumulación de chalconas en los tejidos vegetales es rara, puesto que son rápidamente isomerizadas por chalcona isomerasa (*CHI*) a naringenina (63). En flores, la flavonona 3-hidroxilasa (*F3H*), enzima del tipo citocromo P450 hidroxilasas (*P450*) (51), cataliza la hidroxilación del carbono 3 en el anillo C de naringenina, para transformarlo en dihidrokaempferol, y dirige el flujo de carbono a la síntesis de cianidina y pelargonidina, las antocianinas básicas (63) y delphinidina; la otra alternativa es que se derive a la formación de leucoantocianidinas que conducirá a la síntesis de cianidina y peonidina (54).

Esta etapa es clave, puesto que los diferentes patrones de hidroxilación que se distinguen en las antocianinas les dan los colores característicos que van desde rojo hasta púrpura y determinan su capacidad antioxidante (61). Desde este punto a la formación de las antocianinas se involucran reacciones de oxidación y deshidratación, catalizadas por leucoantocianidina oxidasa (*LDOX*) y dihidroflavonol reductasa (*DFR*) (4).

Finalmente, se produce una glucosilación catalizada por UDP-glucosa flavonoide-3-O-glucosil transferasa (*UFGT*), paso que contribuye a la

coloración y a la estabilidad de la molécula ante ataques nucleofílicos o degradación enzimática. Las etapas desde la actividad de *F3H* y subsiguientes hasta la glucosilación por la *UFGT*, estas enzimas son reguladas diferencialmente por la presencia de genes reguladores *PAP1/PAP2;TT8/GL3/EGLE;TTG1*, dependientes de genes del complejo de regulación temporal y espacial conocidos como factores de transcripción *MYB-bHLH-WD* los que interactúan como complejos ternarios en la biosíntesis de antocianina. Así el factor de transcripción *WD* con *TTG1* diferente a bHLH con *TT8, GL3, EGLE* y el factor de transcripción *MYB* con *PAP1* y *PAP2* interactúan activando la síntesis de antocianinas en tejidos vegetales (64, 65). (Figura N° 02).

Posterior a la glucosilación se produce la metilación de los grupos hidroxilo catalizada por metil transferasas (MT). En lo que algunos autores reconocen como parte de la post-biosíntesis, ocurre la acetilación, que es la adición de residuos de ácidos aromáticos o alifáticos en las posiciones glicosiladas, característica de las antocianinas más estables (61) y la copigmentación (48).

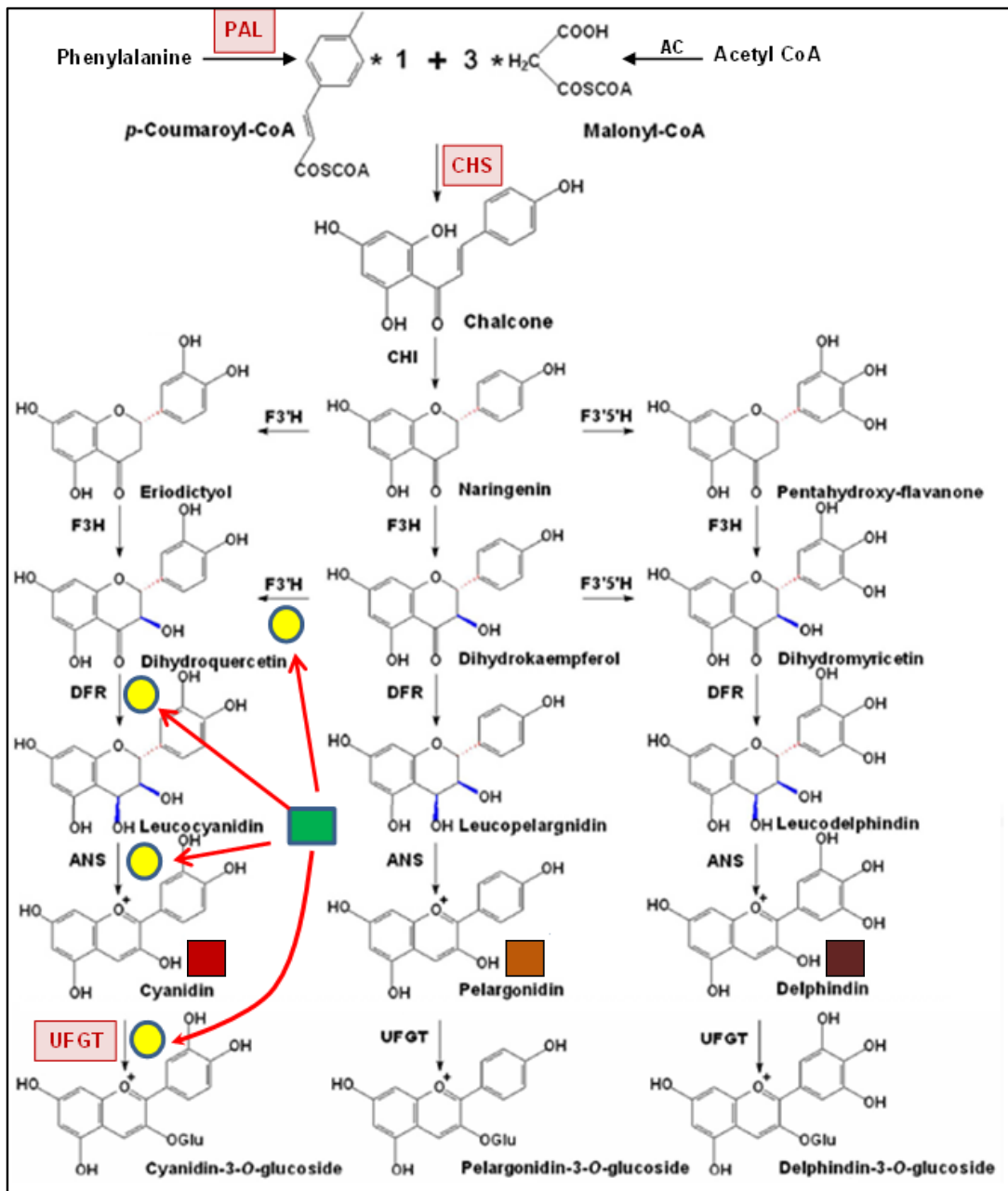




Figura Nº 02. Biosíntesis de antocianinas y su regulación en la síntesis de cianidina-3-glucósido (66). Donde:  Complejo de regulación PAP1/PAP2;TT8/GL3/EGL3;TTG1;  Complejo de regulación temporal y espacial MYB-bHLH-WD (64, 65).

2.3. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE EXPRESIÓN DE GENES

En un estudio realizado en frutos de *M. dubia*, pertenecientes a dos regiones diferentes del estado de Sao Paulo, Brasil; se identificó a la cianidina-3-glucósido como el principal pigmento en frutos de ambas regiones (89,5% en frutos de la región Iguape y 88% en los de la región Mirandópolis), seguido de la delphinidina-3-glucósido, que oscila entre 4,2 y 5,1% respectivamente. Asimismo, el mayor contenido de antocianinas se detectó en la cáscara de frutos maduros, conteniendo la mayor concentración los frutos de Iguape ($54,0 \pm 25,9$ mg/100 g) en comparación con los de Mirandópolis ($30,3 \pm 6,8$ mg/100 g), lo más probable debido a las temperaturas más bajas en la región de Iguape (3).

En *Vitis vinífera* se determinó que la variación del color de los frutos se ajusta a un patrón peculiar de expresión específica del genotipo del conjunto de todos los genes que participan en la biosíntesis de antocianinas en una relación directa del transcripto-metabolito-fenotipo. Los niveles y la abundancia relativa de los ARNm de los genes estructurales en el proceso de maduración, explica por sí el fenotipo final para el contenido de antocianinas, la composición de antocianinas y la intensidad del color (67).

En el estudio del factor bHLH desarrollando RT-PCR LUX utilizando ARN Total marcado con fluoroforo y no marcado, eligieron los primer's con la ayuda del software LUX, el diseño de primer's basados en la web, la amplificación de la

secuencia blanco de (*CHS* y *DFR*) y la secuencias de control endogenol (*APRT*) fueron FAM- y JOE marcado, respectivamente (68).

En el estudio de la expresión de cinco genes que codifican para las enzimas *PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR* y *ANS* las cuales se producen en dos fases: en la floración (temprana) y otra cercana al cambio de color del fruto (tardía); amplificaron mediante RT-PCR cuatro principales genes *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR* y *ANS* relacionados con la biosíntesis de antocianinas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). Del gen *F3'H/R1* y *F3'H/R2* obtuvieron fragmentos de 500 y 600 pb, de brote rojo, en hoja fue un solo fragmento poco visible y en cáliz pequeño fue notable para el gen *F3'5'H/F* y *F3'5'H/R2* obtuvieron un fragmento de 400 pb, en brote rojo el fragmento fue poco visible, en hoja fue notable, en cáliz pequeño obtuvieron fragmentos de 400 pb y 900 pb, en brote floral no obtuvieron banda que indique la presencia de *ANS/F* y *ANS/R2*, el brote rojo dio un fragmento débil de 400 pb, mientras que en la hoja se obtuvieron tres bandas de 400, 500 y 700 pb y en cáliz pequeño obtuvieron una banda notable de 400 pb (11).

Estudios realizados por diferentes investigadores demuestran que la acumulación de antocianinas coincide con el inicio de la síntesis de azúcar en las bayas y se incrementa rápidamente hasta que la concentración de sólidos solubles alcanza 24 °Brix (56). Al mismo tiempo se produce un aumento de la actividad de las enzimas cinamato-4- monooxigenasa, p-cumarato CoA ligasa (4CL). La actividad de *UFGT* se incrementa paralelamente con el contenido de

antocianinas (69), mientras que la actividad de las enzimas *PAL* y *CHI* disminuye al iniciarse la acumulación del pigmento (84). No se evidencia síntesis de antocianinas mientras no se exprese el gen que codifica para *UFGT* (58, 71).

Durante la biosíntesis de antocianinas se expresan dos tipos de genes: los genes estructurales que codifican para las enzimas que participan directamente en síntesis y los genes reguladores que controlan la transcripción de los genes estructurales (57). El patrón de la expresión de genes en la piel de uva parecería estar explicado por la presencia alternativa de genes que se expresan tempranamente y pueden inducir la expresión de todos los genes estructurales con excepción de *UFGT*; y la presencia de genes reguladores, unos que controlan la expresión de *PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* y *LDOX*, y otros que inducen a la expresión de *UFGT*. Los controles a nivel de transcripción tienen un importante papel en la regulación de toda la vía, la cual también es regulada por diferentes condiciones ambientales y de desarrollo (72, 73).

En estudios de la biosíntesis de antocianinas realizados en *Arabidopsis* y *Petunia* (4), se encontró que está controlada por dos tipos de genes reguladores de la transcripción pertenecientes a las familias MYB y MYC; mientras que los genes *VlmybAs* y su homólogo *VvmybA1* aislados de *Vitis labruscana*, son los reguladores putativos de la biosíntesis en uva. Los

VlmybAs conducen a la acumulación de mRNA, y posteriormente a la expresión de *UFGT* y a la pigmentación rojiza-púrpura (74).

La síntesis de las antocianinas se realiza a través de etapas catalizadas secuencialmente por enzimas localizadas en el citosol y el RE (51), pero sólo se almacenan en las vacuolas (61). Para ser transportadas una de las posibilidades es que se unan a una proteína de tipo glutatión-S-transferasa (*GST*), para posteriormente acumularse en las inclusiones vacuolares de antocianinas (*AVI*) (75). Este mecanismo, que aún no está totalmente elucidado, varía entre especies (76, 77, 78), como por ejemplo en perejil (*Petroselinum crispum*) se sugiere que puede existir un transporte dependiente del pH (51).

Estudios realizados en cultivos celulares de camote (*Ipomoea batatas*) indican que la metalproteína VP24 se acumula abundantemente en los glóbulos de pigmentos intravacuolares de las células, lo que sugiere su participación en el transporte de estos pigmentos (77) y en la formación de cianoplastos (79). Otra alternativa es que VP24 esté involucrada en la degradación de los conjugados de glutatión-S en la vacuola (77), debido a su actividad aminopeptidasa (80). También se descubrió que la acetilación es una señal indispensable para el transporte de antocianinas (81), puesto que se demostró que las antocianinas acetiladas son almacenadas de manera más eficiente en las vacuolas.

En petunia la proteína AN9 es necesaria para un eficiente transporte hacia vacuola, porque actuaría como acarreador citoplásmico de antocianinas y flavonoides, en general (76). En el caso de maíz, el gen Bz2 codifica para una *GST* involucrada en el transporte (82). En vid los estudios se centran en elucidar el rol de las *AVI* y de *GST* en el almacenaje y transporte, respectivamente (78).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

Los frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia* se obtuvieron de la Colección de Germoplasma de camu-camu; ubicado en el Campo Experimental “El Dorado”, Estación Experimental San Roque-Loreto del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) que se encuentra a la altura del km 25.5 de la carretera Iquitos-Nauta entre las coordenadas UTM 675945.17 E y 9562709.16 S; a una altitud de 112 msnm (Anexo I, Figura N° 01). Las muestras colectadas fueron llevadas al laboratorio de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA) de la UNAP.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

Está representada por las plantaciones de la colección de germoplasma del INIA que consta de 120 accesiones con un total de 1200 plantas, procedentes de 8 cuencas hidrográficas de la Amazonía, (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas).

3.2.2. Muestra

Se seleccionaron por conveniencia 03 plantas de 03 accesiones diferentes. Esta muestra por conveniencia se debió a que las plantas

tenían que estar en proceso de fructificación y contar con frutos verdes, pintones y maduros (66, 88 y 96 días respectivamente, después de la antesis); asimismo, debían encontrarse en buen estado, sin presencia de hongos o parásitos. Los frutos respectivos se tomaron al azar por muestreo aleatorio simple y fueron procesados por triplicado por cada condición.

3.3. ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

Investigación Correlacional: Porque se determinó si existen vínculos entre las variables de estudio, es decir, si existe correlación entre el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* y la concentración de antocianinas en frutos de *Myrciaria dubia*.

3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

No Experimental – Longitudinal: El estudio se efectuó en diferentes momentos de tiempo, es decir, cuando la planta se encuentre en fructificación, pero en las diferentes etapas o estadios de maduración: verdes, pintones y maduros.

El estudio se realizó con muestras de cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros (66, 88 y 96 días respectivamente, después de la antesis) de *M. dubia* procedentes de tres parcelas de la colección de germoplasma del INIA. De un total de 120 accesiones se tomaron 3 plantas al azar de 3

accesiones diferentes considerando las 3 condiciones de frutos (verdes, pintones y maduros) y por triplicado de cada condición.

3.5. PROCEDIMIENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA) de la UNAP; situado en Psje. Los Paujiles S/N. AAHH. Nuevo San Lorenzo.

3.5.2. Obtención de la Muestra Biológica

La colecta de los frutos en 3 estadios de maduración: verdes, pintones y maduros (66, 88 y 96 días respectivamente, después de la antesis) se realizó entre las 8:00 y las 11:00am. El material colectado fue transportado en contenedores con hielo al Laboratorio de la UEB, para su procesamiento.

3.5.3. Extracción y cuantificación de antocianinas

Se realizó según Page *et al* (83), donde 500 mg de muestra fue triturada con 2 mL de solución de trabajo (solución A [ácido metafosfórico 3% y ácido acético 8%] + solución B [EDTA 0,36%]) en proporción 50:50. La solución contenida en microtubos de 2 mL fue incubada en baño maría (Barnstead Lab Line) a 65°C por 30 minutos y

centrifugada (Microcentrífuga refrigerada Hettich Zentrifugen – Mikro 200) a 21380 g por 15 minutos a 10°C. El sobrenadante obtenido se transfirió en microtubos de 1,5 mL, del cual se empleó 1 mL para la lectura al espectrofotómetro (Genesys UV-visible v.6.0) a 530 y 657 nm. (Figura N° 03 y Anexos III, Tabla N° 01). Para determinar la concentración se empleó la siguiente fórmula:

$$C (mg/L) = \frac{(A_{530} - A_{657})(PM)(1000)}{(\epsilon)}$$

Donde:

PM = peso molecular de la cianidina-3-glucósido = 449,2 g/mol

ϵ = coeficiente de extinción molar de la cianidina-3-glucósido = 24825

3.5.4. Purificación de ARN total

Se utilizó el protocolo modificado de Zeng y Yang (84) (Figura N° 03), con modificaciones complementarias en el empleo de cloruro de Litio (LiCl) hasta la precipitación de ARN total y tratada con ADNasa. El protocolo consistió en los siguientes pasos:

1. En un mortero y con la ayuda de un pilón se trituró 500 mg de muestra con 3 mL del buffer de extracción (Tris-HCl 300 mM pH 8.5, EDTA 25mM, NaCl 2M, CTAB 2%, PVP-40 3%) precalentado a 70°C, además 100 μ L de β -mercaptoetanol, 20 μ L de proteinasa K y 50 μ L de celulasa.

2. La solución fue transferida a microtubos de 2 mL y se incubó en baño maría (Barnstead Lab Line) a 70°C por 15 min agitando por inversión cada 5 minutos. Centrifugamos (Microcentrífuga refrigerada Hettich Zentrifugen, Mikro 200) a 21380 g por 10 min a 4°C.
3. Se transfirió 1mL de sobrenadante a nuevos microtubos y se agregó igual volumen de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), se homogenizó en vórtex (Scientific Industries, SI-T246) y centrifugamos a 21380 g por 10 minutos a 4 °C. (Se repitió este paso una vez más).
4. El sobrenadante se transfirió a microtubos de 1,5 mL, se agregó 0,25 volúmenes de LiCl 10 M, se homogenizó suavemente y se incubó a -20°C por 1 hora.
5. Se centrifugó a 21380 g por 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el precipitado.
6. Se enjuagó el precipitado con 300 µL de LiCl 2 M, se incubó a -20°C por 20 minutos y se centrifugó a 21380 g por 15 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante evitando perder el precipitado.
7. Se lavó el precipitado con 700 µL de etanol 70% y se centrifugó a 18620 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante.
8. Se lavó el precipitado con 300 µL de etanol absoluto y se centrifugó a 9500 g por 5 minutos a 4°C.
9. Se descartó el sobrenadante, dejamos secar el precipitado y se resuspendió con 50 µL de buffer TE. Separamos 3 y 2 µL de muestra

para la lectura en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop® 2000) y la electroforesis respectivamente (para verificar su calidad e integridad y proceder al tratamiento con TURBO DNase®).

10. **Tratamiento con ADNasa:** Se enrazó la muestra a 89 µL con H₂O-DEPC, agregamos 10 µL del buffer 10x TURBO DNase® y 1 µL de TURBO DNase®, se homogenizó suavemente y se incubó a 40°C por 60 minutos.
11. Añadimos 100 µL de H₂O-DEPC, agregamos 200 µL cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), agitamos con vórtex por 30 segundos y centrifugamos a 18620 g por 15 minutos a 4°C.
12. El sobrenadante se colocó en un tubo de 1,5 mL, agregamos 3 veces el volumen de etanol absoluto e incubamos a -20°C por 1 hora.
13. Centrifugamos a 21380 g por 15 minutos a 4°C, descartamos el sobrenadante.
14. Se lavó el precipitado con 700 µL de etanol 70% y centrifugamos a 18620 g por 10 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante.
15. Se lavó el precipitado con 300 µL de etanol absoluto y se centrifugó a 9500 g por 5 minutos a 4°C.
16. Se resuspendió el precipitado en 50 µL de buffer TE. Separamos 3 y 2 µL de muestra para la lectura en el espectrofotómetro (Thermo

Scientific, NanoDrop® 2000) y la electroforesis respectivamente. El resto almacenamos a -80°C para el posterior uso.

3.5.5. Determinación de la Calidad y Cantidad del ARN

La calidad y cantidad del ARN total purificado se determinó según Sthephenson (85) con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop® 2000). El equipo proporciona automáticamente datos de concentración, absorbancias 260 y 280, ratios de calidad A_{260nm}/A_{280nm} y A_{260nm}/A_{230nm} . ((Anexos III, Tabla N° 02).

3.5.6. Evaluación de la Integridad del ARN

Para comprobar la integridad del ARN y ausencia de ADN contaminante, se realizó la corrida electroforética según Sambrook *et al* (86) en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Para la siembra se empleó 50% de la muestra y 50% del buffer de siembra. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,1% y las bandas observadas en un transluminador de luz ultravioleta y fotografiadas con el equipo Bio Doc Analyze (Biometra, F14582JRF). (Anexos II, Figura N° 02).

3.5.7. Diseño de cebadores para PCR en tiempo real

Inicialmente se realizó la recopilación de secuencias homólogas de cadenas polipeptídicas de diferentes especies vegetales

correspondientes a las enzimas fenilalanina amonio liasa (*PAL*), chalcona sintetasa (*CHS*) y UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa (*UFGT*) en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para la búsqueda se empleó un Blast local con secuencias de aminoácidos de las enzimas mencionadas de especies de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Luego se seleccionaron los transcritos con E-value $< 10^{-6}$ e identidades $> 60\%$. Las secuencias de los transcritos que se seleccionaron fueron empleados para el diseño de los cebadores correspondientes, para lo que se consideró las siguientes condiciones. El primer nivel: Temperatura media de fusión (T_m) de 60°C , tamaño del amplicón 50 a 100pb, contenido de GC de 35-55%. Los cebadores obtenidos fueron sometidos al segundo nivel: termodinámicamente estables ($\Delta G > -10$). El tercer nivel: Se realizó empleando el programa IDT (Integrated DNA Technologies), que permitió elegir el par de cebadores cuyos amplicones (productos de PCR) no formaran estructuras secundarias, termodinámicamente estables o estructuras internas que pudieran afectar la eficiencia del PCR a la temperatura de hibridación y extensión de 60°C . (Anexos III, Tabla N° 03).

3.5.8. Transcripción Reversa

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de $2\mu\text{g}$ de ARN total (obtenida de cáscara y pulpa de frutos), se empleó la

transcriptasa reversa MuLV y oligo(dT), siguiendo las instrucciones del Kit GeneAmp®-RNA PCR Core (Applied Biosystems). La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf a 25°C por 10 min, 42°C por 60 min, 99°C por 5 min y 5°C por 5 min (Anexos II, Figura N° 03). El ADNc sintetizado se empleó para amplificar un segmento del gen de fenilalanina amonio liasa (*PAL*), chalcona sintetasa (*CHS*) y UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa (*UFGT*) de la ruta biosintética de antocianinas de *M. dubia* a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.5.9. PCR en tiempo real

Este procedimiento se desarrolló para medir el nivel de expresión de los genes de interés (*PAL*, *CHS* y *UFGT*) y el gen de referencia (*SAND*) presentes en la cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*. Para la reacción se empleó el SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems). En una cabina de flujo laminar (Anexos II, Figura N° 04) se preparó el master mix empleando los siguientes componentes de la reacción: 10x SYBR Green PCR Buffer 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,8 mM, 0,5 mM de cebadores F y R diseñados con anterioridad, Amplitaq Gold 0,025 U/mL, AmpErase UNG 0,01 U/mL, 2 µL de ADNc (diluido 1: 5) y agua csp 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura inicial de denaturación de 95°C por 2 min, 45 ciclos con temperaturas de 95°C por 20 seg, 52°C por 20

seg, 68°C por 30 seg y temperaturas finales de extensión de 68°C por 3 min y 65°C por 5 seg, complementado con una temperatura de denaturación final de 85°C por 50 seg; y una temperatura de almacenamiento de 4°C por tiempo indefinido (Anexos II, Figura N° 05). Las fluorescencias de amplificación se muestran en Anexos II, Figura N° 06. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio al 0,1% según Sambrook *et al.* (86). Los geles fueron fotografiados con el equipo Bio Doc Analyze (Biometra, F14582JRF). (Anexos II, Figura N° 07).

3.6. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los datos de concentración de antocianinas y de cuantificación de ARN total fueron almacenados en una base de datos del programa Microsoft Excel 2010. La eficiencia de los cebadores de PCR en tiempo real y el CT de las amplificaciones se determinó con el programa LinRegPCR (87), para tal efecto se realizaron diluciones seriadas del ADNc a 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16; realizándose el PCR en tiempo real (qPCR) por duplicado para cada dilución. La expresión relativa de los genes (expresión normalizada, NE) en cada tipo de muestra analizada (cáscara y pulpa) se estimó de acuerdo a Simon (88), con la siguiente ecuación:

$$NE = \frac{(E_{referencia})^{Ct_{referencia}}}{(E_{blanco})^{Ct_{blanco}}}$$

Donde:

NE: expresión normalizada

Ereferencia: eficiencia del PCR para el gen de referencia.

Eblanco: eficiencia del PCR para el gen blanco, de interés.

Ct: ciclo en el que la fluorescencia supera a la fluorescencia basal.

Los análisis estadísticos (promedios, error estándar de la media, ANOVA y la prueba de validación HSD de Tukey y correlación de Pearson) se realizó empleando el programa IBM SPSS Statistics v.21 y los gráficos fueron diseñados en Microsoft Excel 2010.

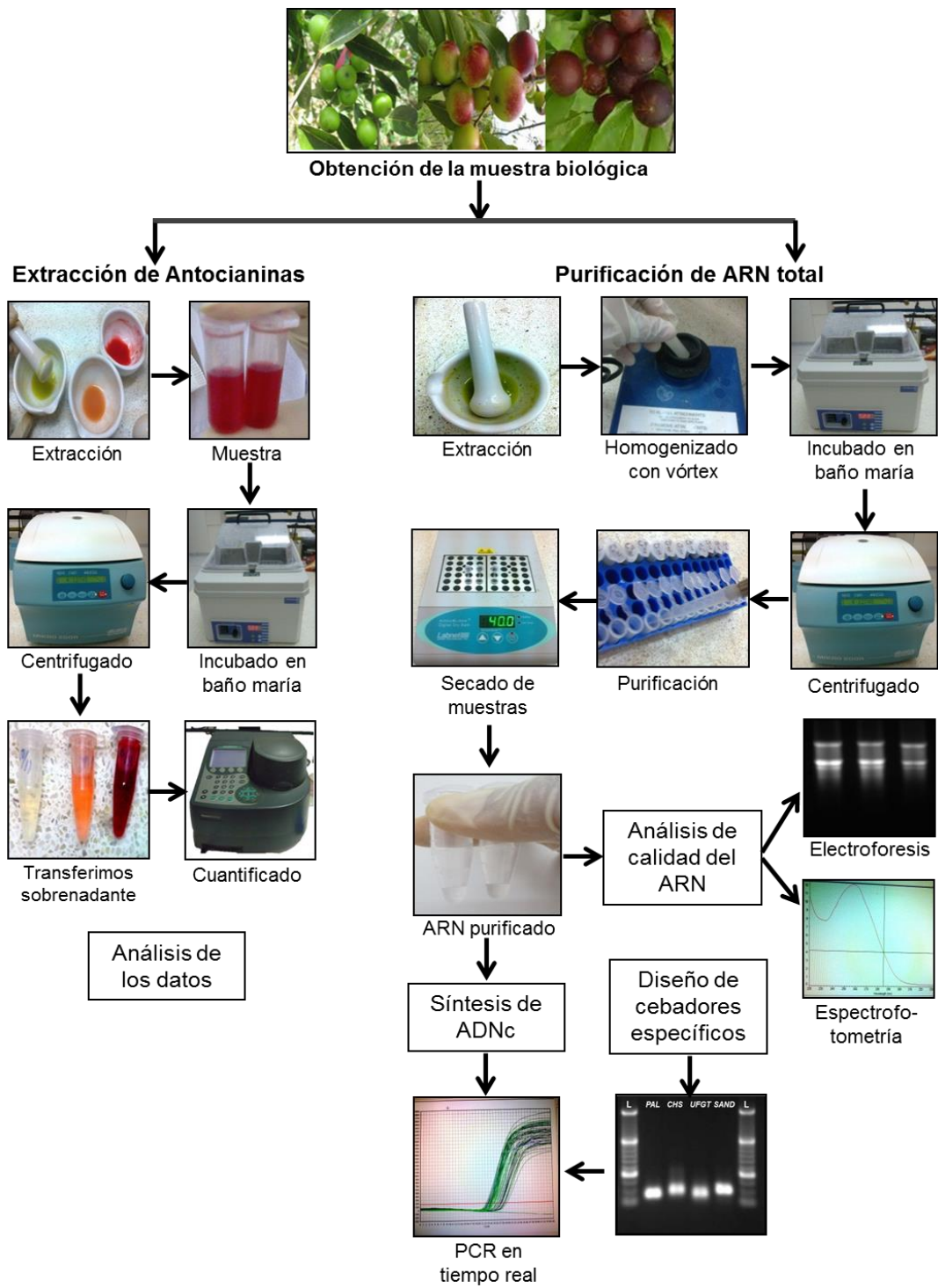


Figura Nº 03. Flujoograma metodológico.

IV. RESULTADOS

4.1. Concentración de Antocianinas

La mayor concentración de antocianinas se obtuvo de las muestras de cáscara de la condición madura (CM), la que presenta una concentración promedio de 759,98 mg/L; lo que representa 19 veces mayor que la cáscara condición verde (CV) que tiene una concentración de 40,11 mg/L siendo 1,5 veces mayor que la cáscara condición pintón (CP) que tiene una concentración de 478,91 mg/L. Mientras que los valores obtenidos de las muestras de pulpa fueron inferiores a la de la cáscara con una concentración promedio de 63,63 mg/L para la pulpa condición madura (PM), es decir 9 veces mayor que la pulpa condición verde (PV) que tiene 6,94 mg/L y 3,7 veces mayor que la pulpa condición pintón (PP) que tiene una concentración de 16,59 mg/L (Figura N° 04 y Anexos III, Tabla N° 04).

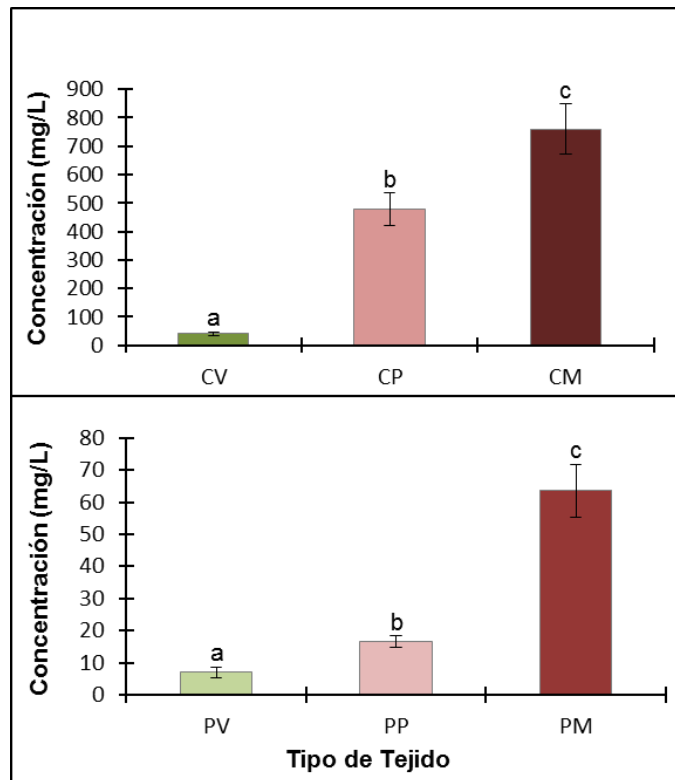


Figura N° 04. Contenido de antocianinas en diferentes estadios de maduración de frutos de *M. dubia*. Arriba se observa el contenido en cáscara; donde CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro. Abajo se observa el contenido en pulpa; donde PV= pulpa de fruto verde, PP = pulpa de fruto pintón, PM = pulpa de fruto maduro. Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3). Letras diferentes por encima de las barras muestran diferencias significativas entre las condiciones de maduración del fruto ($p < 0,05$).

4.2. Expresión relativa de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT*

El desarrollo del PCR en tiempo real (qPCR) proporcionó valores de CT promedio para cada gen, que varía entre 20,36 a 25,76 para el gen *PAL*, mientras que entre 19,70 a 23,49 para el gen *CHS* y valores entre 24,34 a 29,75 para el gen *UFGT*. A partir de los cuales se calculó las expresiones relativas de los genes en estudio, siendo la cáscara madura (CM) la condición que presenta mayor nivel de expresión de los genes en estudio sobre las otras condiciones, así para el gen *PAL*, la cáscara condición madura (CM) presentó una expresión relativa de 70 veces más copias de ARNm que la cáscara condición verde (CV) y 6 veces más copias de ARNm que la cáscara condición pintón (CP). Así también para el gen *CHS*, la cáscara condición madura (CM) presentó una expresión relativa de 12 veces más copias de ARNm que la cáscara condición verde (CV) y 3 veces más copias de ARNm que la cáscara condición pintón (CP). Mientras que el gen *UFGT* en la cáscara condición madura (CM) presentó una expresión relativa de 27 veces más copias de ARNm que la cáscara condición verde (CV) y 3 veces más copias de ARNm que la cáscara condición pintón (CP). El ANOVA (Anexos III, Tabla N° 05) proporcionó diferencias estadísticamente significativas con ($F= 19,446; 18,407; 11,227$, $gl = 2$ y $p = 0,002; 0,003; 0,009$), y la prueba de HSD de Tukey (Anexos III, Tabla N° 06), mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) del nivel de expresión relativa para los genes *PAL*; *CHS* y *UFGT* respectivamente en todas las condiciones de las muestras empleadas (Figura N° 05).

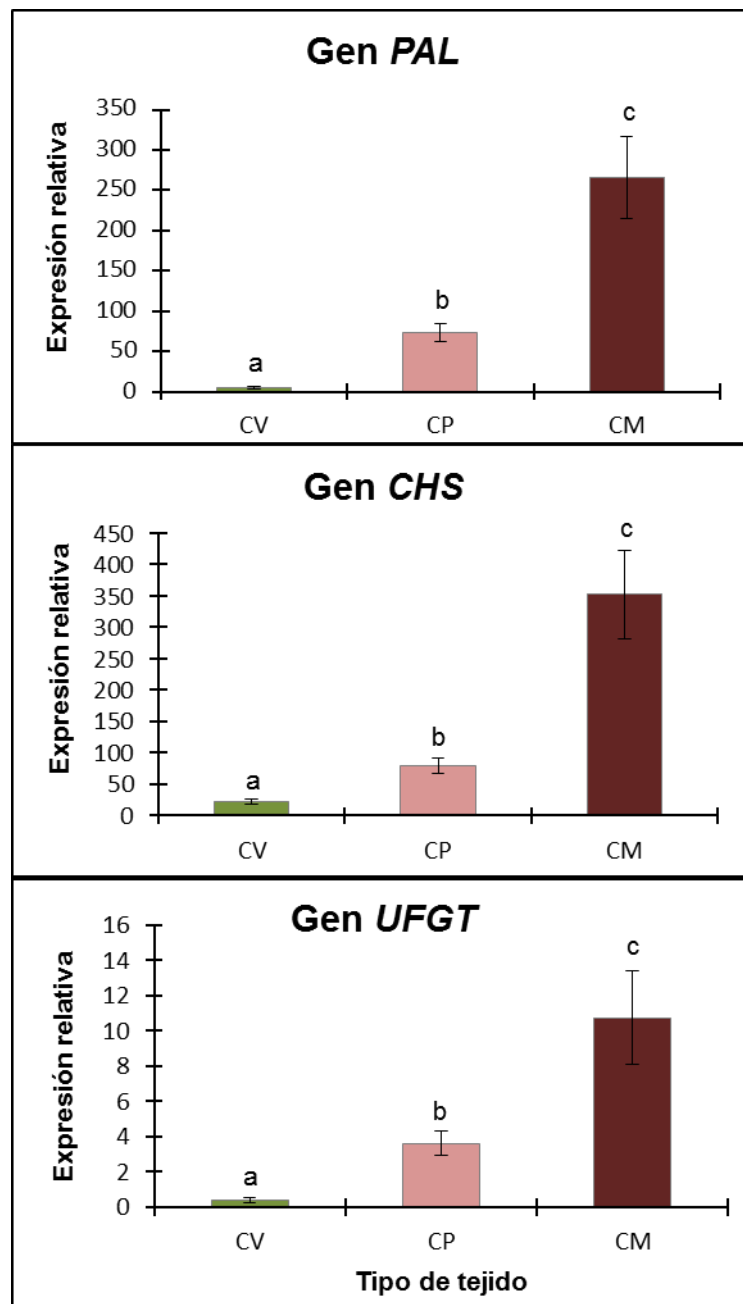


Figura Nº 05. Expresión relativa de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en cáscara de frutos de *M. dubia*. Donde CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro. Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3). Letras diferentes por encima de las barras muestran diferencias significativas entre las condiciones de maduración del fruto ($p < 0,05$).

De manera similar la pulpa condición madura (PM) presentó mayor nivel de expresión sobre las demás condiciones, así para el gen *PAL* la pulpa condición madura (PM) presentó una expresión relativa de 73 veces más copias de ARNm que la pulpa condición verde (PV) y 7 veces más copias de ARNm que la pulpa condición pintón (PP). Así también para el gen *CHS* la pulpa condición madura (PM) presentó una expresión relativa de 6 veces más copias de ARNm que la pulpa condición verde (PV) y 5 veces más copias de ARNm que la pulpa condición pintón (PP). Mientras que el gen *UFGT* en la pulpa condición madura (PM) presentó una expresión relativa de 1,7 veces más copias de ARNm que la pulpa condición verde (PV) y 1,3 veces más copias de ARNm que la pulpa condición pintón (PP). El ANOVA (Anexos III, Tabla N° 07) proporcionó diferencias estadísticamente significativas con ($F = 13,514; 13,037; 16,788$, $gl = 2$ y $p = 0,006; 0,007; 0,003$), y la prueba de HSD de Tukey (Anexos III, Tabla N° 08), mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) del nivel de expresión relativa para los genes *PAL*; *CHS* y *UFGT* respectivamente en todas las condiciones de las muestras empleadas (Figura N° 06).

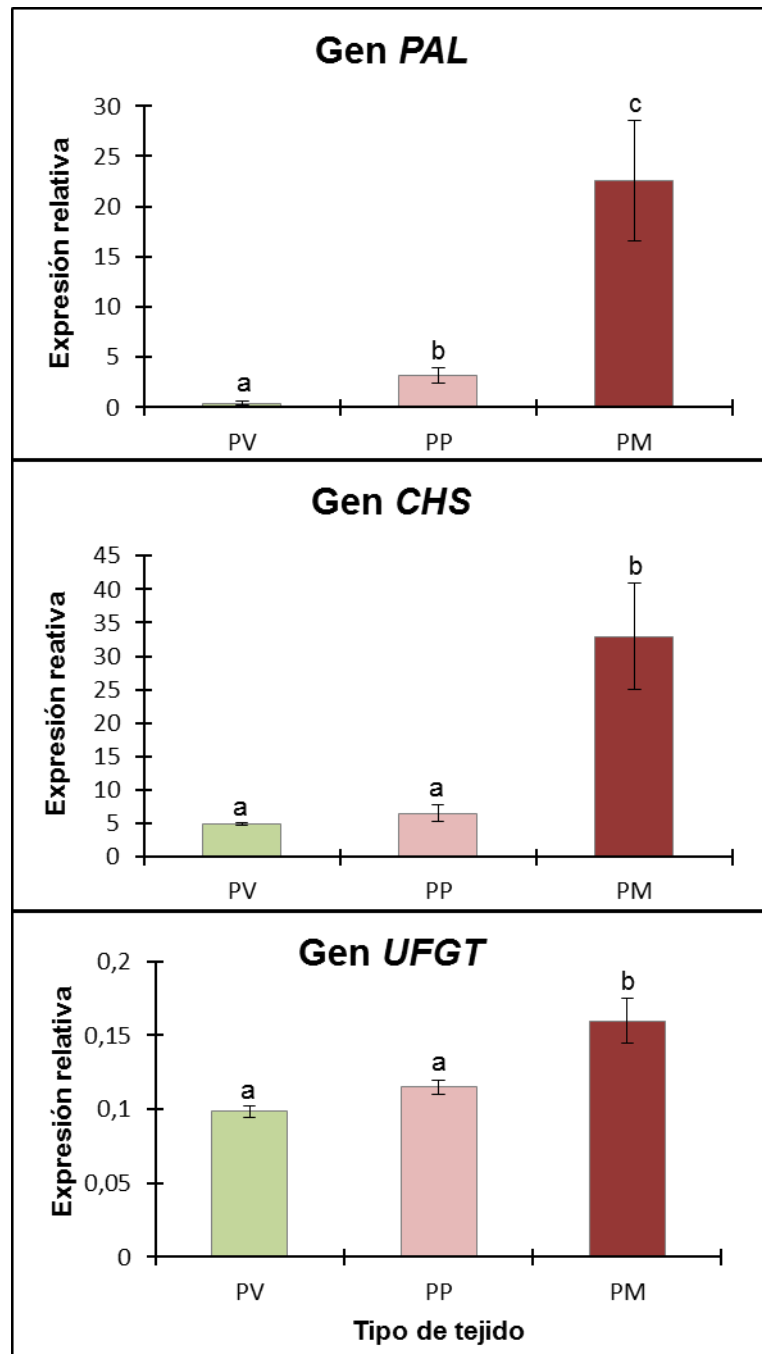


Figura Nº 06. Expresión relativa de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en pulpa de frutos de *M. dubia*. Donde PV = pulpa de fruto verde, PP = pulpa de fruto pintón, PM = pulpa de fruto maduro. Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3). Letras diferentes por encima de las barras muestran diferencias significativas entre las condiciones de maduración del fruto ($p < 0,05$).

4.3. Correlación del nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* con el contenido de antocianinas

Respecto al análisis de correlación entre la expresión de los genes en estudio y la concentración de antocianinas en la cáscara de frutos de *M dubia*, se tiene una correlación significativa entre la concentración de antocianinas y la expresión relativa de los genes en estudio con ($r = 0,896$; $0,901$; $0,918$ y $p < 0,001$) respectivamente, para los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* (Figura N° 07 y Anexos III, Tabla N° 09).

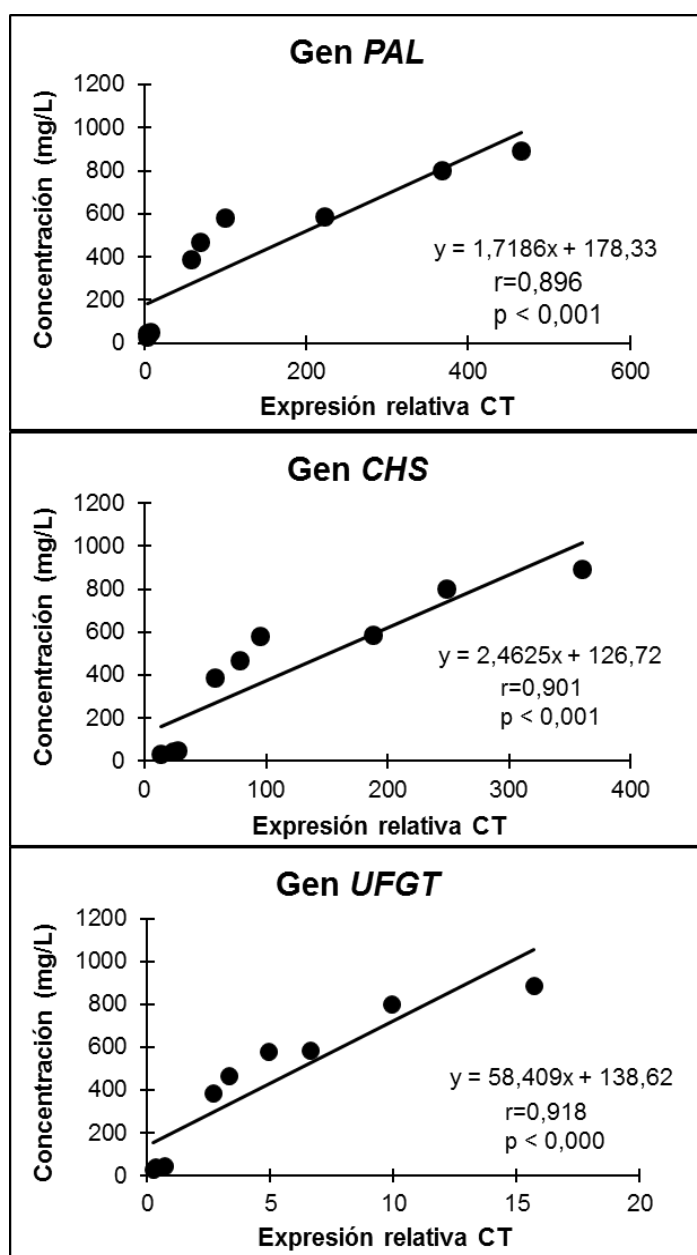


Figura N° 07. Correlación entre el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* con la concentración de antocianinas en cáscara de frutos en los diferentes estadios de maduración de frutos de *M. dubia*.

En el análisis de correlación entre la expresión de los genes en estudio y la concentración de antocianinas en la pulpa de los frutos de *M. dubia* se tiene una correlación significativa entre la concentración de antocianinas y la expresión relativa de los genes en estudio con ($r = 0,977; 0,977; 0,984$ y $p < 0,001$) respectivamente para los genes *PAL*; *CHS* y *UFGT*. Notándose una mayor correlación con el gen *UFGT* para ambos grupos de muestras, cáscara y pulpa (Figura N° 08 y Anexos III, Tabla N° 10).

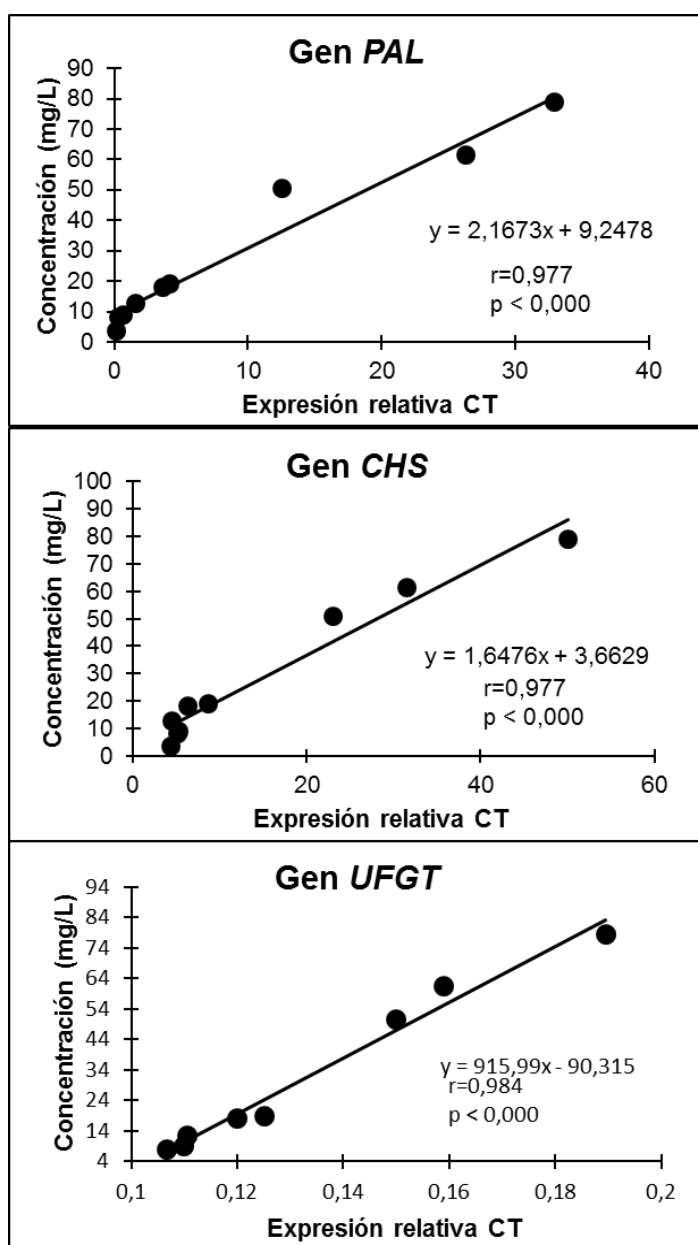


Figura Nº 08. Correlación entre el nivel de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* con la concentración de antocianinas en pulpa de frutos en los diferentes estadios de maduración de frutos de *M. dubia*.

V. DISCUSIÓN

Myrciaria dubia “camu-camu” produce diversas sustancias bioactivas (1), en la cáscara de frutos maduros y pintones se acumulan las antocianinas (3). La producción de antocianinas como cianidina-3-glucósido se realiza en la vía de la síntesis de flavonoides (9). Las enzimas implicadas son: fenilalanina amonio liasa (*PAL*), 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*) (7). *UFGT* convierte la cianidina en cianidina-3-glucósido (8), la principal antocianina del camu-camu es la cianidina-3-glucósido, que representa el 90% de las antocianinas totales (3, 35), la síntesis puede estar afectada por factores ambientales o factores genéticos moleculares y para evaluar este acontecimiento es necesario analizar la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de antocianinas.

En este trabajo encontramos mayor concentración de antocianinas en la cáscara de frutos maduros (CM) y representa 19 veces más que la concentración en la cáscara de los frutos verdes (CV). Estos resultados concuerdan con Castro *et al.* (1), quienes reportan bajo contenido de antocianinas en la cáscara de frutos verdes (0,85 a 2,42 mg/100 g cáscara), mientras que en frutos maduros el contenido de antocianinas fue de 6 a >140 veces mayor. Así también en estudios realizados en frutos de *M. dubia*, pertenecientes a dos regiones diferentes del estado de Sao Paulo, Brasil; se identificó a la cianidina-3-glucósido como el principal pigmento en frutos de ambas regiones

(89,5% en frutos de la región Iguape y 88% en los de la región Mirandópolis). Asimismo, en este mismo estudio determinaron que el mayor contenido de antocianinas se detectó en la cáscara de frutos maduros, conteniendo la mayor concentración los frutos de Iguape ($54,0 \pm 25,9$ mg/100 g) en comparación con los de Mirandópolis ($30,3 \pm 6,8$ mg/100 g) (3). Resultados coincidentes con los encontrados en este trabajo, donde la mayor concentración de antocianinas se encontró en la cascara de fruto maduro con 759,98 mg/L.

Respecto a los niveles de expresión de los tres genes estudiados (*PAL*, *CHS* y *UFGT*), se observa que sus niveles se incrementan de manera paralela con el contenido de antocianinas. Similares resultados fueron reportados para *Vitis vinifera* (69), pero este comportamiento solo fue visto para el gen *UFGT*, sin embargo, los niveles de expresión de los genes *PAL* y *CHI* disminuyen al iniciarse la acumulación del pigmento (70). En consecuencia, hemos observado que existe una correlación significativa entre la concentración de antocianinas y la expresión de los genes en estudio. Resultados que coinciden con el estudio en *V. vinifera*, donde determinan una fuerte correlación entre los niveles de expresión transcripcional y el aumento de la síntesis de antocianinas, como consecuencia de la aplicación de ácido jasmónico y luz a cultivos celulares (89).

Estos cambios en los niveles de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de antocianinas se atribuyen probablemente a la regulación de la expresión del gen *DFR*. El gen *DFR* es regulado por al menos tres mecanismos: uno relacionado con la luz, otro es dependiente del desarrollo del fruto y finalmente por la concentración de

azúcar en el tejido (72). Asimismo, estas inducciones en la expresión genética se atribuyen al etileno y al ácido jasmónico. Estas fitohormonas, están involucradas en el proceso de maduración de los frutos e inducción de la expresión de los genes y por ende en la actividad de las enzimas de las rutas biosintéticas de antocianinas (90). Así, la maduración incluye incremento respiratorio, lo que sugiere un incremento del nivel de oxígeno (condición aeróbica) en el interior de los frutos por lo que ocurre inducción de las enzimas ácido aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC-sintasa) y ácido aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACC-oxidasa) que finalmente permiten la biosíntesis del etileno (91).

VI. CONCLUSIONES

- La concentración de antocianinas se incrementa conforme al estado de madurez del fruto, siendo mayor la concentración en la cáscara que en la pulpa de los frutos de *M. dubia*.
- Los niveles de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* se incrementa tanto en la cáscara como en la pulpa en función al estado de maduración de los frutos de *M. dubia*.
- Existe una correlación positiva y significativa de los niveles de expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* con la concentración de antocianinas durante el proceso de maduración de los frutos de *M. dubia*.

VII. RECOMENDACIONES

- Desarrollar estudios similares de expresión de genes de las enzimas de la vía biosintética de antocianinas no incluidas en este estudio y realizar experimentos con mayor número de factores versus expresión de los genes implicados en este proceso con la finalidad de tener la información más completa en *M. dubia*. De tal manera que se cuente con una información completa de datos como soporte científico, empleando mayor número de muestras.
- Aplicar análisis multivariado para un mejor entendimiento de todo el proceso de síntesis de antocianinas.
- Desarrollar estudios de los genes de regulación para los genes estructurales de la biosíntesis de antocianinas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro JC, Gutiérrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Cobos M, *et al.* Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* “camu-camu”. Rev. Soc. Quím. Perú. 2013;79(4):136-41
2. Peters Ch, Vásquez A. Estudios Ecológicos de camu-camu *Myrciaria dubia*. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. En: Acta Amazónica, 16-17 (Número único). Brasil. 1986;161-174.
3. Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. J Agric Food Chem. 2005;53(24):9531-9535.
4. Winkley-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiol. 2001;126:485-493.
5. Jeong ST, Goto N, Kobayashi S, Esaka M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. Plant Sci. 2004;167:247-252.
6. Petrusa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A. Plants Flavonoids-Biosynthesis, Transport and Involvement in stress Responses Int. J. Mol. Sci. 2013;14950-14973.
7. Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*UFGT*) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. Plant Sci. 2001;160:543–550.

8. Talias A, Lin-Wang K, Stevenson D, Cooney J, Hellens R, Allan A. *et al.* Apple Skin patterning is associated with diferencial expresion of MYB10, BMC Plant Biology. 2011;11:93.
9. Del Valle G, González A, Báez R. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. Rev. Fitotec. Mex. 2005;28(4): 359-368.
10. Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? Transley review. New Phytol. 2005;165:9-28.
11. López G, Gómez J, Aguilar J, Rúelas P, Valdivia R. Aislamiento de los genes de la ruta biosintética de antocianinas en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). Revista Fuente. 2011, Año 3 No. 8 Julio-Septiembre.
12. Cuevas E, Antezana A, Winterhalter P. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. Memorias. Red-alfa lagrotech. 2008, Comunidad europea. Cartagena.
13. Falcone M, Rius S, Casati P. Flavonoids Biosyntheis, biological Funtions, and biotechnological applications, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina. 2012. September.
14. Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell. 2004;16:3098-3109.
15. Robinson SP, Davies C. Molecular biology of grape berry ripening. Australian Journal of Grape and Wine Research. 2000;6:175-188.

16. APG IV, P. An update of the Angiosperm Phylogeny Groups classification for the orders and families of flowering plants. The Linnean Society of London. Botanical Journal of the Linnean Society. 2016;141.
17. Pinedo PM, Inga SH, Pinedo FS, Linares BC. Variación del contenido de vitamina “C” de camu-camu silvestre en Loreto, Perú. Programa de Ecosistemas Terrestres (PET). Instituto de Investigaciones de la Amazonia peruana (IIAP) - Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Artículo Científico. 2002,6 pp.
18. Chávez W. Camu-camu. En: Clay, c.w.; Clement, C.R. (ed.). Selected especies and strategies to enhance income generation from Amazonian forest FO: Misc.93/6. Working Paper. 1993. Rome: FAO. pp. 39-146.
19. López A. Dinámica poblacional y caracterización biofísica de camu-camu árbol (*Myrciaria spp.*) en Ucayali. IIAP-PET. 2003.
20. Correa S, Aldana M. Tecnología para la producción de camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. 1ra ed. 2007;7-44. Lima, Perú.
21. Villachica LH. El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia*) Mc Vaugh en la Amazonía Peruana. TCA – Secretaria Pro Tempore Lima. 1996;46-95.
22. Pinedo PM. *et al.* Sistema de producción de camu-camu en restinga. IIAP/PET. Iquitos – Perú. 2001, 141pp.
23. Rodriguez RB, De Menezes HC, Cabral MC, Dornier M, Reynes M. An amazonian fruti with high potencial as a source of vitamin c: the camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruits, 2001, 56 (5):345-354.

24. Imán SA. Cultivo de Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) en la Región Loreto. Manual N° 01-00. PRONARGEB. INIA. Iquitos - Perú. 2000a, 32p.
25. Vásquez MA. El camu-camu. Cultivo, Manejo e Investigaciones. Iquitos (Perú): Editora Gráfica e Imprenta Universal S.R.L 2000, 218pp.
26. Imán SA. Caracterización y evaluación morfoagronómica del germoplasma de “camu-camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. 2000b.
27. Zapata SM, Dufour JP. Camu-camu *Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh – chemical composition of fruit. J. Sci. Food Agric. 1993;61:349-351.
28. Justi KC, Visentainer JV, Evelázio de Souza N, Matsushita M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. Arch Latinoam Nutr. 2000;50(4):405-408.
29. Alves RE, Filgueiras HAC, Moura CF, Araujo NC, Almeida A. Camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): a Rich Natural Source of Vitamin C. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. Vol. 2002;46:11-13.
30. Zanatta C, Mercadante AZ. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) Food Chemistry. 2007;101:1543-1549.
31. Sotero V, Silva L, García D, Imán S. Evaluación de la actividad antioxidante de pulpa, cáscara y semilla del fruto de camu-camu. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2009;75(3).
32. Allerslev RK. Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible MYRTACEAE fruits tesis. The City University of New York. 2007.

33. Quijano C, Pino J. Constituyentes volátiles de las hojas de camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh. Rev. Cub. Quím. 2007;(19)1.
34. Quijano C, Pino J. Analysis of Volatile Compounds of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh) Fruit Isolated by Diferent Methods. J. of Essential Oil Research. 2007;(19)6.
35. Villanueva JE, Condezo LA, Ramirez E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas. 2010;30(1):151-160.
36. Inoue T, Komoda H, Uchida T, Node K. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. J Cardiol. 2008;52(2):127-132.
37. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. J Agric Food Chem. 1998;46(2):361-367.
38. Da Silva FC, Arruda A, Ledel A, Dauth C, Romão NF, Viana RN, et al. Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. Food Chem Toxicol. 2012;50(7):2275-81.
39. Nascimento OV, Boleti APA, Yuyama LKO, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. An Acad Bras Ciências. 2013;85(1):355-363.

40. Imán SA, Melchor AM. Tecnología para la producción del camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh en la Región Loreto. Serie Manual N° 1–07. 2007. Lima-Perú. 51p.
41. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Biología molecular del gen. 5a edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España 2008;776 pag.
42. Strack D, Wray V. The Anthocyanins. In: HARBONE JB, editor. The Flavonoides. Advances in Research Since 1994. Boca Raton FL: CRC Press.
43. Kong JM, Chiam LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard C. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003;64:923-933.
44. Zhang W, Franco C, Curtin C, Conn S. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004;5:264-271.
45. Beckwith A G, Y Zhang, N P Seeram, A C Cameron, M G Nair. Relationship of light quantity and anthocyanin production in *Pennisetum setaceum* cvs. Rubrum and Red Riding Hood. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:456-461.
46. Durst R, Wrolstad RE. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2001,33-45.
47. Steyn WJ, Holcroft DM, Wand SJE, Cooks NC, Jacobs G. Dating Rosemarie: How to make her blush? *Proceedings of the Cape Pomological Association Symposium*. South Africa. 2000;55-62.

48. Markoviæ D, Nadezjda J, Petranoviæ A, Baranaæ J. The copigmentation effect of sinapic acid on malvidin: a spectroscopic investigation on colour enhancement. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005;78:223-228.
49. Wrolstad RE. Anthocyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. *Natural Food Colorants*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc. 2000;237-252.
50. Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zeballos L. Stability of Anthocyanin based Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chem.* 2004;86:69-77.
51. Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K. Recent advances in the Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins. *Nat Pro Rep.* 2003 20:288-303.
52. Delgado F, Jiménez Ar, Paredes O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40(3):173-289.
53. Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:405-430.
54. Braidot E, Zancani M, Petrusa E, Peresson C, *et al.* Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior* 2008;3:626-632.
55. Taylor CB. Factories of the future? Metabolic engineering in plant cells. *The Plant Cell* 1998;10:641-644.

56. Boss PK, Davies C, Robinson SP. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 1996;111:1059-1066.
57. Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* 2002;130:729–739.
58. Downey M, Harvey JS, Robinson SP. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 2003;9:110-121.
59. Winkel BSJ. Metabolic channeling in plants. *Annual Review Plant Biology* 2004;55:85-107.
60. Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell.* 2004;16:3098-3109.
61. Zhang W, Curtin C, Franco C. Towards manipulation of postbiosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2002a;30:688-696.
62. Clive L, Nicholson R. Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls. *Plant Physiol.* 1998;116:979-989.
63. Holton T, Cornish E. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 1995;7,1071-1083.

64. Baudry A, Heim M, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L. TT2, TT8 and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2004;39:366-380.
65. Feller A, Machemer K, Braun E, Grotewold E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 2011;66:94-116.
66. He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, *et al.* Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules.* 2010;15:9057-9091
67. Castellarin SD, Di Gasparo G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.* 2007;7:46.
68. Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Thomas C, Lloyd A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1- dependent pathways of Arabidopsis. *Molecular Cell and Developmental Biology, and The Institute for Cellular and Molecular Biology, The University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA.* 2003.
69. Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol.Vitic.* 2002;53:171-182.
70. Roubelakis-Angelakis KA, Kliewer WM. Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenols in grape berries. *Am. J. Enol.Vitic.* 1986;37:275-280.

71. Keller M, G Hrazdina. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 1998;49:341-348.
72. Gollop R, S Even, V Colova Tsoleva, A Perl. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.* 2002;373:1397-1409.
73. Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* 2005;105:319-330.
74. Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C. Myb related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 2002;215:924-933.
75. Conn S, W Zhang, C Franco. Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture. *Biotech. Lett.* 2003;25:835–839.
76. Mueller AL, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 2000;113:1561-1570.
77. Xu W, Hidenari S, Mineo K, Masayuki N. Primary structure and expression of a 24-kD Vacuolar. *Plant Physiol.* 2001;125:447-455.

78. Zhang W, Franco C, Curtin C, Conn S. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004;5:264–271.
79. Nozue M, Yamada K, Nakamura T, Kubo H, Kondo M, Nishimura M. Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol.* 1997;115:1065–1072.
80. Nozue M, Baba S, Kitamura Y, Xu W, *et al.* VP24 found in anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) of sweet potato cells is a member of a metalloprotease family. *Biochem. Eng. J.* 2003;14:199-205.
81. Marrs K, Alfenito M, Lloyd A, Walbot V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 1995;375:397-400.
82. Grotewold E. The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products. *Planta.* 2004;219:906-909.
83. Page M, Sultana N, Paszkiewicz K, Florance H, Smirnoff N. The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant Cell Environ.* 2012;35(2):388-404.
84. Zeng Y; Yang T. RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 2002;20, 417–417.
85. Stephenson F. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology.* United States of America: Academic Press; 2013.

86. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Scott KD and Playford J. 1996. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. *Biotechniques* 1989;20, 974-979.
87. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):e45-e45.
88. Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics.* 2003;19(11):1439-40.
89. Zhang W, Curtin M, Kikuchi C, Franco C. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci.* 2002b;162:459-468.
90. Jordán M, Casaretto J. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 2006;16.
91. Yang SF. The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. En: Thomson WW, EA Nothnagel & RC Huffaker (eds) *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*: 156-166. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, U.S.A. 1987.
92. Castro JC, Cobos M, Ramírez R, Imán S. Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) "camu-camu" apropiado para análisis moleculares. *Ciencia amazónica.* 2012;2(1): 7-15.

IX. ANEXOS

Anexo I: Del Área de Colecta del Material Biológico

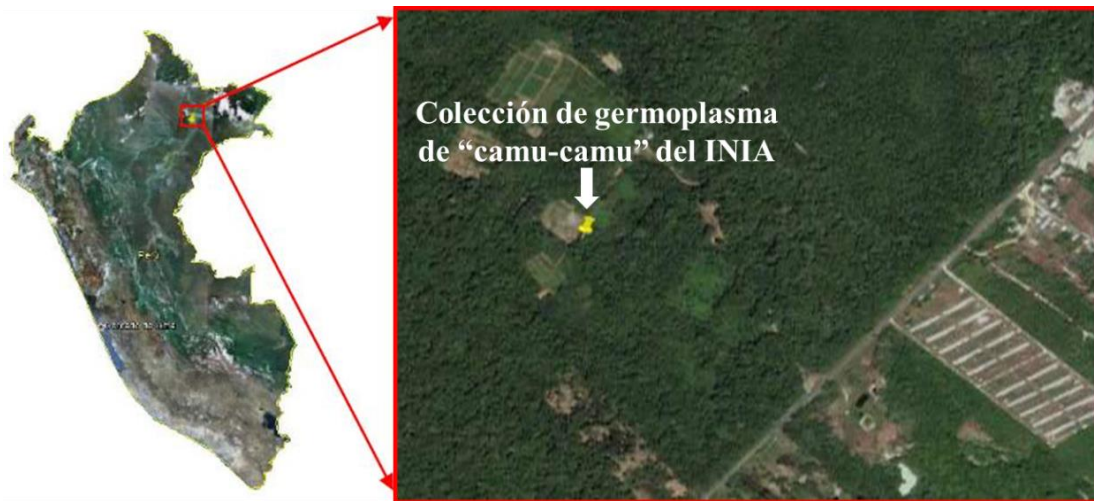


Figura Nº 01. Ubicación de la colección de Germoplasma de *Myrciaria dubia* del INIA. Imagen tomada del Artículo: Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) "camu-camu" apropiado para análisis moleculares (92).

Anexos II: De la Metodología empleada

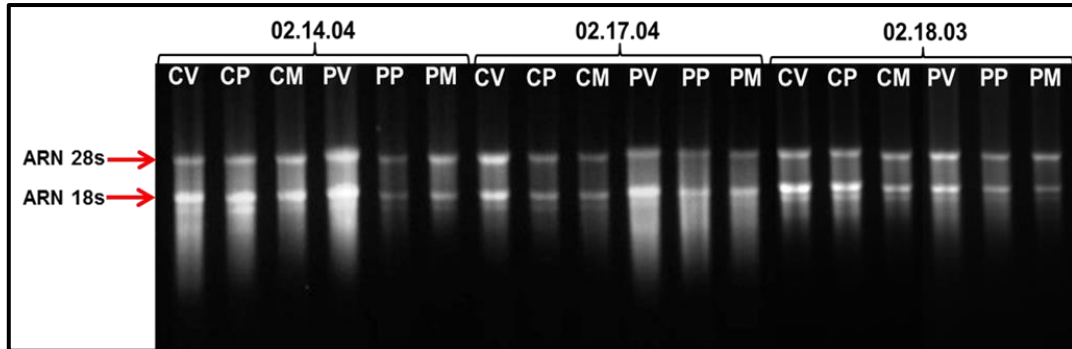


Figura N° 02. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de ARN total de frutos (cáscara y pulpa) en diferentes estadios de maduración, de 3 accesiones.

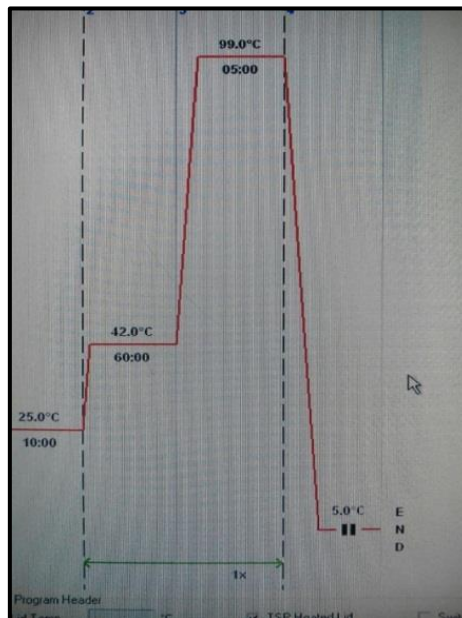


Figura N° 03: Condiciones del RT-PCR.



Figura N° 04: Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real (qPCR).

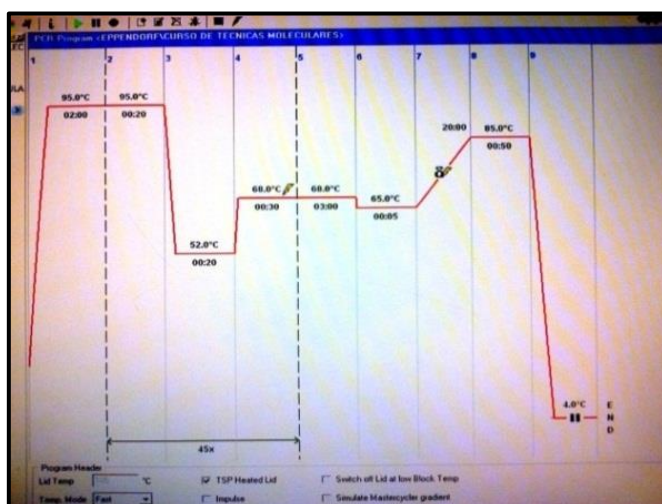


Figura N° 05: Condiciones del PCR en tiempo real (qPCR).

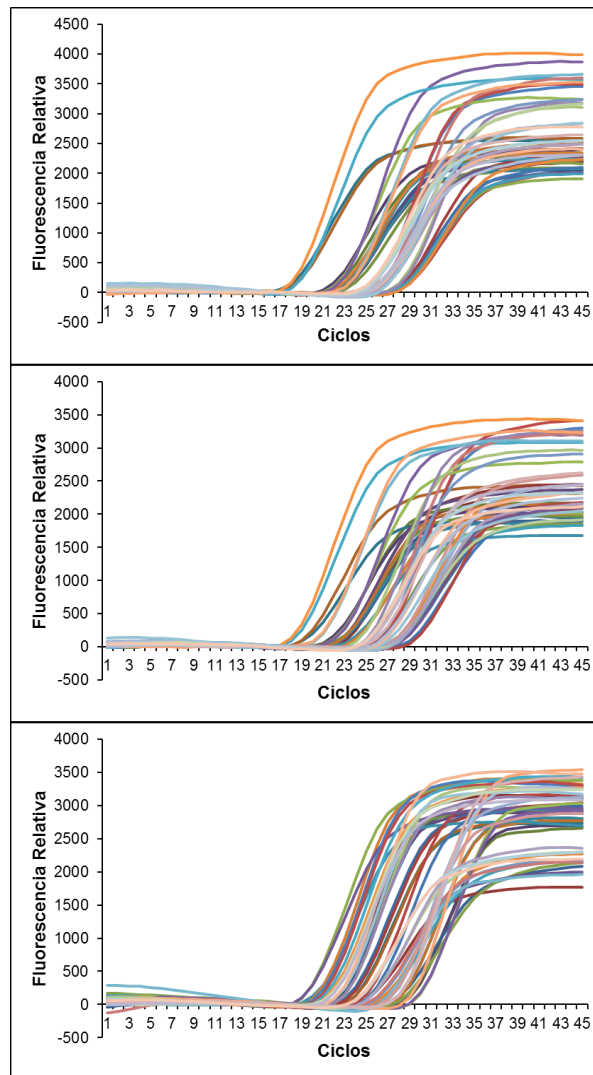


Figura N° 06. Perfil de fluorescencia relativa de la amplificación del PCR en tiempo real (qPCR) de los genes de estudio *PAL*, *CHS* y *UFGT*; y del gen de referencia *SAND*, de muestras de cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

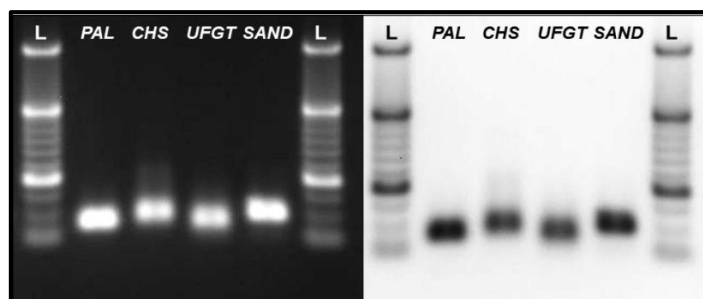


Figura N° 07. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones de los genes estudiados (*PAL* 72pb, *CHS* 85pb y *UFGT* 70pb) y del gen de referencia (*SAND* 88pb).

Anexos III: Tablas de concentración de Antocianinas y de ARN; y de datos estadísticos

Tabla N° 01. Valores de absorbancias y concentración de antocianinas

Accesión	Muestra	A 530	A 657	Concentración mg/L
02.14.04	CV	0,099	0,067	28,95
02.17.04	CV	0,196	0,149	42,52
02.18.03	CV	0,226	0,172	48,86
02.14.04	CP	0,552	0,124	387,23
02.17.04	CP	0,641	0,125	466,84
02.18.03	CP	0,755	0,111	582,65
02.14.04	CM	0,869	0,219	588,08
02.17.04	CM	1,042	0,156	801,59
02.18.03	CM	1,167	0,183	890,26
02.14.04	PV	0,066	0,062	3,62
02.17.04	PV	0,067	0,058	8,14
02.18.03	PV	0,056	0,046	9,05
02.14.04	PP	0,080	0,066	12,67
02.17.04	PP	0,062	0,042	18,09
02.18.03	PP	0,064	0,043	19,00
02.14.04	PM	0,142	0,086	50,67
02.17.04	PM	0,166	0,098	61,52
02.18.03	PM	0,178	0,091	78,71

Leyenda: CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro.

Tabla N° 02. Valores de absorbancias, ratios de calidad y concentración de ARN total

Accesión	Muestra	A 260	A 280	260/280	260/230	ng/ μ L
02.14.04	CV	17,29	8,23	2,10	2,70	691,60
02.14.04	CP	25,07	11,93	2,10	2,46	1002,80
02.14.04	CM	19,56	9,28	2,11	2,53	782,40
02.14.04	PV	21,25	10,03	2,12	2,43	849,80
02.14.04	PP	6,56	3,06	2,14	2,72	262,20
02.14.04	PM	7,89	3,65	2,16	3,48	315,50
02.17.04	CV	14,82	7,12	2,08	2,21	592,70
02.17.04	CP	12,25	5,88	2,09	2,65	490,00
02.17.04	CM	12,12	5,66	2,14	2,99	484,70
02.17.04	PV	17,64	8,39	2,10	2,44	705,50
02.17.04	PP	13,22	6,27	2,11	2,30	528,90
02.17.04	PM	9,04	4,20	2,15	2,87	361,40
02.18.03	CV	23,45	11,40	2,06	2,32	938,10
02.18.03	CP	24,39	11,76	2,07	2,39	975,50
02.18.03	CM	16,96	8,19	2,07	2,24	678,20
02.18.03	PV	19,35	9,14	2,12	2,36	774,00
02.18.03	PP	9,66	4,52	2,14	3,17	386,40
02.18.03	PM	12,40	5,88	2,11	2,11	496,00

Leyenda: CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro.

Tabla N° 03. Características de los cebadores diseñados para los genes de estudio

Enzima	Tamaño del Amplicón	Secuencias	Tamaño del Cebador	Tm	GC%
<i>PAL</i>	72	F: AGGACTTCGACAAGGTGTTTC	20	62	50
		R: CTTTAAGGCATCCGAGCAAAG	21	61	47.6
<i>CHS</i>	85	F: ACCAGGTGGAGGAGAAGT	18	62	55.6
		R: CTCGACATGTTCCCGTACTC	20	62	55
<i>UFGT</i>	70	F: GCGGTTGGAACGTTACT	19	62	52.6
		R: CCGAAGAACGGCCTACATATC	21	62	52.4

Leyenda: *PAL* = fenilalanina amonio liasa, *CHS* = chalcona sintetasa, *UFGT* = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa.

Tabla Nº 04. Resultados del análisis estadístico descriptivo del contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* de cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
ANTOCIANINAS	CV	3	40,1098	10,16903	5,87109	28,95	48,86
	CP	3	478,9054	98,26807	56,73510	387,23	582,65
	CM	3	759,9758	155,32979	89,67970	588,08	890,26
	PV	3	6,9363	2,90831	1,67911	3,62	9,05
	PP	3	16,5868	3,42526	1,97758	12,67	19,00
	PM	3	63,6329	14,14203	8,16491	50,67	78,71
	Total	18	227,6912	304,25616	71,71386	3,62	890,26
<i>PAL</i>	CV	3	5,1018	2,50630	1,44701	3,21	7,94
	CP	3	75,5662	21,83666	12,60740	57,89	99,98
	CM	3	352,2400	122,88279	70,94641	222,09	466,26
	PV	3	0,3937	0,24130	0,13931	0,21	0,67
	PP	3	3,1266	1,35805	0,78407	1,59	4,17
	PM	3	23,8932	10,39644	6,00239	12,52	32,90
	Total	18	76,7202	136,46997	32,16628	0,21	466,26
<i>CHS</i>	CV	3	21,4393	7,55705	4,36307	13,00	27,57
	CP	3	77,4063	18,78405	10,84497	57,94	95,42
	CM	3	266,1534	87,34238	50,42714	188,63	360,79
	PV	3	4,8980	0,43221	0,24954	4,41	5,22
	PP	3	6,4864	2,11136	1,21900	4,50	8,70
	PM	3	34,8459	13,83385	7,98698	22,98	50,04
	Total	18	68,5382	99,29828	23,40483	4,41	360,79
<i>UFGT</i>	CV	3	0,4164	0,22914	0,13230	0,23	0,67
	CP	3	3,6294	1,14990	0,66389	2,68	4,91
	CM	3	10,7316	4,57817	2,64321	6,63	15,67
	PV	3	0,1024	0,01015	0,00586	0,09	0,11
	PP	3	0,1185	0,00732	0,00423	0,11	0,13
	PM	3	0,1661	0,02075	0,01198	0,15	0,19
	Total	18	2,5274	4,30720	1,01522	0,09	15,67

Leyenda: *PAL* = fenilalanina amonio liasa, *CHS* = chalcona sintetasa, *UFGT* = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa. CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro.

Tabla N° 05. Resultados del ANOVA del contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrado de la media	F	p
ANTOCIANINAS_C	Inter-grupos	789749,187	2	394874,594	34,958	0,000
	Intra-grupos	67774,735	6	11295,789		
	Total	857523,922	8			
PAL_C	Inter-grupos	202018,478	2	101009,239	19,446	0,002
	Intra-grupos	31166,604	6	5194,434		
	Total	233185,082	8			
CHS_C	Inter-grupos	98642,796	2	49321,398	18,407	0,003
	Intra-grupos	16077,280	6	2679,547		
	Total	114720,076	8			
UFGT_C	Inter-grupos	167,167	2	83,583	11,227	0,009
	Intra-grupos	44,669	6	7,445		
	Total	211,835	8			

Leyenda: PAL_C = fenilalanina amonio liasa cáscara, CHS_C = chalcona sintetasa cáscara, UFGT_C = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa cáscara.

Tabla N° 06. Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas entre el contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
ANTOCIANINAS_C	CV CP	-438,79557*	86,77860	,006	-705,0562	-172,5350
	CM	-719,86600*	86,77860	,000	-986,1266	-453,6054
	CP CV	438,79557*	86,77860	,006	172,5350	705,0562
	CM	-281,07043*	86,77860	,041	-547,3310	-14,8098
	CM CV	719,86600*	86,77860	,000	453,6054	986,1266
	CP	281,07043*	86,77860	,041	14,8098	547,3310
PAL_C	CV CP	-70,46440	58,84689	,497	-251,0228	110,0940
	CM	-347,13814*	58,84689	,003	-527,6965	-166,5797
	CP CV	70,46440	58,84689	,497	-110,0940	251,0228
	CM	-276,67374*	58,84689	,008	-457,2321	-96,1153
	CM CV	347,13814*	58,84689	,003	166,5797	527,6965
	CP	276,67374*	58,84689	,008	96,1153	457,2321
CHS_C	CV CP	-55,96697	42,26540	,434	-185,6488	73,7149
	CM	-244,71413*	42,26540	,003	-374,3960	-115,0323
	CP CV	55,96697	42,26540	,434	-73,7149	185,6488
	CM	-188,74716*	42,26540	,010	-318,4290	-59,0653
	CM CV	244,71413*	42,26540	,003	115,0323	374,3960
	CP	188,74716*	42,26540	,010	59,0653	318,4290
UFGT_C	CV CP	-3,21301	2,22782	,380	-10,0486	3,6226
	CM	-10,31516*	2,22782	,009	-17,1507	-3,4796
	CP CV	3,21301	2,22782	,380	-3,6226	10,0486
	CM	-7,10215*	2,22782	,043	-13,9377	-,2666
	CM CV	10,31516*	2,22782	,009	3,4796	17,1507
	CP	7,10215*	2,22782	,043	,2666	13,9377

Legenda: *La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05. PAL_C = fenilalanina amonio liasa cáscara, CHS_C = chalcona sintetasa cáscara, UFGT_C = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa cáscara. CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro.

Tabla N° 07. Resultados del ANOVA del contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrado de la media	F	p
ANTOCIANINAS_P	Inter-grupos	5520,975	2	2760,488	37,611	0,000
	Intra-grupos	440,376	6	73,396		
	Total	5961,351	8			
PAL_P	Inter-grupos	990,946	2	495,473	13,514	0,006
	Intra-grupos	219,977	6	36,663		
	Total	1210,923	8			
CHS_P	Inter-grupos	1703,660	2	851,830	13,037	0,007
	Intra-grupos	392,040	6	65,340		
	Total	2095,700	8			
UFGT_P	Inter-grupos	0,007	2	0,003	16,788	0,003
	Intra-grupos	0,001	6	0,000		
	Total	0,008	8			

Leyenda: PAL_P = fenilalanina amonio liasa pulpa, CHS_P = chalcona sintetasa pulpa, UFGT_P = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa pulpa.

Tabla N° 08. Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas entre el contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
ANTOCIANINAS_P	PV PP	-9,65049	6,99504	,408	-31,1132	11,8122
	PM	-56,69661*	6,99504	,000	-78,1593	-35,2339
	PP PV	9,65049	6,99504	,408	-11,8122	31,1132
	PM	-47,04612*	6,99504	,001	-68,5088	-25,5834
	PM PV	56,69661*	6,99504	,000	35,2339	78,1593
	PP	47,04612*	6,99504	,001	25,5834	68,5088
PAL_P	PV PP	-2,73291	4,94387	,849	-17,9021	12,4362
	PM	-23,49949*	4,94387	,008	-38,6687	-8,3303
	PP PV	2,73291	4,94387	,849	-12,4362	17,9021
	PM	-20,76658*	4,94387	,013	-35,9357	-5,5974
	PM PV	23,49949*	4,94387	,008	8,3303	38,6687
	PP	20,76658*	4,94387	,013	5,5974	35,9357
CHS_P	PV PP	-1,58833	6,60000	,969	-21,8390	18,6623
	PM	-29,94786*	6,60000	,009	-50,1985	-9,6972
	PP PV	1,58833	6,60000	,969	-18,6623	21,8390
	PM	-28,35952*	6,60000	,012	-48,6101	-8,1089
	PM PV	29,94786*	6,60000	,009	9,6972	50,1985
	PP	28,35952*	6,60000	,012	8,1089	48,6101
UFGT_P	PV PP	-,01608	,01142	,395	-,0511	,0190
	PM	-,06365*	,01142	,003	-,0987	-,0286
	PP PV	,01608	,01142	,395	-,0190	,0511
	PM	-,04756*	,01142	,014	-,0826	-,0125
	PM PV	,06365*	,01142	,003	,0286	,0987
	PP	,04756*	,01142	,014	,0125	,0826

Leyenda: *La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05. PAL_P = fenilalanina amonio liasa pulpa, CHS_P = chalcona sintetasa pulpa, UFGT_P = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa pulpa. CV = cáscara de fruto verde, CP = cáscara de fruto pintón, CM = cáscara de fruto maduro.

Tabla Nº 09. Resultados de la correlación bivariada de Pearson para determinar diferencias significativas en el contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en cáscara de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

		ANTOCIANINAS_C	PAL_C
ANTOCIANINAS_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,896** ,001
	N	9	9
PAL_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,896** ,001	1
	N	9	9
		ANTOCIANINAS_C	CHS_C
ANTOCIANINAS_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,901** ,001
	N	9	9
CHS_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,901** ,001	1
	N	9	9
		ANTOCIANINAS_C	UFGT_C
ANTOCIANINAS_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,918** ,000
	N	9	9
UFGT_C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,918** ,000	1
	N	9	9

Leyenda: ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). PAL_C = fenilalanina amonio liasa cáscara, CHS_C = chalcona sintetasa cáscara, UFGT_C = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa cáscara.

Tabla Nº 10. Resultados de la correlación bivariada de Pearson para determinar diferencias significativas en el contenido de antocianinas y la expresión de los genes *PAL*, *CHS* y *UFGT* en pulpa de frutos verdes, pintones y maduros de *M. dubia*.

		ANTOCIANINAS_P	PAL_P
ANTOCIANINAS_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,977** ,000
	N	9	9
PAL_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,977** ,000	1
	N	9	9
		ANTOCIANINAS_P	CHS_P
ANTOCIANINAS_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,977** ,000
	N	9	9
CHS_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,977** ,000	1
	N	9	9
		ANTOCIANINAS_P	UFGT_P
ANTOCIANINAS_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,984** ,000
	N	9	9
UFGT_P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,984** ,000	1
	N	9	9

Leyenda: **La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). PAL_P = fenilalanina amonio liasa pulpa, CHS_P = chalcona sintetasa pulpa, UFGT_P = UDP-glucosa: flavonoide-3-O-glucosil transferasa pulpa.