

ANTOCIANINAS EN UVA (*Vitis vinifera* L.) Y SU RELACIÓN CON EL COLORGRAPE ANTHOCYANINS (*Vitis vinifera* L.) AND THEIR RELATION TO COLORGraciela del Valle Leguizamón<sup>1,2</sup> Alberto González León<sup>2</sup> y Reginaldo Báez Sañudo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Fruticultura, Departamento de Producción, Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Avenida Belgrano Sur 1912. Santiago del Estero. Argentina. CP 4200. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A. C.). Carr. a la Victoria Km. 6,5. C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, México. Tel: 01 (662) 289-2400. Ext. 226. Correo electrónico: rbaez@cascabel.ciad.mx

\* Autor para correspondencia

## RESUMEN

Las antocianinas son compuestos fenólicos que se encuentran principalmente en frutos, flores y hojas de las plantas, y son las responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta. Se sintetizan a partir de la conversión de los precursores fenilalanina y acetato, vía el metabolismo del fenil propanoide, y se acumulan en las vacuolas de las células hipodermas. Las enzimas de la biosíntesis son reguladas a nivel de transcripción, y en uvas su punto crítico está a la altura del gen que codifica para la enzima UDP glucosa: flavonoide-3-glucosil transferasa (UFGT), lo que implica una regulación más tardía que en otras especies. Se sintetizan durante el cambio de color de la baya y son los pigmentos más importantes en las uvas coloreadas. Su estructura corresponde a heterociclos formados por la combinación de una aglicona y un azúcar. En *Vitis vinifera* esta se fija en la posición 3, y en otras *Vitis* son diglucósidos. Tienen una alta capacidad antioxidante, y han sido difíciles de estudiar debido a su inestabilidad, a pesar que la acetilación contribuye a su estabilización y son estas las que se almacenan más eficientemente en vacuolas. Su función se asocia con la coloración de la fruta y con la protección ante el estrés lumínico, como parte del sistema antioxidante. De ahí lo importante de su estudio. La concentración y perfil de antocianinas varían entre especies, cultivares, estados de madurez, condiciones estacionales, áreas de producción, prácticas culturales y niveles de rendimiento. La luminosidad y la temperatura son las principales variables ambientales que regulan síntesis de estos compuestos; la primera la estimula y las altas temperaturas parecen inhibirla. En el presente trabajo se hizo una revisión de los avances en la investigación sobre distintos aspectos de las antocianinas, tales como su naturaleza, ruta biosintética y regulación, además de los efectos que la luminosidad y la temperatura ejercen sobre ellas, en especial relación con uvas.

**Palabras clave:** *Vitis vinifera*, antocianinas, color, luminosidad, temperatura.

## SUMMARY

Anthocyanins are phenolic compounds, mainly found in fruits, leaves and flowers, where they confer the red, blue and violet colors. They are synthesized from active precursors: phenyl alanine and acetate by the propanoid pathway, and are accumulated into hypodermal vacuoles. The enzymes of this biosynthetic pathway are regulated at the transcriptional level. The gene encoding for UDP-glucose: flavon-

oid 3-glucosyltransferase (UFGT), the last step in the biosynthetic pathway, is critical for anthocyanin synthesis in grape berry skins. Anthocyanins are synthesized during *veraison* and are the most important pigments in red and colored grapes. Their structure is heteroside made by the combination of an aglycon and a sugar, usually glucose. In *Vitis vinifera* cultivars, sugar are fixed in position 3; however, other *Vitis* species have two glucosides. Anthocyanins are the most powerful natural antioxidants; and their study has been difficult because of their unstability. However, they can be stabilized by acylation, and then they may be efficiently stored by vacuoles. In general, their role is associated to render color in berries and to detoxification under light stressing conditions, so their study is important. The concentration and anthocyanin profile varies among grape species, cultivars, maturity stages, seasons, environmental conditions, field practices and levels of yield. Light and temperature are the main environmental variables that regulate their biosynthesis where light stimulates it and high temperature appears to inhibit it. This review aims to address recent advances on the anthocyanin nature, regulation of biosynthetic pathway, and their relation to luminosity and temperature in grapes.

**Index words:** *Vitis vinifera*, anthocyanins, color, light, temperature.

## INTRODUCCIÓN

Las antocianinas pertenecen al complejo grupo de compuestos fenólicos solubles en agua (Prior *et al.*, 1998), y confieren a frutos, flores y hojas los colores azul, rojo, violeta (Kong *et al.*, 2003). En *Vitis vinifera* L., se sintetizan durante el envero que corresponde al cambio de color (Keller y Hrazdina, 1998) y se acumulan en las vacuolas de las tres o cuatro primeras capas celulares hipodérmicas de las bayas, y en algunos casos en el mesocarpio y las semillas (Cantos *et al.*, 2002). En este fruto se encuentran principalmente monoglucósidos de malvidina (Mv), delphinidina (Df), peonidina (Pn), petunidina (Pt) o cianidina (Cy) (Torres *et al.*, 2002). La acetilación en la posición 6 del azúcar con los ácidos *p*-cumárico y cafeico (Beckwith *et al.*, 2004), o la formación de complejos con metales contribuye a su estabilización (Marković *et al.*, 2005).

Las antocianinas se sintetizan a partir de los precursores fenilalanina y acetato, por medio de la ruta del fenil propanoide (Winkel 2004; Zhang *et al.*, 2004; Dixon, 2005). Esta es regulada a nivel genético (Davies y Schwinn, 2003) y es altamente influenciada por factores ambientales (Winkler *et al.*, 1974), de modo que se establecen interacciones complejas (Jaakola *et al.*, 2002). Si bien se sintetizan en el citoplasma, se acumulan en vacuolas y el mecanismo de transporte es un punto importante que aún no está claro (Mueller *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Desde el punto de vista funcional y debido a su alto poder reductor, actúan como antioxidantes al prevenir o detoxificar procesos que conducen a la producción de radicales libres y a la muerte celular (Kong *et al.*, 2003); en vegetales se asocian con mecanismos de protección en casos de excesos de luz (O'Neill y Gould, 2003) y con la coloración de los frutos (Steyn *et al.*, 2000).

En las uvas el contenido y perfil de antocianinas varía entre especies (Cantos *et al.*, 2002), cultivares, estados de madurez (Downey *et al.*, 2003), condiciones estacionales, áreas de producción (Mazza *et al.*, 1999; Mateus *et al.*, 2003), prácticas culturales (Guidoni *et al.*, 2002) y también con el nivel de rendimiento (Keller y Hrazdina, 1998; Esteban *et al.*, 2001). El objetivo de este trabajo fue revisar los avances recientes en la investigación sobre la naturaleza de las antocianinas, su ruta biosintética, las regulaciones de la misma, los eventos post-biosíntesis, la función que cumplen y finalmente la relación con la luminosidad y temperatura, en uva.

### ANTOCIANINAS: NATURALEZA Y DESCRIPCIÓN

Las antocianinas son compuestos del grupo de los flavonoides que se caracterizan por su alto poder reductor y pueden ser inducidas rápidamente en respuesta al frío, radiación ultravioleta o ataques de patógenos (Kong *et al.*, 2003). Son las responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta (Kalt *et al.*, 2003) en hojas, flores y frutos, especialmente en arándano (*Vaccinium corymbosum* L), uva y manzana (*Malus spp*) (Kong *et al.*, 2003). En las hojas forman parte del fotosistema II (PSII) y de los complejos de disipación energética en los casos de toxicidad por luminosidad, en plantas que crecen en latitudes altas (Kalt *et al.*, 2003; O'Neill y Gould, 2003). En uva, se encuentran principalmente en la hipodermis y en las semillas (Cantos *et al.*, 2002).

Su estructura corresponde a heterociclos formados por la combinación de una aglicona y un azúcar generalmente glucosa (Beckwith *et al.*, 2004). En cultivares de *Vitis vi-*

*nifera* la glucosa se fija en la posición 3 del anillo (Figura 1 A), mientras que otras especies de *Vitis* contienen dos glucósidos ubicados en las posiciones 3 y 5 (Boss *et al.*, 1996). La aglicona presenta distintos patrones de hidroxilación y de metilación en las posiciones 3' (R<sub>1</sub>) y 5' (R<sub>2</sub>) del anillo B (Figura 1 A, B y C) (Winkel-Shirley, 2001), y son éstos los que confieren mayor o menor capacidad antioxidante y es la cianidina 3-glucósido la de mayor poder reductor. 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 (Steyn *et al.*, 2000). Las antocianinas acetiladas son las más estables (Terahara *et al.*, 2004) y los ácidos *p*-cumárico y caféico son típicos en la acetilación de las antocianinas de uvas (Steyn *et al.*, 2002). 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 (Marković *et al.*, 2005).

Solamente seis antocianinas son comunes en los vegetales superiores: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Df), de las que Cy, Pg y Df son las más ampliamente distribuidas. En los frutos se encuentran principalmente Cy (50 %), Pg (12 %), Pn (12 %); con cuatro tipos de glucosilación las antocianinas glicosiladas más frecuentes son: 3-monósidos; 3-biósididos; 3,5-diglicósidos y 3,7 diglicósidos (Kong *et al.*, 2003). *Vitis vinifera* L. produce usualmente 3-monoglucósido, 3 acetilglucósido y 3-*p*-cumaroil glucósido, todos derivados de las agliconas Df (Steyn *et al.*, 2000), Cy y Pt, que se encuentran en mayor proporción en las uvas para vinificar. Una excepción es el cultivar 'Pinot Noir' que sólo produce antocianinas no acetiladas (Boss *et al.*, 1996).

Los estudios reportados hasta el momento se han hecho fundamentalmente en uvas para la elaboración de vinos, con los cultivares 'Tempranillo' (Esteban *et al.*, 2001), 'Cabernet Franc', 'Merlot' y 'Pinot Noir' (Mazza *et al.*, 1999) y 'Shiraz' (Boss *et al.*, 1996; Downey *et al.*, 2003). Las uvas 'Graciano', presentan una mayor proporción de Pn comparado con los cultivares 'Tempranillo' y 'Cabernet Sauvignon' (Nuñez *et al.*, 2004). En uvas para mesa, Cantos *et al.* (2002) caracterizaron el perfil de polifenoles de las uvas rojas 'Crimson Seedless', 'Flame Seedless', 'Red Globe' y 'Napoleón'; encontraron que en 'Flame Seedless' las antocianinas representan 51 % de los fenoles totales, y supera a los otros cultivares. Sin embargo, éstas no presentaron antocianinas acetiladas.

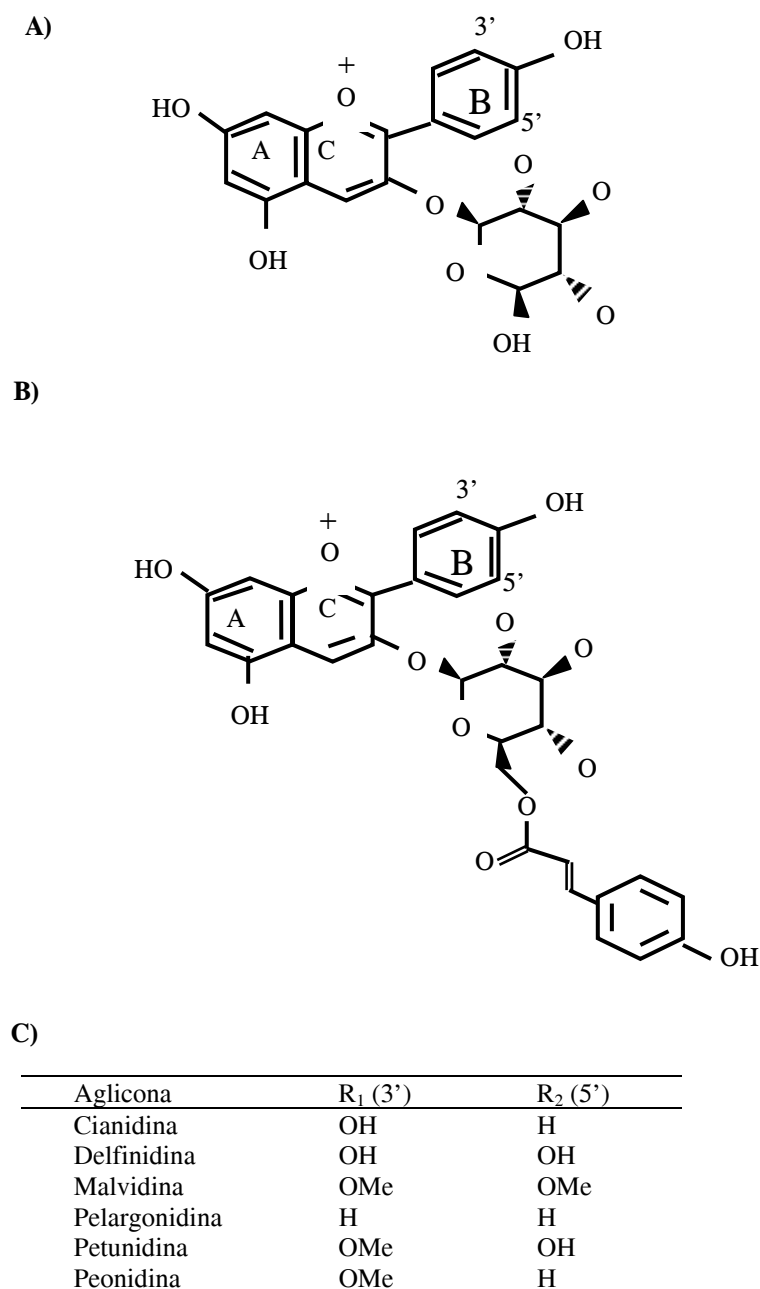


Figura 1. Estructura química de las principales antocianinas presentes en uva *Vitis vinifera* L. A) 3-glucósido; B) 3-p-cumaroil glucósido. C) Distintos patrones de hidroxilación y metilación, para R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> ubicados en las posiciones 3' y 5', respectivamente, lo que origina las distintas variantes. (Adaptado de Coon *et al.*, 2003)

## BIOSÍNTESIS DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas únicamente se sintetizan en determinados tejidos y durante determinadas etapas de la vida de la planta. Estos compuestos son objeto de investigaciones genéticas y bioquímicas intensas (Taylor, 1998) lo que ha

llevado a la elucidación de la ruta de síntesis (Boss *et al.*, 1996), razón por la que se dispone de información acerca de las reacciones involucradas (Jaakala *et al.*, 2002; Dixon, 2005) y sobre algunos genes importantes para la ingeniería metabólica (Taylor, 1998). La acumulación visible de estos compuestos usualmente refleja la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (Jaakala

*et al.*, 2002), las cuales pueden actuar como complejos multienzimáticos asociados con las membranas, lo que impacta la regulación, eficiencia y especificidad de la vía metabólica (Winkley-Shirley, 2001; Jeong *et al.*, 2004). Estudios en diferentes especies, como *Arabidopsis thaliana*, maíz (*Zea mays*), petunia (*Petunia hybrida*) (Winkley-Shirley, 2001), tabaco (*Nicotiana tabaco*) (Dixon *et al.*, 2005) y vid (Downey *et al.*, 2003), han generado información acerca de la expresión coordinada de enzimas y genes; la canalización entre intermediarios (Winkel, 2004), la interacción física de las enzimas y la asociación de éstas con las membranas del retículo endoplasmático (RE) (Achnine *et al.*, 2004).

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 (Dixon *et al.*, 2005), a pesar de que existe certeza acerca de que estas enzimas se organizan espacialmente en el citoplasma celular, asociadas con el RE (Winkel, 2004). 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 (Achnine *et al.*, 2004), aunque la organización y el significado bioquímico y fisiológico de esta canalización no se han establecido (Winkel, 2004).

La síntesis de estos pigmentos comienza con la convergencia de los precursores fenilalanina y acetato, vía el metabolismo del fenilpropanoide y acetato respectivamente (Figura 2) (Zhang *et al.*, 2002a, 2004). PAL es la encargada de convertir la fenilalanina en 4-cumaroil CoA, el precursor activo de los flavonoides (Winkley-Shirley, 2001). Dixon *et al.* (2005) proponen la presencia de dos tipos de PAL: PAL1, localizada en el RE y PAL2, y ambas interactúan de forma diferencial con C4H, enzima del grupo P450. Al considerar esta relación diferencial y el concepto de canalización, Winkel (2004) propone la organización de las enzimas como complejos llamados compartimentos metabólicos o metabolones, que son diferentes en función del producto final al que se incline la ruta de síntesis.

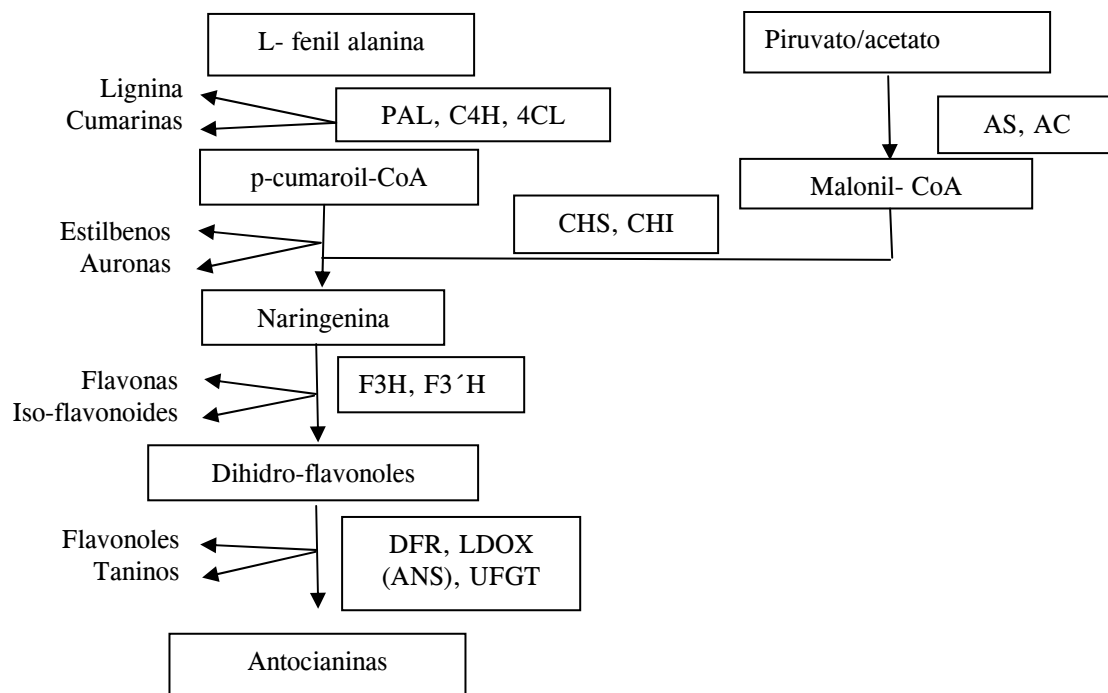


Figura 2. Ruta biosintética de antocianinas. Las siglas corresponden a los nombres de las enzimas involucradas: Fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H), 4-cumaril CoA ligasa (4CL), acetil-CoA sintetasa (AS), acetil-CoA carboxilasa (AC), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavonoide 3-hidroxilasa (F3H), flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), leucoantocianidina dioxygenasa (LDOX), antocianidina sintetasa (ANS) y UDP flavonoide glucosil transferasa (UGT) (Tomado de Zhang *et al.*, 2004).

Posteriormente, chalcona sintasa (CHS) condensa los precursores activos malonil CoA y 4-cumaroil CoA (Winkley-Shirley, 2001) para formar naringenina-chalcona (Zhang *et al.*, 2002a). Tanto PAL como CHS son inducidas por la luz y por el ataque de patógenos (Clive y Nicholson, 1998), y los genes que las codifican son activados por estímulos externos a nivel de transcripción (Boss *et al.*, 1996). La acumulación de chalconas en los tejidos vegetales es rara, puesto que son rápidamente isomerizadas por chalcona isomerasa (CHI) a naringinina (Holton y Cornish, 1995).

En flores, la flavonona 3-hidroxilasa (F3H), enzima del tipo citocromo P450 hidroxilasas (P450) (Springob *et al.*, 2003), cataliza la hidroxilación del carbono 3 en el anillo C de naringinina, para transformarlo en dihidrokaempferol, y dirige el flujo de carbono a la síntesis de Cy, Pg, las antocianinas básicas (Holton y Cornish, 1995) y Df; la otra alternativa es que se derive a la formación de leucoantocianidinas que conducirá a la síntesis de cianidina y peonidina (Boss *et al.*, 1996). 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 anti-oxidante (Zhang *et al.*, 2002a).

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) (Winkley-Shirley, 2001). Finalmente, se produce una glicosilación catalizada por UDP glucosa -flavonoide glucosil transferasa (UFGT), paso que contribuye a la coloración y a la estabilidad de la molécula ante ataques nucleofílicos o degradación enzimática. Esta etapa es particularmente importante en uvas, ya que la glucosilación se presenta solamente en las bayas coloreadas (Kobayashi *et al.*, 2001). 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 (Zhang *et al.*, 2002a), ocurre la acetilación, que es la adición de residuos de ácidos aromáticos o alifáticos en las posiciones glicosiladas, característica de las antocianinas más estables (Zhang *et al.*, 2002a) y la copigmentación (Marković *et al.*, 2005).

En síntesis, los avances en el conocimiento de la biosíntesis de antocianinas generan un importante campo para el redireccionamiento de las rutas biosintéticas en función del producto final a obtener, en este caso una mayor producción de antocianinas estables.

### Síntesis y regulación de antocianinas en vid

Las uvas coloreadas son una de las principales fuentes de antocianinas, por lo que se desarrollan estudios para incrementar la síntesis de éstas, y por ende es importante conocer los mecanismos de regulación implicados (Mori *et al.*, 2005) ya que también preocupa el color como atributo externo de calidad (Winkler *et al.*, 1974).

En uva la síntesis de antocianinas coincide con el envejecimiento, periodo en el que la baya comienza a tomar color en el caso de las variedades coloreadas (Winkler *et al.*, 1974). Sin embargo, la expresión de genes que codifican para las enzimas PAL, CHS, F3H, DFR y UFGT se producen en dos fases: en la floración (temprana) y otra cercana al cambio de color de fruto (tardía) (Boss *et al.*, 1996). Esto indica que la síntesis de antocianinas en piel de bayas de uva en maduración coincide con la expresión de genes de su ruta biosintética, y sugiere que existen genes reguladores involucrados (Spayd *et al.*, 2002). La expresión del gen que codifica para UFGT es regulada de manera diferente a los otros genes mencionados, lo que propone que en uvas el punto crítico de control de la ruta biosintética es más tardío que en maíz y petunia en las que se regula al inicio de la vía (Boss *et al.*, 1996).

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 (Boss *et al.*, 1996). 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 (Spayd *et al.*, 2002), mientras que la actividad de las enzimas PAL y CHI disminuye al iniciarse la acumulación del pigmento (Roubelakis-Angelakis y Kliever, 1986). No se evidencia síntesis de antocianinas mientras no se exprese el gen que codifica para UFGT (Keller y Hrazdina, 1998; Downey *et al.*, 2003).

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 (Jaakala *et al.*, 2002). 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 genes que codifican para el primer grupo enzimático se expresan durante el

desarrollo inicial de la baya, mientras que otros genes reguladores se expresan hasta la maduración (Boss *et al.*, 1996). 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 (Gollop *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2005). Existe una fuerte correlación entre la expresión transcripcional y el aumento de la síntesis de antocianinas, como consecuencia de la aplicación de ácido jasmónico y luz a cultivos celulares de vid (Zhang *et al.*, 2002b), hecho que se atribuye a la regulación de la expresión de DFR. El gen *dfr*, que codifica para esta enzima, 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 (Gollop *et al.*, 2002).

En estudios de la biosíntesis de antocianinas realizados en *Arabidopsis* y *Petunia*, Winkel-Shirley (2001) encontró que está controlada por dos tipos de genes reguladores de la transcripción pertenecientes a las familias MYB y MYC; sin embargo, el nivel de regulación parece ser diferente en uva (Boss *et al.*, 1996). 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 (Kobayashi *et al.*, 2002). Aparentemente la diferencia entre los cultivares blancos y coloreados estaría dada por una mutación de los genes que regulan la expresión de UFGT (Kobayashi *et al.*, 2001, 2002). Por su parte, Jeong *et al.* (2004) reportaron que la aplicación de ABA y el sombreado en vid afectaron negativamente la síntesis de mRNA; esto podría ser interesante para determinar la forma en que estas prácticas afectan al mRNA y la acumulación de *VlmybA1* en la biosíntesis de estos pigmentos, lo que afectaría no sólo la transcripción del mRNA de UFGT, sino también la de otros genes. Lo anterior se confirmó con un estudio acerca de la manera en que *VlmybA1* interactúa con las regiones promotoras de UFGT y otras enzimas.

La aplicación de etileno exógeno provoca un aumento de la síntesis de antocianinas, sin que se haya explicado el mecanismo involucrado (El-Kereami *et al.*, 2003). Kobayashi *et al.* (2001) indican que dentro del gen promotor de la actividad existe un elemento regulador que responde a esta hormona, pero no aportan datos relacionados al mismo. Según El-Kereami *et al.* (2003), el aumento de la actividad de UFGT se justifica por el aumento de transcritos de genes que codifican para CHS y F3H, mientras que las temperaturas nocturnas altas, de alrededor de 30 °C provocan la disminución de la síntesis por una disminución en la expresión del gen que codifica para UFGT (Mori *et al.*, 2005).

En conclusión, la identificación de genes reguladores específicos que inciden en la síntesis de las antocianinas es importante para aplicar tratamientos y elicitores que mejoren la expresión de éstas y del color.

### Transporte y acumulación en vacuolas

En general la biosíntesis de antocianinas ha sido más estudiada que la etapa post biosintética, que comprende modificaciones químicas y enzimáticas, el transporte, el almacenaje, la secreción y el catabolismo (Zhang *et al.*, 2002a). En *V. vinifera* se utilizan cultivos celulares como herramienta para elucidar los mecanismos de transporte y almacenamiento, tendientes a mejorar la producción de antocianinas estables (Zhang *et al.*, 2004).

La síntesis de las antocianinas se realiza a través de etapas catalizadas secuencialmente por enzimas localizadas en el citosol y el RE (Springob *et al.*, 2003), pero sólo se almacenan en las vacuolas (Zhang *et al.*, 2002a). 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) (Conn *et al.*, 2003) (Figura 3). Este mecanismo, que aún no está totalmente elucidado, varía entre especies (Mueller *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004), como por ejemplo en perejil (*Petroselinum crispum*) se sugiere que puede existir un transporte dependiente del pH (Springob *et al.*, 2003).

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 (Xu *et al.*, 2001) y en la formación de cianoplastos (Nozue *et al.*, 1997). Otra alternativa es que VP24 esté involucrada en la degradación de los conjugados de glutatión-S en la vacuola (Xu *et al.*, 2001), debido a su actividad aminopeptidasa (Nozue *et al.*, 2003). También se descubrió que la acetilación es una señal indispensable para el transporte de antocianinas (Marrs *et al.*, 1995), 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, por que actuaría como acarreador citoplásmico de antocianinas y flavonoides, en general (Mueller *et al.*, 2000). En el caso de maíz, el gen *Bz2* codifica para una GST involucrada en el transporte (Grotewold, 2004). En vid los estudios se centran en elucidar el rol de las AVI y de GST en el almacenaje y transporte, respectivamente (Zhang *et al.*, 2004), y aún no se

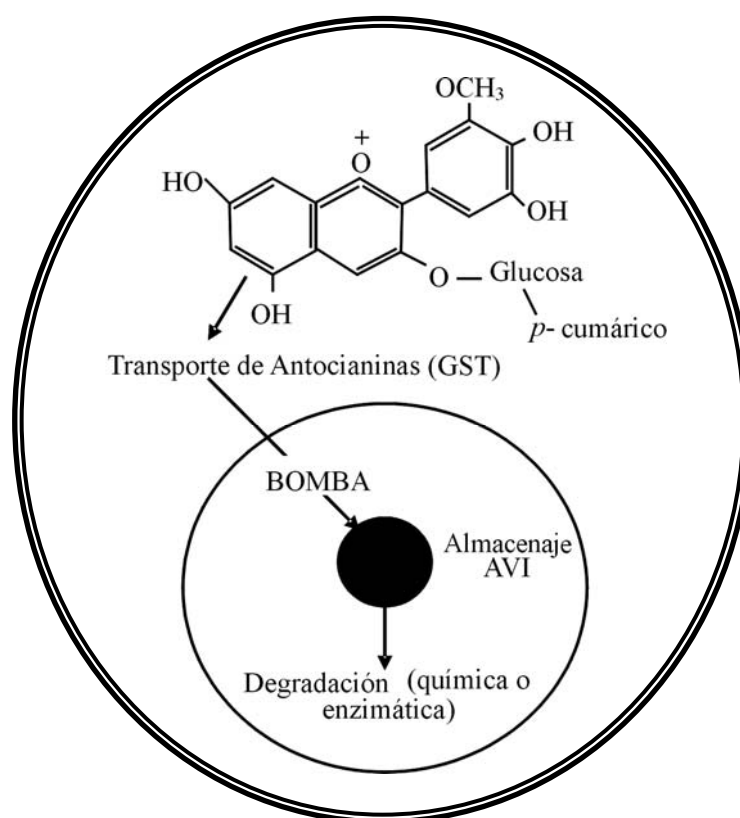


Figura 3. Esquema de los eventos post biosintéticos en antocianinas de *Vitis vinifera* L. (Adaptado de Zhang *et al.*, 2004)

conoce totalmente el mecanismo de transporte de las antocianinas no acetiladas.

En resumen, existen modelos divergentes que involucran acarreadores y vesículas (Grotewold, 2004), y si bien en los últimos años se avanzó en el estudio de mecanismos de transporte, es evidente que el rol de las GST y los antocianoplastos está en espera de ser ensamblado para entender de mejor manera estos procesos post-biosintéticos de transporte y almacenaje.

## FUNCIONES

Los productos del metabolismo secundario afectan muchas características agronómicas de los cultivos, entre ellas la calidad, el rendimiento, la resistencia y tolerancia a las condiciones de estrés (Dixon, 2005). La principal función de las antocianinas es conferir los colores rojo, azul o violeta a frutos, flores y hojas (Kong *et al.*, 2003). Además, pueden neutralizar los efectos de los radicales libres (Kaur y Kapoor, 2001) o disipar energía cuando otros sistemas detoxificantes han sido superados en condiciones graves de

estrés (Chalker-Scout, 1999). También se ha propuesto que los vegetales sacrifican las antocianinas para proteger a los tejidos clorofílicos (O'Neill y Gould, 2003).

Las propiedades antioxidantes de estos compuestos son moduladas por las diferentes hidroxilaciones y glucosilaciones, y es la cianidina 3-glucósido la antocianina con mayor poder antioxidante (Prior *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2003). Kalt *et al.* (2003) atribuyen a las antocianinas aproximadamente 50 % de la capacidad antioxidante en bayas rojas; sin embargo, las uvas de color verde o amarillo también presentan capacidad antioxidante aunque levemente menor que las rojas (Wang *et al.*, 1996). Algo similar sucede en manzanas amarillas, en las que su capacidad antioxidante estaría dada por otros fenoles o flavonoides diferentes de las antocianinas (Kondo *et al.*, 2002).

Además de la importancia que las antocianinas tienen en relación a la protección de los vegetales ante condiciones de estrés (Chalker-Scott, 1999), se han estudiado debido a los efectos benéficos de su capacidad antioxidante so-

bre enfermedades crónico-degenerativas, así como por ser hepatoprotector, antihipertensivo y anticancerígeno (Prior *et al.*, 1998). De ahí su importancia para el desarrollo de fármacos y para su uso en alimentos tanto como conservante o como pigmento de alimentos nutraceuticos (Suda *et al.*, 2003), pero su uso como conservante o colorante natural se ha demorado debido a su difícil aislamiento, inestabilidad y sensibilidad al pH (Kong *et al.*, 2003).

Otro aspecto importante es que el perfil de antocianinas permite diferenciar entre cultivares de apariencia similar, como en el caso de 'Tempranillo' y 'Cabernet Sauvignon' (Núñez *et al.*, 2004). Esto puede usarse como una herramienta para probar la autenticidad e identidad de los vinos derivados de éstos u otros cultivares; no obstante, es necesario investigar con vinos que provengan de distintas regiones geográficas y en distintos años (García Beneytez *et al.*, 2003) para tener resultados contundentes.

#### CONDICIONES AMBIENTALES, ANTOCIANINAS Y COLOR

El color es la consecuencia de la expresión de las antocianinas y ésta es afectada por condiciones ambientales y el ataque de patógenos (Kong *et al.*, 2003). En 1972, en un trabajo pionero, Kliewer y Torres, demostraron claramente la influencia que la temperatura ejerce sobre la síntesis de antocianinas y consecuentemente sobre la coloración de los racimos de uvas 'Tokay'. Por otra parte, se ha reportado que la baja temperatura y la luz ultravioleta favorecen el desarrollo de color en especies ornamentales (Mueller *et al.*, 2000). Beckwith *et al.* (2004), al estudiar el efecto de la luz en el desarrollo del color de gramíneas ornamentales, encontraron que éste se incrementa a medida que aumenta la intensidad de la luz fluorescente de la cámara de crecimiento. Este tratamiento puede usarse para acrecentar el valor estético de la especie. En las décadas pasadas, se hicieron estudios sobre el manejo del dosel de los viñedos, a fin de encontrar el área foliar y la exposición a la luz adecuadas (Jackson y Lombard, 1993), que garanticen la maduración de las bayas y mejoren la composición de los frutos a la cosecha (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986) y en especial el color (Winkler *et al.*, 1974). Los estudios se realizaron especialmente en uvas para la elaboración de vino, provenientes de zonas frías en las que la maduración de la fruta puede ser afectada por la dificultad para acumular los grados días de crecimiento (Spayd *et al.*, 2002).

Debe considerarse que la vitivinicultura se extendió hacia otras regiones de diferentes condiciones climáticas, en las que la radiación solar no es una limitante para el desarrollo por lo que la exposición directa de los racimos debe ser evitada para prevenir daños (Bergqvist *et al.*, 2001).

En regiones cálidas el contenido de azúcar se alcanza antes que el color por lo que se deja la fruta un tiempo más prolongado en el viñedo, con el consecuente riesgo de pérdidas por el ataque de patógenos o condiciones climáticas adversas. Se sabe que una vez que la fruta alcanza cierto contenido de azúcar, se bloquea la síntesis y acumulación de antocianinas (Boss *et al.*, 1996; Spayd *et al.*, 2002). La síntesis se ve más afectada por la calidad que por la cantidad de luz incidente sobre el racimo, por la regulación que ejerce sobre PAL (Davies y Schwinn, 2003). La relación de la temperatura con la exposición a la luz solar sobre los racimos es importante porque afecta la composición y el metabolismo de las bayas, efecto que varía de acuerdo con su estado de desarrollo (Bergqvist *et al.*, 2001).

Los racimos expuestos al sol contienen diez veces más flavonoides que los sombreados, ya que se incrementa la concentración de los 3-glicósidos de quercetina, kaempferol y miricetina (Spayd *et al.*, 2002). La luz provoca un incremento de la concentración total de antocianinas monoméricas y flavonoles, pero estas se ven reducidas por las excesivas temperaturas absolutas que inciden sobre racimos expuestos a la luz directa (Steyn *et al.*, 2000). Estas condiciones afectan en primer término a los flavonoles de la epidermis de la baya (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986) y a la concentración de los compuestos antociánicos, ya sea por degradación o inhibición de los mismos (Spayd *et al.*, 2002).

Las antocianinas se acumulan para proteger al tejido del fotoestrés cuando se absorbe excesiva energía radiante que no puede ser utilizada (O'Neill y Gould, 2003); por ello, los niveles de luminosidad bajos y las temperaturas altas no provocan este tipo de estrés, por lo que la síntesis de antocianinas sería innecesaria (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986). La acumulación de fenoles totales y de antocianinas en uva 'Cardinal' responde de manera diferente, lo que sugiere que la síntesis de estos compuestos presenta regulaciones independientes (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986), situación que difícilmente ocurra ya que tienen una parte de la ruta biosintética en común (Boss *et al.*, 1996). Sin embargo, podría justificarse con la teoría de los metabolones (Winkel, 2004). Las estrategias de elicitación no sólo mejoran la producción de metabolitos secundarios sino también constituyen un medio para manipular su perfil y concentración en cultivos celulares; por ello es necesario entender la respuesta celular a la elicitación (Curtin *et al.*, 2003).

Hasta ahora la falta de color en el huerto ha sido menos documentada y su fisiología es menos entendida. Se sabe que períodos de calor prolongados pueden reducir la síntesis, aunque un golpe de calor transitorio puede estimularla. En manzanas 'Rosemarie' y 'Forelle' la temperatura



provoca una degradación de las antocianinas, dependiente de la concentración inicial de éstas (Steyn *et al.*, 2000). Además de un inadecuado manejo de la luz (Jeong *et al.*, 2004), las altas temperaturas parecen ser la principal razón de la falta de color de la fruta (Spayd *et al.*, 2002), en especial las nocturnas (Kliwer y Torres, 1972; Mori *et al.*, 2005), lo que permite suponer que modificar el microclima de las frutas es una opción para mejorarlo (Steyn *et al.*, 2000), si se considera de manera especial el estado de desarrollo de la fruta en la que estas manipulaciones se lleven a cabo para mejorar el contenido de los flavonoides responsables del color (Downey *et al.*, 2003). Por tanto, estudiar la interacción entre la luz y la temperatura es de fundamental importancia (Bergqvist *et al.*, 2001) en regiones vitivinícolas cálidas, en las que deberían desarrollarse sistemas para atenuar las altas temperaturas, sin recurrir al sombreado total, que no se recomienda.

### CONCLUSIONES

Durante los últimos años se han hecho considerables avances en la caracterización molecular y expresión de genes estructurales y reguladores de la ruta biosintética de antocianinas. Sin embargo, muchas preguntas acerca de las reacciones terminales y el transporte y almacenaje en vacuolas permanecen sin respuesta. Estos estudios se realizaron en sistemas modelo como el de *Arabidopsis thaliana* y aún no se han dilucidado perfectamente en sistemas complejos como en el caso de *Vitis vinifera*, especialmente en cultivares destinados al consumo en fresco. El desarrollo del color, principal parámetro de calidad externo, suele ser problemático en zonas vitivinícolas cálidas. Por esta razón, entender la relación entre temperatura y luz será útil para atenuar sus efectos sobre el color, y constituye un tópico interesante para investigar.

### BIBLIOGRAFÍA

- Achnine L, E B Blancaflor, S Rasmussen, R A Dixon (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 16:3098-3109.
- Beckwith A G, Y Zhang, N P Seeram, A C Cameron, M G Nair (2004) Relationship of light quantity and anthocyanin production in *Pennisetum setaceum* cvs. Rubrum and Red Riding Hood. *J. Agric. Food Chem.* 52:456-461.
- Bergqvist J, N Dokoozlian, N Ebisuda (2001) Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:1-7.
- Boss P K, C Davies, S P Robinson (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111:1059-1066.
- Cantos E, J C Espín, F Tomás-Barberán (2002) Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.* 50:5691-5696.
- Clive L S C, R L Nicholson (1998) Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls. *Plant Physiol.* 116:979-989.
- Conn S, W Zhang, C Franco (2003) Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture. *Biotech. Lett.* 25:835-839.
- Curtin C, W Zhang, G Franco (2003) Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotech. Lett.* 25:1131-1135.
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanin in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70:1-9.
- Davies K D, K E Schwinn (2003) Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct. Plant Biol.* 30:913-925.
- Dixon R A (2005) Engineering of plant natural product pathways *Curr. Op. Plant Biol.* 8:329-336.
- Dixon R A, D Y Xie, S B Sharma (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *Transl. review. New Phytol.* 165:9-28.
- Downey M, J S Harvey, S P Robinson (2003) 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.* 9:110-121.
- El-Kereamy A, C Chervin, J-P Roustau, V Cheynier, J-M Souquet, M Moutounet, J Raynal, C Ford, A Latché, J-C Pech, M Bouzayen (2003) Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiol. Plant.* 119:175-182.
- Esteban M A, M J Villanueva, J R Lissarrague (2001) Effects of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo. *J. Sci. Food and Agric.* 81:409-420.
- García Beneytez C, F Cabello, E Revilla (2003) Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 51:5622-5629.
- Gollop R, S Even, V Colova Tsoleva, A Perl (2002) Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.* 373:1397-1409.
- Grotewold E (2004) The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products. *Planta* 219:906-909.
- Guidoni S, P Allara, A Schubert (2002) Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:224-226.
- Holton T A, E C Cornish (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 7:1071-1083.
- Jaakola L, K Määtä, A M Pirttilä, R Törrönen, S Kärenlampi, A Hohtola (2002) Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* 130:729-739.
- Jackson D I, P B Lombard (1993) Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:409-430.
- Jeong S T, N Goto-Yamamoto, S Kobayashi, M Esaka (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci.* 167:247-252.
- Kalt K, C Lawand, D A J Ryan, J E McDonald, H Donner, C F Forney (2003) Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128:917-923.
- Kaur C, H C Kapoor (2001) Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. *Int. J. Food Sci.* 36:703-725.
- Keller M, G Hrazdina (1998) 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.* 49:341-348.
- Kliewer W M, R E Torres (1972)** Effect of controlled day and night temperature on grape coloration. *Am. J. Enol. Vitic.* 23:71-77.
- Kobayashi S, M Ishimaru, K Hiraoka, C Honda (2002)** *Myb* related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215:924-933.
- Kobayashi S, M Ishimaru, C K Ding, H Yakushiji, N Goto (2001)** Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* 160:543-550.
- Kondo S, K Tsuda, N Muto, J Ueda (2002)** Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Sci. Hortic.* 96:177-185.
- Kong J M, L S Chiam, N K Goh, T F Chia, C Brouillard (2003)** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933.
- Marrs K A, M R Alfenito, A M Lloyd, V Walbot (1995)** A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375:397-400.
- Marković D J, J Nadezda, A Petranović, J M Baranać (2005)** The copigmentation effect of sinapic acid on malvidin: a spectroscopic investigation on colour enhancement. *J. Photochem. Photobiol. B* 78:223-228.
- Mateus N, J M Machado, V De Freitas (2003)** Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in Duoro valley and concentration in respective wines. *J. Agric. Food Chem.* 50:5497-5503.
- Mazza G, L Fukumoto, P Delaquis (1999)** Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47:4009-4017.
- Mori K, S Sugaya, H Gemma (2005)** Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* 105:319-330.
- Mueller A L, C D Goodman, R A Silady, V Walbot (2000)** AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 113:1561-1570.
- Nozue M, Baba S, Kitamura Y, Xu W, Kubo H, Nogawa M, Shioiri H, Kojima M (2003)** VP24 found in anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) of sweet potato cells is a member of a metalloprotease family. *Biochem. Eng. J.* 14:199-205.
- Nozue M, K Yamada, T Nakamura, H Kubo, M Kondo, M Nishimura (1997)** Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol.* 115:1065-1072.
- Núñez V, M Monagas, M C Gómez-Cordovés, B Bartolomé (2004)** *Vitis vinifera* L cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharv. Biol. Tech.* 31:69-79.
- O'Neill S, K S Gould (2003)** Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biol.* 30: 865-873.
- Prior R L, G Cao, A Martin, E Sofic, J Mc Ewen, C O'Brien, N Lischner, M Ehkenfeldt, W Kalt, G Krewer, C M Mailland (1998)** Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 46:2686-93.
- Roubelakis-Angelakis K A, W M Kliewer (1986)** Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenols in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:275-280.
- Spayd S E, J M Tarara, D L Mee, J C Ferguson (2002)** Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:171-182.
- Springob K, J Nakajima, A Yamazaki, K Saito (2003)** Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* 20:288-303.
- Steyn W J, D M Holcroft, S J E Wand, N C Cooks, G Jacobs (2000)** Dating Rosemarie: How to make her blush?. *Proceedings of the Cape Pomological Association Symposium. South Africa.* pp: 55-62.
- Suda I, T Oki, M Masuda, Mio Kobayashi, Y Nishiba, S Furuta (2003)** Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods. *JARQ* 37:167-173.
- Taylor C B (1998)** Factories of the future? Metabolic engineering in plant cells. *The Plant Cell* 10:641-644.
- Terahara N, I Konczak, H Ono, M Yoshimoto, O Yamakawa (2004)** Characterization of acylated anthocyanin in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* L. *J. Biomed. Biotech.* 5:279-286.
- Torres J L, B Varela, M T García, J Carrilla, C Matito, J Centelles, M Cascante, X Sort, R Bobet (2002)** Valorization of grape (*Vitis vinifera* L.) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* 50:7548-7555.
- Wang H, E J Race, A Shrikhande (2003)** Characterization of anthocyanins in grape juice by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51:1839-1844.
- Wang H, G Cao, R L Prior (1996)** Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44:701-705.
- Winkel, B S J (2004)** Metabolic channeling in plants. *Annual Review Plant Biology* 55:85-107.
- Winkel-Shirley B (2001)** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* 126:485-493.
- Winkler A J, J A Cook, W M Kliewer, L A Lider (1974)** General Viti-culture. University of California Press. California. USA. 709 p.
- Xu W, S Hidenari, K Mineo, N Masayuki (2001)** Primary structure and expression of a 24-kD Vacuolar. *Plant Physiol.* 125:447-455.
- Zhang W, C Franco, C Curtin, S Conn (2004)** To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *J. Biomed. Biotechnol.* 5:264-271.
- Zhang W, C Curtin, C Franco (2002a)** Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30:688-696.
- Zhang W, C Curtin, M Kikuchi, C Franco (2002b)** Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci.* 162:459-468.