

T
572.8652
E29

**NO SALE A
DOMICILIO**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela de Formación Profesional
de Biología

**“EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS:
GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA, L- GALACTOSA
DESHIDROGENASA Y L-GALACTONO-1,4-LACTONA
DESHIDROGENASA DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE
VITAMINA C EN *Myrciaria dubia* (kunth) McVaugh,
camu camu”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

AUTORES:

**Alina del Carmen Egoávil Reátegui
Julian Torres Flores**

DONADO POR:

CARLETO EGOÁVIL REATEGUI

los días 22 de 03 de 2013

IQUITOS – PERÚ

2012




381

JURADO CALIFICADOR DICTAMINADOR Y ASESOR



Dr. Jorge Luis Marapara del Águila

Presidente



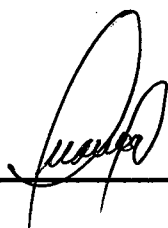
Dra. Blanca María Díaz Bardales

Miembro



Blgo. Javier Ramírez Abanto

Miembro



Dr. Juan Carlos Castro Gómez

Asesor



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Iquitos, 04 de mayo de 2012



En la ciudad de Iquitos, a los cuatro días del mes de mayo del 2012 y siendo 10:00 horas; se reunieron en el Auditorio del SECEDO-UNAP, el Jurado Calificador Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con R.D. N° 010-2011-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por: **Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr., Presidente;** **Blgo. JAVIER RAMÍREZ ABANTO, Miembro;** **Blga. BLANCA MARÍA DÍAZ BARDALES, Dra., Miembro;** El mencionado Jurado se constituyó en el Auditorio para escuchar, examinar, calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: **"EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS: GDP-L Galactosa Fosforilasa, L-Galactosa Deshidrogenasa Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE VITAMINA C EN Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh "camu camu";** realizado por los Brs. en Ciencias Biológicas de la FCB-Escuela de Biología, **ALINA DEL CARMEN EGOAVIL REÁTEGUI** de la Promoción II-2009, graduada de Bachiller con R.R. N° 2413-2010-UNAP de fecha 25 de octubre del 2010 y **JULIAN TORRES FLORES** de la Promoción II-2009, graduado de Bachiller con R.R. N° 0926-2011-UNAP de fecha 26 de abril del 2011; cuyo asesor es el **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, M.Sc.**



Luego de realizada la sustentación de la Tesis, los bachilleres fueron sometidos a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiendo absuelto de manera SATISFACTORIA las observaciones y objeciones que fueron formuladas por los integrantes del Jurado Calificador y Dictaminador.

Después de la deliberación y votación del caso, el Jurado Calificador y Dictaminador dio como veredicto APROBAR la Tesis por UNANIMIDAD, quedando los candidatos aptos para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad Universitaria competente, y su correspondiente inscripción en el Colegio de Biólogos del Perú.

Finalizado el acto, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12:10 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.

Jorge Luis Marapara Del Águila
PRESIDENTE

Javier Ramírez Abanto
MIEMBRO

Blanca María Díaz Bardales
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios, creador de todas las cosas, quien me ha dado fortaleza para continuar.

A mis padres por ayudarme a cumplir mis objetivos.

A ti papá por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre.

A ti mamá por hacer de mi una mejor persona a través de tus consejos, enseñanzas y tu amor.

A mi hermano por estar siempre presente brindándome su amistad y cariño.

A todos aquellos que creen que los sueños son posibles, porque detrás de cada línea de llegada, hay una de partida y porque detrás de cada logro siempre hay un nuevo desafío.

En memoria de Edson Paul Jaime Cerrón.

Alina del Carmen Egoávil Reátegui

A Dios por darme la vida y la salud para seguir luchando por mis metas.

En memoria de mi amigo y hermano Edson Paul Jaime Cerrón, quien vivirá siempre en mi corazón.

A mi madre por inculcarme los principios, valores y virtudes que dirigen y definen mi vida, por sembrar en mi la semilla más valiosa el amor, y por enseñarme con su ejemplo que todo en la vida es posible con dedicación y fe.

A mis hermanos Javier y Claudia por su invaluable apoyo y cariño en los momentos más importantes de mi vida.

A mi tía Rosa Consuelo Torres Vidal por todo el apoyo brindado durante mi formación profesional

A mis amigos que siempre estuvieron conmigo y me dieron su apoyo en todo momento y siempre les estaré agradecido.

Julian Torres Flores

AGRADECIMIENTO

Una vez llegado el momento de concluida esta tesis agradecemos a todas aquellas personas que con su apoyo han contribuido a la realización de la presente.

De manera muy especial y sincera al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, por su paciencia, apoyo y su capacidad para guiarnos en el desarrollo de esta tesis, le agradecemos, el habernos facilitado los medios suficientes en la realización de los objetivos propuestos. Muchas gracias por permitirnos una experiencia tan enriquecedora en nuestra formación como profesionales.

Igualmente al Blgo. Roberson Ramírez Saavedra por su tiempo y apoyo en todo momento, gracias realmente por tus consejos y orientaciones que nos permitieron crecer tanto a nivel profesional y personal.

A la MSc. Marianela Cobos Ruiz por su amabilidad, apoyo logístico y consejos tanto en el plano personal y profesional.

Al tesista y amigo Alexander Cerdeira Gutierrez quien colaboró y participó activamente de la parte experimental de esta tesis.

Gracias, también a nuestros queridos compañeros del laboratorio: Angel Araujo Fernández, Freddy Gutierrez Rodriguez, Mery Siguas Salas, Ana María Córdova López por todos los momentos compartidos durante nuestra estancia en el laboratorio.

Al proyecto multidisciplinario: Expresión de genes que codifican enzimas de la vía biosintética Smirnoff – Wheeler y su relación con la concentración de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh camu camu Iquitos- Perú por el financiamiento para la presente tesis.

Al centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por brindarnos las facilidades de acceso a sus instalaciones en la realización de este trabajo.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
Portada Interna	i
Página del JCyD y asesor	ii
Copia del acta de sustentación	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	vi
Índice del contenido	viii
Resumen	xi
Lista de figuras	
Figura N°01: Ubicación geográfica de la zona de muestreo	
Figura N°02: Mapa del vector plasmídico pCR® 2.1-TOPO	
Figura N°03: Bacterias transformantes y no transformantes	
Figura N°04: Amplificación y análisis de la Curva de Fusión en un PCR en tiempo real	
Figura N°05: Flujograma de Trabajo	

Figura N°06: Electroforesis del ARN total purificado a partir de frutos de Myrciaria dubia “camu camu”

Figura N°07: Barrido espectrofotométrico (200-860 nm) del ARN total purificado a partir de frutos de Myrciaria dubia “camu camu”

Figura N°08: Amplicones de los genes GGF, GDH y GLDH obtenidos con el método de PCR empleando cebadores degenerados de Myrciaria dubia “camu camu”

Figura N° 09: Amplicones de plásmidos recombinantes de los cultivos bacterianos

Figura N°10: Corrido electroforético del ADN plasmídico purificado

Figura N°11: Niveles relativos de expresión de los genes GGF, GDH y GLDH de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de Myrciaria dubia “camu camu”

Figura N°12: Amplicones de los genes codantes de enzimas de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de Myrciaria dubia “camu camu”

Figura N°13: Ruta biosintética de Smirnoff Wheeler en plantas

Lista de Tablas

Tabla N° 01: Pureza, calidad y concentración del ADN purificado

Tabla N°02: Pureza, calidad y concentración del ADN plasmídico purificado

I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
III MATERIALES Y MÉTODOS	8
IV RESULTADOS	36
V DISCUSIÓN	43
VI CONCLUSIONES	47
VII RECOMENDACIONES	48
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
IX ANEXOS	

RESUMEN

Myrciaria dubia "camu camu", es considerado uno de los principales recursos de la diversidad biológica amazónica, por presentar altas concentraciones de vitamina C. Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios genéticos y moleculares que determinen la producción de esta vitamina. Por consiguiente, el objetivo del siguiente trabajo fue determinar la expresión de genes que codifican las enzimas: GDP-L-Galactosa Fosforilasa, L-Galactosa Deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu".

El material biológico fue obtenido de la Colección Nacional de Germoplasma del INIA. La purificación del ARN total de los frutos se llevó a cabo con un protocolo estandarizado. El ADNc se obtuvo mediante transcripción reversa empleando cebadores oligo d(T)₁₆. Los amplicones de interés se obtuvieron mediante un PCR con cebadores degenerados. Los productos de PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa, clonados y secuenciados con métodos estándares. En base a las secuencias específicas de cada gen se diseñaron cebadores específicos para el PCR en tiempo real. En la evaluación del nivel de expresión de los genes por PCR en tiempo real se empleó como gen de referencia el Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Los análisis se realizaron con los softwares LinRegPCR y Bestkeeper y la plataforma de Microsoft Office Excel 2007.

Los resultados de concentración promedio del ARN total fueron de 174.4 ± 76.63 ug/ml con ratios de calidad A_{260}/A_{280} de 1.9 ± 0.1 . Además, la relación de A_{260}/A_{230} dio un promedio de 4.0 ± 0.2 indicando la pureza de las muestras analizadas. El análisis electroforético muestra la integridad del ARN por presencia de bandas de ARN ribosomal 28S y 18S con intensidades similares. La amplificación del ADNc con los cebadores degenerados nos permitió obtener los productos esperados de 388 pb para el gen GDP-L- Galactosa Fosforilasa, 783 pb para el gen L- Galactosa Deshidrogenasa y 921 pb para el gen L -Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa. Respecto a la expresión relativa, el gen GGF mostró el nivel de expresión relativa más alta (aproximadamente 7 veces más alto que los otros). En contraste, el gen GDH mostró el nivel de expresión relativa más bajo (expresión relativa 0.69). El gen GLDH presentó un nivel de expresión de 2.10. Lo que demuestra que estos genes codantes (GDP-L-Galactosa Fosforilasa, L-Galactosa Deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa), involucrados en la biosíntesis de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu" muestran diferentes niveles de expresión génica.

I INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia, camu camu, es una especie nativa de la cuenca amazónica, su fruto tiene el más alto nivel de ácido L-ascórbico (vitamina C) que puede llegar según su procedencia hasta 3000 mg/100 g de pulpa, (Flores, 1997; Maeda y Andrade, 2003; y Villachica, 1996).

La vitamina C, es considerada de gran importancia para el hombre como precursor en la síntesis de hormonas y colágeno. Además, posee excelentes propiedades antioxidativas (Davey y colaboradores, 2000). Sin embargo, en las plantas, induce el crecimiento de la pared celular y es necesario para la maduración de los frutos (Pignocchi y Foyer, 2003). Participa también en respuesta a fitopatógenos, hormonas, florecimiento, senescencia, resistencia al estrés ambiental, radiación ultravioleta, altas temperaturas y a la alta intensidad luminosa (Barth y colaboradores, 2006; Conklin y Barth, 2004; Gao y Zhang, 2008).

La vía de Smirnoff-Wheeler (Wheeler y colaboradores, 1998), representa la principal ruta para la biosíntesis de vitamina C en plantas, tal como lo muestran diversos estudios genéticos y bioquímicos (Smirnoff y colaboradores, 2001). Numerosas

investigaciones han reportado el potencial de esta ruta para explotar biotecnológicamente el incremento de vitamina C (Zhang y colaboradores, 2007).

Consideramos que al estudiar la expresión de los genes de la ruta biosintética de la vitamina C en el “camu camu”, nos permitirá sentar las bases científicas para el desarrollo de programas de mejoramiento genético y biotecnológicos en esta especie, con beneficios potenciales sobre todo para los consumidores y productores al incrementar la producción de vitamina C. Por tal motivo, la presente tesis presenta los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de los genes que codifican las enzimas *GDP-L-Galactosa Fosforilasa*, *L-Galactosa Deshidrogenasa* y *L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa* de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu camu”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar el ARN total a partir de la pulpa de frutos de *Myrciaria dubia* “camu camu”.
- Sintetizar el ADN complementario a partir del ARN total obtenido de frutos de *Myrciaria dubia* “camu camu”.

- Amplificar mediante PCR con cebadores degenerados y clonar segmentos de genes que codifican las enzimas *GDP-L-Galactosa Fosforilasa*, *L- Galactosa Deshidrogenasa* y *L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa* de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu".
- Determinar el nivel de expresión de los genes codantes de enzimas *GDP-L-Galactosa Fosforilasa*, *L- Galactosa Deshidrogenasa* y *L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa* de la vía biosintética de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu".

II REVISIÓN DE LITERATURA

Wheeler y colaboradores (1998), propusieron una ruta para la biosíntesis de vitamina C en plantas, cuyos intermediarios metabólicos son: GDP-D-manosa, GDP-L-Galactosa, L-Galactosa-1-fosfato y L-Galactono-1,4-Lactona, este último, se convierte en vitamina C por acción de la enzima L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa.

Smirnoff (2000), sostiene que la vitamina C es sintetizada a partir de la GDP-D-manosa por la vía de la L-Galactono y el último paso es catalizado por la L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa, esta enzima está en la membrana mitocondrial interna y emplea citocromo C como aceptor de electrones.

Mieda y colaboradores(2004), estudiaron las propiedades de la enzima L-Galactosa Deshidrogenasa obtenida de las hojas de *Spinaceaoleracea* "espinaca". Asimismo, clonaron el ADNc que codifica esta enzima, que está constituida por 322 residuos de aminoácidos. Los análisis de Northernblot realizados sugieren que el gen se expresa en diferentes órganos de la planta.

Pateraki y colaboradores(2004), clonaron y caracterizaron la secuencia del ADNc codante de la enzima L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa, aislado de frutos

de *Cucumis melo*, "melón". Mediante Southern blot muestran que el gen tiene una sola copia. También, lograron detectar la acumulación de transcritos del gen en todos los tejidos de la planta.

Linster y colaboradores(2007), identificaron la última enzima de la ruta biosintética de vitamina C en plantas, la GDP-L-Galactosa Fosforilasa. Esta enzima cataliza la primera reacción de la vía Smirnoff-Wheeler, proporcionando a las plantas los niveles apropiados de vitamina C.

Yabuta y colaboradores(2007), estudiaron las relaciones entre la fotosíntesis y los niveles de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de vitamina C. En este trabajo, hicieron crecer plantas de *Arabidopsis thaliana* con 16 horas de fotoperiodo diario y al someterlas a la oscuridad por 72 horas, observaron que el contenido de vitamina C disminuyó en un 91%, mientras que las plantas expuestas (en el mismo periodo) a luz continua tienen hasta 171% más de vitamina C.

Linster y colaboradores (2008), sostienen que en *Arabidopsis thaliana*, el gen GDP-L-Galactosa Fosforilasa, codifica la enzima que cataliza la conversión de GDP-L-Galactosa a L-Galactosa 1-fosfato, un paso en la ruta de Smirnoff-Wheeler para la biosíntesis de vitamina C en las plantas. Además, demuestran que el gen *At5g55120* que codifica una enzima con secuencia idéntica a la del gen GDP-L-Galactosa

Fosforilasa exhibe especificidad de sustrato y características enzimáticas similares a la del gen GDP-L-Galactosa Fosforilasa, sugiriendo que también puede participar en la síntesis de la vitamina

Müller (2008), menciona que la expresión del gen GDP-L-Galactosa Fosforilasa a nivel de ARNm y proteínas ocurre en todas las etapas de desarrollo de *Arabidopsisthaliana*. Además, manifiesta que las plantas expuestas a la luz incrementan el nivel del ARNm de este gen, encontrando niveles más altos de expresión en los tejidos verdes que en la raíz.

Badejo y colaboradores(2009), clonaron algunos de los genes involucrados en la vía de Smirnoff-Wheeler en *Malpighia glabra* "acerola", una planta que contiene enormes cantidades de vitamina C y examinaron sus patrones de expresión. El contenido de vitamina C en hojas de "acerola" fue 8 veces más que en las hojas de *Arabidopsisthaliana*.

Bulley y colaboradores (2009), investigaron las bases de la variación de los niveles de vitamina C en tres genotipos de *Actinidiasp.* (*A. eriantha*, *A. chinensis*, y *A. deliciosa*) "kiwi". Entre la cuarta y sexta semana después de la floración encontrando de 3 - 16 veces más vitamina de C en *A. eriantha* que en los otros

genotipos, relacionándose una mayor expresión de los genes GDP-Mannosa-3',5'-Epimerasa y GDP-L-Galactosa Fosforilasa.

Li y colaboradores(2010), investigaron la capacidad biosintética y la expresión del ARNm de los genes involucrados en la biosíntesis vitamina C en la fruta de *Actinidia deliciosa* "kiwi". Monitorearon la localización de la vitamina C, durante el desarrollo del fruto en diferentes tejidos. Observaron una alta cantidad de vitamina C en el peciolo de las hojas y frutos, aunque el nivel de expresión de la mayoría de los genes fue mínima. La expresión de los genes claves muestran patrones similares de cambio, excepto para la L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa y L-Galactosa-1-Fosfato Fosfatasa. La expresión de estos genes puede ser detectado en el floema o tallo así como en el peciolo de hojas y frutas.

Li y colaboradores(2010), determinaron los niveles de acumulación de vitamina C y analizaron los patrones de expresión de los genes involucrados en la síntesis de las vías de L-galactosa y reciclaje en hojas de diferentes edades de *Malusdomestica* "manzana" encontrando que el contenido de vitamina C aumenta con el desarrollo de la hoja, alcanzando el nivel más alto en hojas con 20 días de edad y las hojas maduras también tienen la capacidad para la síntesis de vitamina C con altos niveles de expresión y actividad de las enzimas L-Galactosa Deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa.

III MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Materiales

1.1.1 Material Biológico

Frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu camu"

1.1.2 Materiales de Laboratorio

Reactivos

- Acetato de sodio (Applichem)
- Acetato de potasio (Merck)
- Ácido acético glacial (Sigma Aldrich)
- Ácido bórico (Merck)
- Alcohol isoamílico (Applichem)
- Agar agar (Merck)
- Agarosa (Applichem)
- Ampicilina (Roche)
- Azul de bromofenol (Merck)
- β -mercaptoetanol (Applichem)
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio - CTAB (Applichem)
- Bromuro de etidio (Merck)
- Caldo de cultivo Luria Bertani - Caldo LB (Invitrogen)
- Cebadoresdegenerados (Invitrogen)

- Cebadores específicos (Invitrogen)
- Células Competentes One Shot Max Efficiency DH5α (Invitrogen)
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Applichem)
- Cloruro de litio - LiCl (Applichem)
- Cloruro de sodio - NaCl (Applichem)
- Ácido etilendiaminotetraacético - EDTA (Applichem)
- Etanol absoluto (Merck)
- Etanol al 70% (Alkofarma)
- Dietilpirocarbonato - DEPC (Sigma Aldrich)
- Fenol:cloroformo (Applichem)
- Formaldehido 37% (Applichem)
- Formamida (Applied Biosystems)
- Glicerol al 87% (Applichem)
- Hidróxido de sodio (Applichem)
- Isopropanol (Merck)
- Kit de Clonación TOPO[®] TA (Invitrogen)
- Kit Gene Amp RNA PCR (Applied Biosystems)
- Kit para PCR en tiempo real con-SYBR Green (Applied Biosystems)
- Kit de Secuenciamiento Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems)
- Turbo[™]ADNasa (Applied Biosystems)

- Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas)
- Marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen)
- Marcador de peso molecular 25pb (Invitrogen)
- Marcador de DNA fago λ / Hind III (Fermentas)
- Medio de cultivo Luria Bertani - Medio LB (Invitrogen)
- Medio de cultivo súper óptimo - Medio SOC (Invitrogen)
- Ácido morfolino propano sulfónico - MOPS (Applichem)
- ARNt de Levadura (Ambion)
- ARNasa A (Invitrogen)
- Sacarosa (Calbichem)
- Dodecil sulfato de sodio - SDS (Applichem)
- Tris (Applichem)
- Tris-HCl (Applichem)
- 5 bromo,4 cloro, 3-indolil, β -D galactopiranosido- X- gal (Applichem)

Buffers y Soluciones

- Buffer de extracción de ARN (Tris-HCl 200 mM pH: 8.2, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, β -Mercaptoetanol 1%).
- Buffer MOPS 5X (MOPS 0.2 M pH: 7.0, Acetato de sodio 0.05 M, EDTA 0.005 M).

- Buffer para muestras de ARN (Formamida 10ml, Formaldehido 37% 3.5 ml, Buffer MOPS 5X 2ml).
- Buffer de siembra para ARN (Glicerol 50%, EDTA 1 mM, Azul de bromofenol 0.4%).
- Buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
- Buffer TBE 1X (Tris 0.089 M, Acido bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M).
- Buffer de siembra para DNA (Sacarosa 0.7g; Azul de bromofenol, buffer TE 0.5%).
- Solución I: (Tris-HCl 25 mM pH8.0, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM).
- Solución II: (NaOH 0.2 N, SDS 1%).
- Solución III: (Acetato de potasio 3 M pH: 4.8, Ácido acético glacial 11.5%).

Equipos

- Analizador genético (AppliedBiosystems, modelo 3130xl).
- Autoclave (Yamoto SM 510)
- Agitador magnético (Thermoscientific, modelo Max Q 4450)
- Balanza analítica (Sartorius CP2245)
- Baño María (Barnstead)
- Cabina de flujo laminar (Labconoclass II type A2)

- Cámara electroforética (Bio-Rad, modelo 96)
- Cámara fotográfica (Panasonic)
- Centrifuga (Hettich)
- Computadora (Acer)
- Congeladora (Friolux)
- Destilador de agua (Barnstead)
- Espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 6)
- Estufa (Ecocell)
- Horno microondas (Samsung)
- Impresora del sistema de fotoregistro (Mitsubishi)
- Impresora (Canon pixma MP190)
- Mini centrifuga (Denville)
- Potenciómetro (Metrohm 744)
- Purificador de agua (Barnstead; modelo Mayor A 1/8 UIT)
- Refrigeradora (Coldex)
- Sistema de fotoregistro (BioDocAnalyze)
- Temociclador-PCR Convencional (Eppendorf)
- Termociclador-PCR en Tiempo Real (Eppendorfeprgradient S)
- Termo block (Labnet)
- Vórtex (Genie 2)

Materiales de Vidrio

- Probetas graduadas de 50, 100, 500 y 1000 ml
- Vasos de precipitado de 500 y 1000 ml
- Frascos tapa rosca de 50,100, 200, 500 y 1000 ml
- Tubos de ensayo
- Placas Petri

Materiales de Plástico

- Micropipetas de 100-1000, 20-200, 5-50, 0,5-10, 0,1-2 μ l
- Microtubos de 1.5, 2.0 ml
- Puntas para micropipetas de 100-1000, 20-200, 0.5-10 μ l
- Tubos para centrífuga de 50 y 15 ml
- Pizetas

Otros Materiales

- Mandil
- Gorro
- Gafas
- Guantes
- Papel secante

- Papel aluminio
- Parafilm
- Cuaderno de apuntes
- Calculadora
- Etiquetas
- Porta microtubos
- Cajas de cartón
- Marcadores
- Tijeras
- Lapicero
- Corrector
- Cinta masking tape
- Detergente
- Hipoclorito de sodio 0.5%
- Desinfectante
- Gradilla
- Hojas A-4
- Perforador
- Recipiente de plástico
- Folders de manila

1.2 Metodología

1.2.1 Área de Estudio

Este trabajo se realizó en la ciudad de Iquitos, capital del departamento de Loreto, provincia de Maynas. Según datos del SENAMHI, esta ciudad presenta una humedad relativa promedio anual máximo de 97.7 %, una temperatura promedio anual máximo de 30.7°C y se encuentra a una altitud de 124.4 m.s.n.m. Sus coordenadas geográficas son: latitud sur 03° 45'05.865" y latitud oeste 73° 14'40.970" la cual está situada en la parte nor-oriental del Perú.

El muestreo de los frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu" se realizó en el campo Experimental El Dorado de la Estación Experimental Agraria San Roque del INIA, ubicado a la altura del Km 25½ de la carretera Iquitos – Nauta, donde se encuentra instalada la Colección Nacional de Germoplasma de "camu camu", a 03° 57' 17" LS y 73° 24' 55" LW con una altitud de 112 msnm, el cual se encuentra constituido por 43 muestras representativas de la variabilidad genética de esta especie; pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas) (ver Figura N°01 en anexo).

El trabajo experimental se realizó en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), ubicado en el pasaje los Paujiles S/N AAHH Nuevo San Lorenzo, situado en el Km 2 de la carretera Abelardo Quiñones de la ciudad de Iquitos, distrito de San Juan Bautista.

1.2.2 Colecta, Transporte y Almacenamiento de frutos

El muestreo se realizó en el mes de abril entre las 8-10 horas de la mañana. Los frutos colectados se pusieron en bolsas plásticas debidamente rotuladas y fueron transportados en refrigeración (termos con hielo) al laboratorio de la Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA, donde fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

1.2.3 Protocolo de Extracción de ARN a partir de frutos

Se empleó el protocolo propuesto por Lima (2006), con ciertas modificaciones, que consistió en cambiar las condiciones de centrifugación (15000 rpm x 05,10, y 15 min en lugar de 9000 rpm x 25 y 40 min). Además, los periodos de incubación de las muestras con LiCl, ARNt de levadura y acetato de sodio fueron de seis horas en lugar de 12 horas. El protocolo modificado constó de los siguientes

pasos: se lavaron las muestras con agua tratada con DEPC, seguidamente en un mortero estéril se pesaron 3 gramos de pulpa del fruto, el cual se trituró completamente por 3 a 5 min, añadiendo gradualmente 20 ml del buffer de extracción de ARN precalentado a 65 °C más 20 µl de β-mercaptoetanol. El homogenizado obtenido se transfirió a microtubos de 1.5 ml, se mezcló en el vórtex por 30 seg e incubó en baño María a 65 °C por 1 hora, homogenizando en el vórtex por 30 seg cada 15 min. Luego, a cada microtubo se añadió 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente en el vórtex por 30 seg y centrifugó a 15000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa obtenida se puso en otro microtubo con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente en el vórtex por 30 seg y centrifugó a 15000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro microtubo, se añadió 300 µl de LiCl 10 M por cada 700 µl de sobrenadante (concentración final de LiCl 3 M), también, se añadió ARNt de levadura (concentración final 40 µg/ml), los componentes se homogenizaron en el vórtex por 10 seg e incubaron a -20 °C por 6 horas. Luego se centrifugó a 15000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, al precipitado de ARN total se añadió 100 µl de SDS al 0.5% se incubó en baño maría a 55 °C por 15 min para disolver el ARN precipitado. Luego se añadió 100 µl de

fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente en el vórtex por 30 seg y centrifugó a 15000 rpm por 10 min. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo, se añadió igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se homogenizó completamente en el vórtex y centrifugó a 15000 rpm por 10 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo, se agregó 10 µl de acetato de sodio 3 M pH: 5.2 por cada 90 µl de sobrenadante (concentración final de acetato de sodio 0.3 M) y tres volúmenes de etanol absoluto. Los componentes se mezclaron en el vórtex, se centrifugó brevemente a 1500 rpm por 30 seg e incubó a -20 °C por 6 horas. Posteriormente, se centrifugó a 15000 rpm por 15 min, el sobrenadante se descartó y el precipitado de ARN total se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 15000 rpm por 5 min, después de descartar el sobrenadante, los microtubos se secaron a temperatura ambiente, finalmente el precipitado de ARN total se disolvió con 89 µl de agua tratada con DEPC y se almacenó a -20 °C.

1.2.4 Digestión del ADN Contaminante en Muestras de ARN

La eliminación del ADN contaminante se realizó de acuerdo a las instrucciones del Kit TurboTMDNase (AppliedBiosystems). El cual, consistió en agregar a la solución de ARN total 10 µl del buffer 10X

TURBO DNase y 1 μl de la enzima TURBO™ DNase (2U/ μl). Los componentes se mezclaron suavemente en el vórtex por 10 seg e incubó a 37 °C por 30 min. Se agregó 100 μl Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Los componentes se homogenizaron en el vórtex y se centrifugó a 15000 rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un microtubo, se añadió 100 μl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó en el vórtex y centrifugó a 15000 rpm por 5 min. Luego la fase acuosa se transfirió a otro microtubo, se adicionó 10 μl de acetato de sodio 3 M pH: 5.2 por cada 90 μl de sobrenadante (concentración final de acetato de sodio 0.3 M) y tres volúmenes de etanol absoluto estos componentes se homogenizaron en el vórtex e incubó por 6 horas a -20°C. Luego se centrifugó a 15000 rpm por 10 min, seguidamente se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN total precipitado con 500 μl de etanol al 100%. Nuevamente se centrifugó a 15000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante e inmediatamente se volvió a lavar el ARN total precipitado con 500 μl de etanol al 70%, centrifugando bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante, los microtubos se secaron en un termo block con la tapa abierta para asegurarse que el etanol se evapore por completo por un lapso de 10 min. Finalmente, el ARN total precipitado se disolvió añadiendo 50 μl de agua tratada

con DEPC, incubando los microtubos a 37 °C por 20 min, luego el ARN total purificado se almacenó a -20 °C para posteriores aplicaciones.

1.2.5 Determinación de la Calidad y la Cantidad del ARN

Para verificar la calidad y la cantidad de ARN extraído se emplearon dos métodos:

1.2.5.1 Método Electroforético

En un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 75 µg/ml se sembró 10 µl del ARN total purificado. La electroforesis se realizó con buffer MOPS 1X a 75 voltios por 60 min. Seguidamente para hacer una evaluación del corrido electroforético se tomaron fotos del gel con el Sistema de FotoregistroBioDocAnalyze.

1.2.5.2 Método Espectrofotométrico

Se realizó de acuerdo a Sambrook y colaboradores (1989) empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 6). Para ello, las muestras fueron diluidas 50 veces (20 µl de ARN purificado + 980 µl de buffer TE), utilizando como solución blanco 1 ml de buffer TE. El ensayo consistió en determinar la absorbancia de 200 a 860nm, registrándose los datos de absorbancia a 260 y 280 nm. Para el cálculo del ratio de

calidad se consideró la proporción A_{260nm}/A_{280nm} y para determinar la concentración del ARN total se empleó la ecuación:

$$\text{ARN } (\mu\text{g/ml}) = A_{260nm} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 50$$

1.2.6 Diseño de Cebadores Degenerados

Debido a que las secuencias de los genes de interés no están disponibles en los bancos de genes de libre acceso, se optó por diseñar cebadores degenerados. Para ello, se buscó en el Gen Bank del NCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), las secuencias de genes homólogos [GDP-L-Galactosa Fosforilasa (GGF), L-Galactosa Deshidrogenasa (GDH) y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa (GLDH)] que han sido reportadas de otras especies de plantas. Estas secuencias múltiples fueron alineadas con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Seguidamente, para identificar las secuencias más similares se realizó un análisis de filogenia molecular empleando el método de Neighbourjoining, formándose varios grupos de secuencias de acuerdo a sus similitud. La edición del alineamiento múltiple se realizó con el programa Jalview. Cada grupo de secuencias similares fueron introducidas en el programa SCPrimer (<http://scprimer.cpmc.columbia.edu/SCPrimerApp.cgi>) para el diseño de los cebadores degenerados. Una vez diseñados

los cebadores, estos se alinearon con las secuencias elegidas para visualizar las regiones en las que hibridaban, para ello se empleó la herramienta de alineamiento MUSCLE(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Además, con el programa OligoAnalyzer(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) se realizaron diversos análisis (formación de estructuras secundarias, formación de homodímeros y heterodímeros) de los cebadores degenerados. También se empleó el programa MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) para conocer si los amplicones forman estructuras secundarias en las regiones de hibridación de los cebadores, lo cual podría imposibilitar la amplificación mediante el PCR. Finalmente, se realizó un análisis BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para conocer la especificidad de los cebadores degenerados.

1.2.7 Reacción de Transcripción Reversa para amplificar ADNc

Para este experimento se utilizó el Kit Gene Amp[®] RNA PCR Core, (AppliedBiosystems). Para lo cual, el máster mix consistió de los siguientes componentes: Buffer de PCR II 1X, MgCl₂ 5 mM, Mix de dNTPs 5 mM, Inhibidor de RNase 1 U/μl, Oligod(T)₁₆ 2.5 μM, enzima Transcriptasa Reversa MuLV 2.5 U/μl, ARN 1.5 μg y agua DEPC c.s.p

20 μ l. Los componentes se mezclaron en el vórtex y centrifugó brevemente. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 42 °C por 60 min, 90 °C por 5 min y 4 °C por tiempo indefinido. Finalmente, el ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

1.2.8 Amplificación del ADNc con los Cebadores Degenerados

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (Eppendorfepgradient S); pero fue necesario estandarizar las condiciones de amplificación para cada gen. Para amplificar el gen GDP-L-Galactosa Fosforilasa se empleó Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 2.5 mM, Mix de dNTPs 0.8 mM, cebadores degenerados Forward y Reverse 1 μ M c/u, Taq polimerasa Roche 0.125 U, ADNc 2 μ l y H₂O ultrapura c.s.p. 20 μ l. Los ciclos programados en el termociclador fueron: Una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 45 seg, 53.2 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Para la amplificación del gen L-Galactosa Deshidrogenasase empleó Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 3.0 mM, Mix de dNTPs 0.8 mM, cebadores degenerados Forward y Reverse 1 μ M c/u, Taq DNA Pool Roche 0.125 U, ADNc 1 μ l y H₂O ultrapura c.s.p. 20 μ l. Los ciclos programados en

el termociclador fueron: Desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 53.8 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Finalmente para amplificar el gen L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasase empleó Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 3.5 mM, Mix de dNTPs 0.2 mM, cebadores degenerados Forward y Reverse 0.5 µM de c/u, Taq DNA Pool Roche 0.15 U, ADNc 1 µl y H₂O c.s.p. 20 µl. Los ciclos programados en el termociclador fueron: Una desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55.5 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min.

1.2.9 Purificación de amplicones a partir de geles de agarosa

Después de haber corroborado que los amplicones son del tamaño esperado por comparación con el marcador de peso molecular, se procedió a cortar el área del gel que contenía la banda de ADN. El segmento del gel con ADN (amplicón) se puso en un microtubo de 1.5 ml y los amplicones se purificaron de acuerdo al PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). Para ello, por cada 400 mg de gel se añadió 1.2 ml del Buffer de Solubilización de

Gel, se incubó a 50 °C por 15 min en el termo block, mezclando por inversión cada 3 min hasta que el gel se disuelva completamente. Luego se añadió 400 µl de isopropanol, se homogenizó en el vórtex. La mezcla, se transfirió a la mini columna PureLink™ Clean-up Spin y se centrifugó a 10300 rpm x 1 min, descartando el filtrado. La mini columna se puso sobre otro microtubo colector, se añadió 700 µl de Buffer de Lavado (W1), se centrifugó a 10300 rpm x 1 min, descartando el filtrado. La mini columna se puso sobre otro microtubo colector y centrifugó a 15000 rpm por 3 min. Luego la mini columna se puso sobre un microtubo de 1.5 ml, se añadió 50 µl de Buffer de Elución (E1) sobre la mini columna e incubó a temperatura ambiente por 5 min, para eluir el amplicón se centrifugó a 10300 rpm por 1 min. El amplicón puro se almacenó a -20 °C.

1.2.9.1 Electroforesis del Producto Purificado

Para verificar la pureza del amplicón se sembró 5 µl en uno de los pocillos del gel de agarosa al 2% con 75 µg/ml de bromuro de etidio y en otro pocillo se sembró el marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. La electroforesis se realizó con buffer TBE 0.5X a 85 voltios por 60 min. El gel fue fotografiado con el sistema de fotoregistro BioDocAnalyze.

1.2.10 Reacción de clonación de los Productos Purificados

La reacción de clonación se llevó a cabo de acuerdo al Kit de Clonación TOPO[®]TA (Invitrogen). Para ello, en un microtubo de 0.2 ml se puso 4 µl del amplicón puro, 1 µl de solución salina (NaCl 1.2 M y MgCl₂ 0.06 M) y 1 µl del vector plasmídico pCR[®] 2.1-TOPO (ver Figura N^o02 en anexo). Los reactivos se mezclaron suavemente, se centrifugó brevemente e incubó a 23 °C por 30 min en un termociclador. Finalmente, los plásmidos recombinantes fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

1.2.11 Transformación en células competentes DH5α[™]-T1^R

Se añadió 4 µl de la reacción de clonación (plásmidos recombinantes) a un vial con una cepa químicamente competente de *Escherichiacoli* del kit de Clonación TOPO[®]TA (Invitrogen), los componentes se mezclaron suavemente. El vial se incubó en hielo por 15 min, luego a 42 °C por 30 seg y finalmente en hielo por 5 min. Luego, al vial con las células transformadas se añadió 250 µl de medio SOC (triptófano 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 Mm y glucosa 20 mM) atemperado a 37 °C, e incubó a 37°C por 1 hora en un agitador horizontal programado a 200 rpm. Después se sembró 10 y 50 µl del cultivo en dos placas petri con

medio LB más 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de X-gal. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C por 12 a 18 horas.

1.2.11.1 Selección de colonias transformadas

Después de incubar las placas, se tomaron con mondadientes de 10 a 12 colonias blancas (ver Figura N°03 en anexo) y se sembraron en tubos conteniendo 10 ml de caldo LB con ampicilina 100 µg/ml. Estos se incubaron a 37°C por 18 horas en agitación constante a 200 rpm.

1.2.11.2 Confirmación de cultivos transformantes por PCR

Para ello, se puso en microtubos de 0.2 ml Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 3.0 mM, dNTPs 0.2 mM, Primer M13 Forward/Reverse 0.05 µM de c/u, Taq Roche 0.125 U, 7µl del cultivo y H₂O c.s.p. 20 µl. Los ciclos programados en el termociclador fueron: Un ciclo de 94 °C por 10 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% mas 75 µg/ml de bromuro de etidio con buffer TBE 0.5X a 85V por 1 hora. Las bandas de ADN se visualizaron y fotografiaron con el sistema de fotoregistroBioDocAnalyze.

1.2.12 Purificación de Plásmidos a Mediana Escala

Después de confirmar que cultivos bacterianos presentaron los plásmidos recombinantes se procedió a purificarlos. Para ello, los cultivos se transfirieron en tubos para centrifuga de 15 ml, se centrifugó a 4000 rpm por 20 min y descartó el sobrenadante. El precipitado bacteriano se resuspendió con 300 μ l de Solución I fría (4°C) y transfirió a un microtubo, luego se añadió 400 μ l de Solución II, se homogenizó por inversión del microtubo e incubó en hielo por 5 min. Después se añadió 300 μ l de Solución III fría, se homogenizó en el vórtex e incubó en hielo por 5 min. Luego se centrifugó a 11200 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo, al cual se añadió igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y homogenizó en el vórtex. Luego se centrifugó a 11200 rpm por 5 min, el sobrenadante se puso en otro microtubo y adicionó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en el vórtex y centrifugó a 11200 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro microtubo y añadió 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Después se centrifugó a 11200 rpm por 5 min, descartó el sobrenadante y el precipitado de plásmidos se lavó con etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 11200 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante,

dejando secar el precipitado de plásmidos a temperatura ambiente, poniendo los microtubos invertidos sobre papel toalla por 10 min. Para disolver los plásmidos se añadió 50 μ l de buffer TE (pH 8.0). Luego, para eliminar el ARN contaminante, se añadió a la solución de plásmidos 2 μ l de ARNasa A e incubó a 40 °C por 20 min. Seguidamente, se añadió igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando a 11200 rpm por 5 min, el sobrenadante obtenido se puso en otro microtubo, se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto e incubó a temperatura ambiente por 2 min, luego se centrifugó a 11200 rpm por 5 min, eliminó el sobrenadante y secó el precipitado de plásmidos a temperatura ambiente, con los microtubos invertidos por 10 min sobre papel toalla. Finalmente, los plásmidos se disolvieron con 50 μ l de buffer TE (pH 8.0) y almacenó a -20 °C hasta su uso.

1.2.12.1 Determinación de la calidad y cantidad del ADN plasmídico

1.2.12.1.1 Método Electroforético

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio 75 μ g/ml en uno de sus pocillos se sembró 5 μ l de la solución de plásmidos purificados y en otro pocillo se sembró 2.5 μ l del

marcador de DNA del fago λ /Hind III (Fermentas). La electroforesis se realizó con buffer TBE 0.5X a 75 voltios por 60 min. Finalizado el proceso de electroforesis se fotografió el gel con el Sistema de FotoregistroBioDocAnalyze.

1.2.12.1.2 Método Espectrofotométrico

Se realizó de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). Para ello, una alícuota de la solución de plásmidos se diluyó cien veces (10 μ l de muestra + 990 μ l de Buffer TE). La muestra diluida se transfirió a una cubeta de cuarzo y midió su absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 6). Para el cálculo del ratio de calidad se empleó la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y para determinar la concentración del ADN plasmídico se empleó la relación: $[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Factor de dilución}$. Además, se midió la relación $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ para verificar la presencia de otros contaminantes en las muestras.

1.2.13 Reacción de Secuenciamiento

Se realizó con el Kit de Secuenciamiento Big Dye Terminator V3.1 (AppliedBiosystems) para lo cual, se empleó el Mix de la reacción Terminator Ready v1.1 4.0 µl, Primer M13 Forward ó Primer M13 Reverse 3.2 pmoles/µl, ADN plasmídico 500 ng y agua c.s.p 10 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 96 °C por 1 min, seguido por 25 ciclos de 96 °C por 1 min, 50 °C por 5 seg, y 60°C por 4 min. Finalizada la reacción estos productos fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

1.2.13.1 Purificación y análisis de los productos de Secuenciamiento

Los 10 µl de los productos de la reacción de secuenciamiento se transfirió a un microtubo de 1.5 ml, se añadió 1 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 1 µl EDTA 125 mM (pH 8.0), se homogenizó y centrifugó brevemente. Seguidamente se añadió 50 µl de etanol absoluto, se homogenizó en el vórtex y centrifugó brevemente. Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min; luego se centrifugó a 15000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante. El precipitado con los productos de la reacción de

secuenciamiento se lavó con 750 µl de etanol al 70%, se mezcló vigorosamente en el vórtex y centrifugó a 15000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y secó el precipitado a 45°C por 10 min. El precipitado se disolvió con 12 µl de Hi-Di Formamida, se homogenizó en el vórtex por 20 seg y centrifugó brevemente. La solución se transfirió a un microtubo de 0.2 ml y en el termociclador se incubó a 95 °C por 5 min y 4 °C por 1 min. Finalmente, la solución de productos del secuenciamiento se puso en una microplaca para realizar el análisis en el Analizador genético 3130XL (AppliedBiosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas con el programa sequencingAnalysis v 5.2 de AppliedBiosystems. Las secuencias generadas finalmente fueron analizadas con el programa Blast para constatar su identidad.

1.2.14 Diseño de Cebadores específicos

Luego de verificar la identidad de la secuencia del amplicón obtenido se procedió a diseñar los cebadores específicos empleando el programa Allele ID 6.0 de Premier Biosoft. Los cebadores seleccionados fueron aquellos que no formaron homo o

heterodímeros, ni estructuras secundarias y su temperatura de fusión se encontraba entre 55 a 60°C.

1.2.15 Reacción de PCR tiempo real para expresión de Genes

Una vez obtenido el ADNc se procedió a realizar la reacción de PCR en tiempo real, para ello se empleó SYBR Green PCR Buffer 1X, MgCl₂ 3.0 mM, Mix de dNTPs 0.8 mM, cebadores Forward/Reverse 0.5 μM, Amplitaq Gold 5 U/μl, Amp Erase UNG 1U/μl, ADNc (diluido 1:5) 2 μl y agua c.s.p 20 μl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorfegradient S⁴) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50 °C por 2 min, 1 ciclo de 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 60°C por 1 min y análisis de la temperatura de fusión que constó de 1 ciclo de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 15 seg y aumento a 95 °C por 15 seg en un periodo de 20 min (ver Figura N° 04 en anexo y Figura N° 05 que muestra el flujograma de trabajo).

1.2.16 Análisis e Interpretación de Datos

Para identificar los genes de referencia se hizo un análisis de su estabilidad de expresión. Esta evaluación se hizo a los genes codantes de actina 1, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y de las tres enzimas de la vía Smirnof-Wheeler con el programa BestKeepert, desarrollado por Pfaffl y colaboradores (2004). La eficiencia de los

primers de PCR en Tiempo Real y el CT de las amplificaciones se determinaron con el programa LinRegPCR, desarrollado por Ruijter y colaboradores (2009). La expresión relativa de los genes se estimó de acuerdo a Simon (2003), con la siguiente ecuación:

$$NE = \frac{(E_{reference})^{CT_{reference}}}{(E_{target})^{CT_{target}}}$$

Donde,

NE: expresión normalizada

E reference: eficiencia del PCR para el gen de referencia

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

CT: Ciclo en el que la fluorescencia supera a la fluorescencia basal

Los análisis estadísticos descriptivos, el ANOVA con prueba HSD de

Tukey y la prueba t de Student se hicieron con el programa PASW v 18

y los gráficos fueron diseñados en Excel de Microsoft Office.

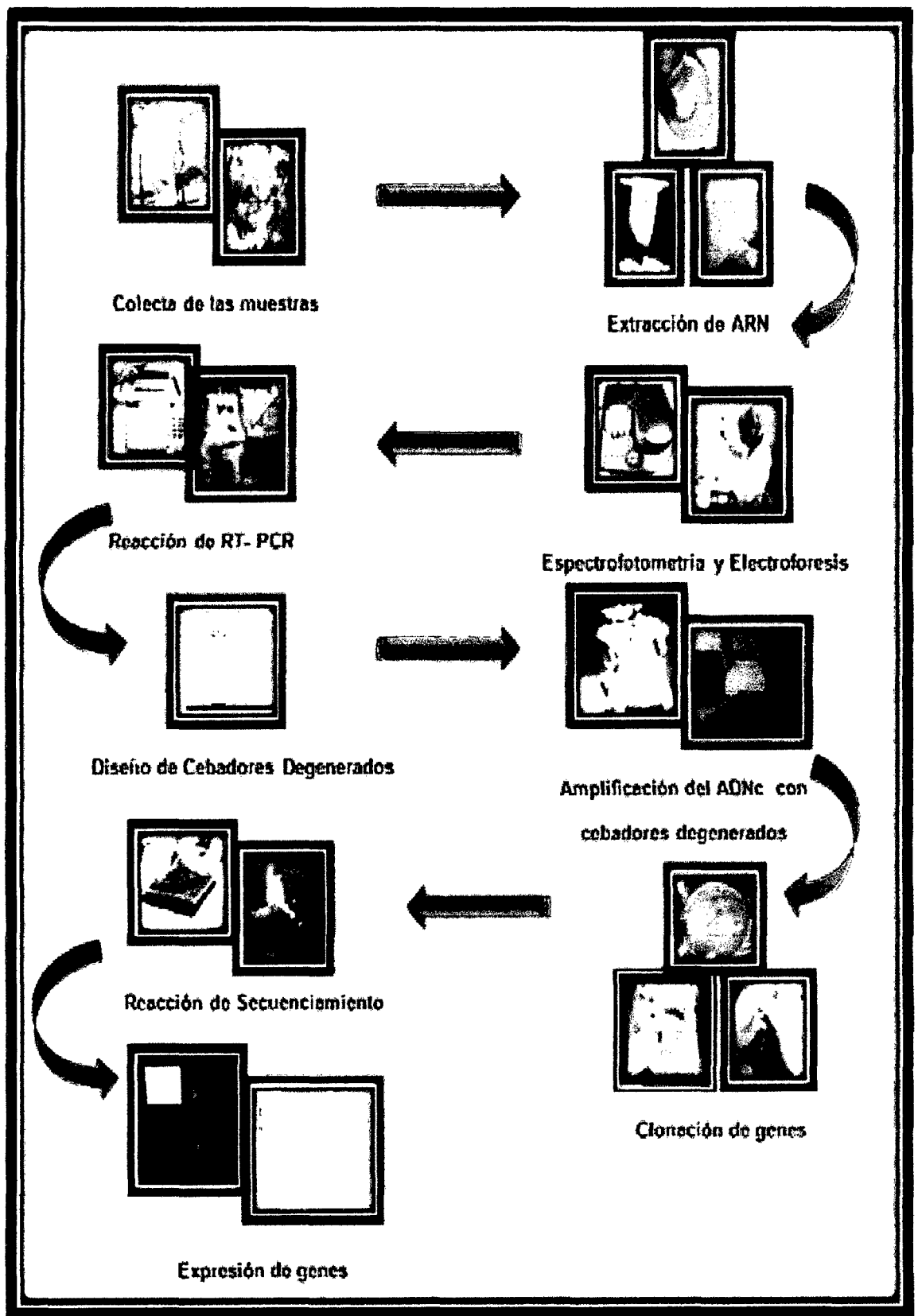


Figura Nº 05: Flujograma de Trabajo

IV RESULTADOS

4.1 Obtención de ARN

El protocolo empleado para purificar el ARN fue apropiado para obtener este ácido nucleico en cantidad y calidad adecuadas. La óptima calidad del ARN purificado se evidencia por la integridad e intensidades similares de las bandas de los ARN ribosomales 28S y 18S (Figura N° 06). Además, es evidente que las muestras no están contaminadas con ADN genómico.

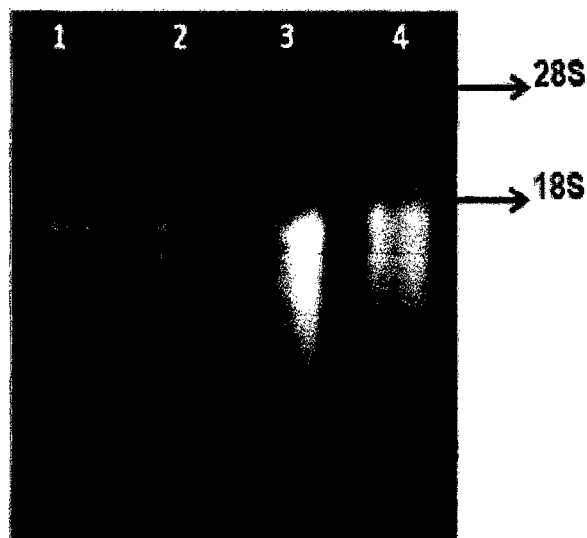


Figura N° 06: Electroforesis del ARN total purificado a partir de frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu".

El análisis espectrofotométrico (Figura N°07) también, nos muestra la alta calidad del ARN total purificado por la presencia de un único pico de máxima

absorbancia a 260nm (longitud de onda en la que absorben los ácidos nucleicos). Cabe resaltar que este análisis se llevó a cabo después de tratar las muestras con ADNasa, lo que permitió eliminar todo el ADN genómico contaminante que puede haberse quedado después de la extracción del ARN; descartando de esta manera la posibilidad de sobrevaloración de la concentración del ARN presente. La concentración promedio del ARN total purificado fue de $174.4 \pm 76.63 \mu\text{g} / \text{ml}$ y el ratio de calidad promedio (A_{260}/A_{280}) fue de 1.9 ± 0.1 , considerándose un ARN de calidad aceptable. Además, la relación A_{260}/A_{230} fue óptima con un valor promedio de 4.0 ± 0.2 (ver Tabla N° 01 en anexo).

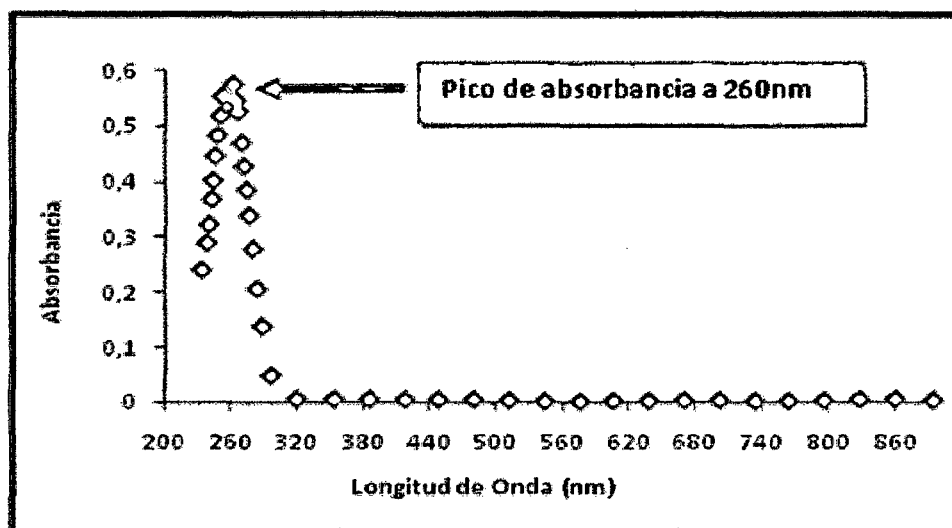


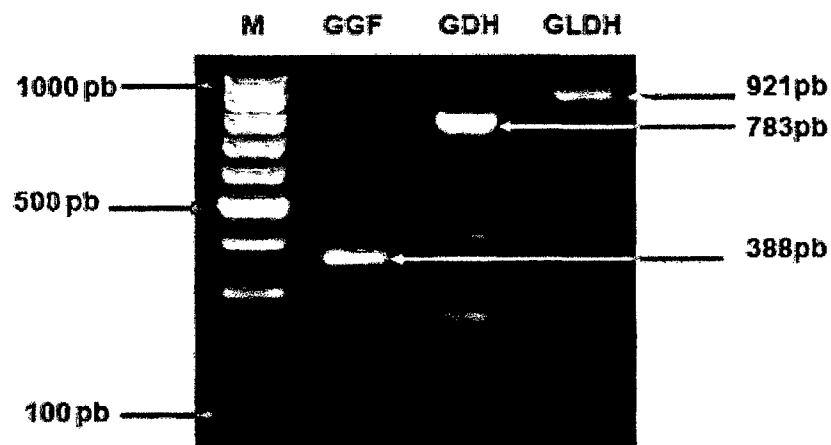
Figura N° 07: Barrido espectrofotométrico (200 – 860 nm) del ARN total purificado a partir de frutos de *Myrciaria dubia* “camu camu”.



381

4.2 Amplificación por RT-PCR del ADNc con los cebadores degenerados

Mediante el PCR con cebadores degenerados se obtuvieron los productos de tamaños esperados para los tres genes analizados. Para el gen GDP-L-Galactosa Fosforilasase obtuvo un amplicón de 388 pares de bases (pb), el fragmento de 783 pb corresponde al gen L-Galactosa Deshidrogenasa y el producto de 921 pb corresponde al gen L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa (Figura N° 08). Estos productos de tamaños esperados fueron purificados, clonados y secuenciados, con los que se verificó que correspondían a segmentos de los genes de interés. Sin embargo, en el gel se puede apreciar productos inespecíficos tanto para el gen GDH y GLDH, pero de menor intensidad que las bandas del tamaño esperado por lo que no interfirieron en el proceso de purificación de los amplicones de interés ni en los resultados esperados.



4.3 Clonación de los productos de PCR y análisis de plásmidos recombinantes

El análisis por PCR de cultivos de *E. coli* transformantes muestra que se lograron clonar los segmentos de los genes en estudio. Los amplicones fueron de 590 pb para el gen GGF, 985 pb para el gen GDH y 1123 pb para el gen GLDH que corresponden al tamaño del segmento del gen más 202 pb del vector (Figura N°09).

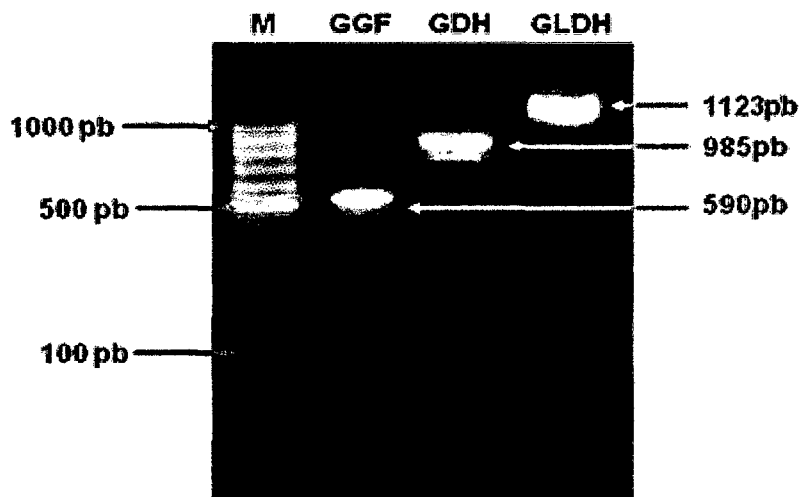


Figura N° 09: Amplicones obtenidos de plásmidos recombinantes de los cultivos bacterianos M: Marcador de peso molecular de 100 – 1000pb.

El ADN plasmídico purificado no presenta contaminación por ADN genómico ni ARN de *E. coli*. En el gel de agarosa se observan múltiples bandas del ADN plasmídico que corresponden a diferentes conformaciones como la circular covalente cerrada (CCC), la forma abierta circular (OC) y múltimerosplasmídicos(Figura N° 10). El ratio de calidad

(A_{260}/A_{280}) promedio fue 1.83 ± 0.06 y la concentración promedio fue $3490 \pm 878.35 \mu\text{g/ml}$ (ver Tabla N° 02 en anexo).

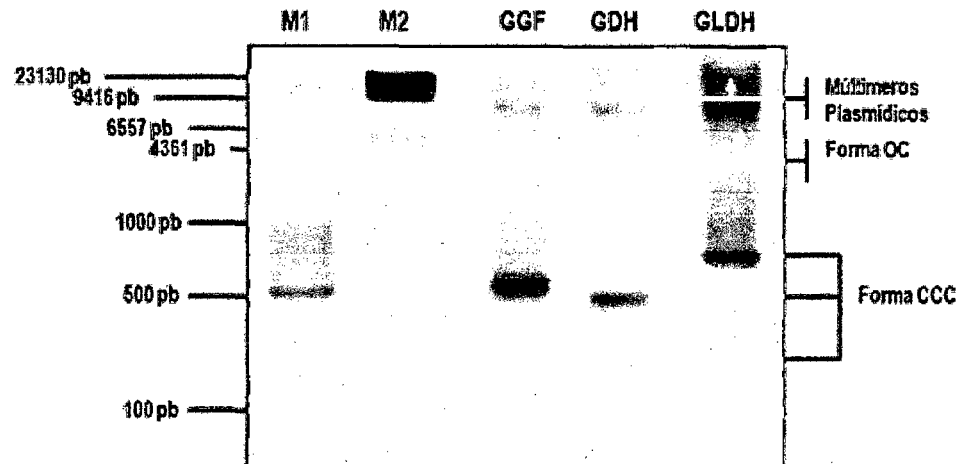


Figura N°10: Corrido electroforético de ADN plasmídico purificado. M1: Marcador de peso molecular = 100 – 1000 pb. M2: Marcador de DNA fago λ / Hind III.

4.4 Expresión de genes

El nivel de expresión de los genes GDP-L-Galactosa Fosforilasa (GGF), L-Galactosa Deshidrogenasa (GDH) y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa (GLDH) de la ruta biosintética de vitamina C en “camu camu” mostró diferencias. El gen GGF mostró el nivel de expresión relativa más alta (aproximadamente 7 veces más alto que los otros). En contraste, el gen GDH mostró el nivel de expresión relativa más bajo (expresión relativa 0.69). El gen GLDH presentó un nivel de expresión de 2.10 (Figura N°11). Cabe

mencionar que para estos análisis se empleó como gen de referencia al Gliceraldehido-3-Fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que mostró mayor estabilidad de expresión. Para corroborar la identidad y especificidad de los amplicones de los genes GGF, GDH, GLDH y GAPDH obtenidos mediante PCR en tiempo real, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura N° 12).

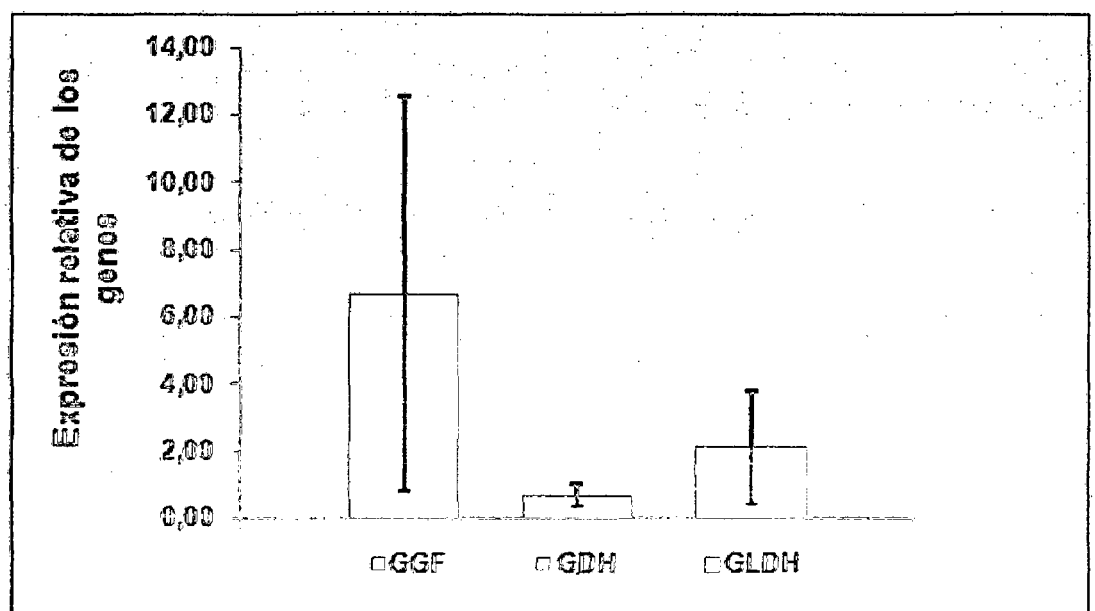


Figura N°11: Niveles relativos de expresión de los genes GGF, GDH y GLDH de la ruta biosintética de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu".

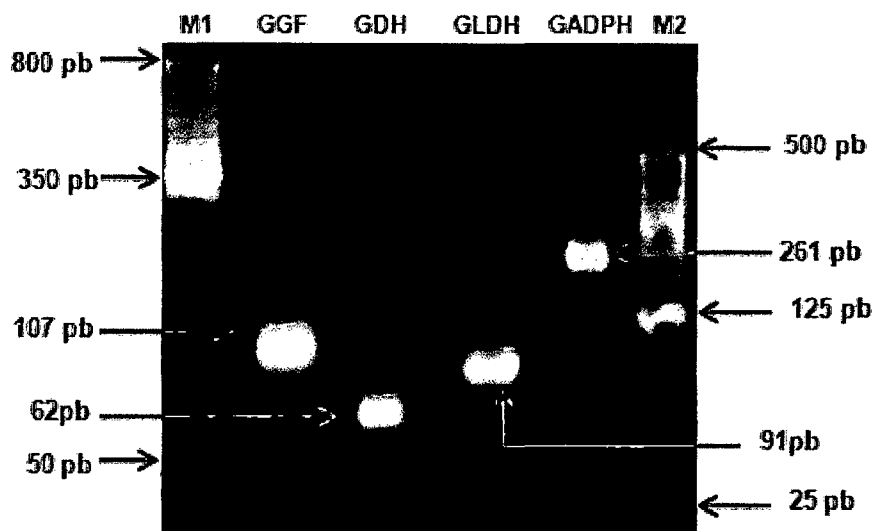


Figura Nº 12: Amplicones de los genes codantes de enzimas de la ruta biosintética de vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu camu" M1: Marcador de peso molecular= 50 pb, M2: Marcador de peso molecular =25pb, GGF: 107 pb, GDH: 62 pb, GLDH: 62 pb, GLDH: 91 pb y GAPDH: 261 pb.

V DISCUSION

La purificación del ARN es la base en los estudios de expresión genética; pues trabajar con un ARN de baja calidad puede comprometer los resultados experimentales con aplicaciones posteriores que a menudo pueden demandarnos más tiempo e inversión. En la actualidad, se cuenta con una gran variedad de protocolos para la extracción de ARN; sin embargo, no todos son reproducibles en los distintos laboratorios y especies de plantas (Fleige y Paffl, 2006). Para la estandarización de la purificación de ARN total en pulpa de frutos de “camu camu”, se modificó el protocolo propuesto por Lima (2006), que consistieron en aumentar las velocidades de centrifugación y disminuir los tiempos de almacenamiento de las muestras con cloruro de litio y acetato de sodio. Cabe mencionar que Lima (2006), empleó 5 g de una mezcla de pulpa y cáscara; sin embargo, en este trabajo sólo se empleó 3 gramos de la pulpa del fruto, obteniendo un ARN íntegro, que se evidencia por la intensidad de los ARN ribosomales. Estos resultados contrastan con los de Lima (2006), quienes muestran bandas de ARN ribosomales degradadas.

Los análisis espectrofotométricos de la calidad del ARN total obtenido se encuentran dentro de los estándares establecidos (1.8-2.1). Sin embargo, debido a la falta de publicaciones respecto a la extracción de ARN en *Myrciaria dubia* comparamos nuestros resultados con los obtenidos con Zeng y Yang (2002) quienes extrajeron

ARN de muestras de *Cinnamomum tenuipilum*, obteniendo ratios de calidad muy parecidos a los nuestros (1.8-2.0) e integridad de las bandas ribosomales. Asimismo, Badejo y colaboradores (2009) obtuvieron ARN de buena calidad en frutos de "acerola" empleando el mismo protocolo. Cabe mencionar, que ensayos experimentales, realizados por el equipo de investigación del Laboratorio de Biotecnología del CIRNA, para extraer ARN de la pulpa de "camu camu" con el protocolo de Zeng y Yang (2002) dieron resultados de calidad por debajo de los establecidos. Además, Reidy colaboradores (2006), aislaron ARN a partir de diferentes tejidos de *Vitis vinifera* (baya, hoja, flores y raíces) demostrando que obtuvieron un alto rendimiento y buena calidad. Dicho protocolo aplicado a los frutos de "camu camu" no dieron resultados reproducibles.

Por otro lado, como no se contaba con las secuencias de los genes en estudio, se diseñaron cebadores degenerados a partir de secuencias homólogas de otras especies. Con estos cebadores se amplificaron y clonaron los genes del "camu camu". Una similar aproximación emplearon Badejoy colaboradores (2009) para estudiar la expresión de los genes de la vía Smirnoff-Wheeler en *Malpighia glabra* "acerola", utilizando el ADNc de esta especie para amplificar los respectivos genes. Además, Nishikawa y colaboradores(2003), utilizaron una metodología parecida para el estudio de genes implicados en el metabolismo del ascorbato en plantas de *Brassicaoleraceae* "brócoli" en rutas alternativas para la síntesis de vitamina C.

Asimismo, Imai y colaboradores (2009), en su estudio sobre expresión de genes de la vía de la L- Galactosa durante la maduración del fruto de *Prunus persica* “melocotón” ligaron los fragmentos amplificados de cada uno de los genes involucrados en esta vía en el mismo vector de clonación que empleamos en este estudio, pCR[®] 2.1-TOPO, obteniendo resultados satisfactorios. Sin embargo, los productos de PCR obtenidos por Badejo y colaboradores (2009) y Dowdle y colaboradores (2007) fueron clonados dentro del plásmido vector pGMTEasy para obtener las secuencias respectivas de los genes.

En cuanto a la expresión de los genes existen técnicas moleculares clásicas como la de Northernblot; pero un problema común de esta técnica es la contaminación rápida de la muestra con ARNasas, el tiempo que consume en su desarrollo, el número limitado de muestras que se pueden analizar, la cantidad necesaria de material genético y fiabilidad de la cuantificación. Por estas razones, las técnicas para el estudio comparativo de la expresión génica han avanzado y han sido perfeccionadas; de esta manera el RT-PCR en tiempo real ofrece la oportunidad de cuantificación sensible y precisa de los niveles de ARNm (Fleige y Paffl, 2006).

Este estudio representa el primer reporte que muestra que la vía biosintética de vitamina C, Smirnoff-Wheeler (ver Figura N°13 en anexo), funciona en el fruto del “camu camu”, debido a que se ha detectado la expresión de tres de los seis genes

codantes de enzimas de la vía metabólica. Siendo probablemente la vía más importante para la biosíntesis de vitamina C en esta especie de planta. Respecto al nivel de expresión relativa de los tres genes analizados existe mayor expresión del gen GGF, seguido del gen GLDH y el GDH. En conjunto, los resultados de los estudios mencionados indican que existe correlación positiva entre el nivel de expresión de esos genes y el contenido de ácido ascórbico en los frutos de “camu camu”; afirmación que se corrobora con los análisis realizados por el grupo de investigación del laboratorio de biotecnología del CIRNA, quienes analizaron frutos de “camu camu” con altas y bajas concentraciones de vitamina C, encontrando que a mayor concentración de vitamina C existe mayor expresión relativa de los tres genes (Castro y colaboradores, 2011). Estos resultados concuerdan con los de Badejo y colaboradores (2009), quienes analizaron diversos órganos de “acerola” y encontraron que los ARNs mensajeros que codifican estos genes mostraron correlación con la cantidad de vitamina C producida. También, Melino y colaboradores (2009), demostraron que durante la maduración en frutos de *Vitis vinifera* “uva” existe una correlación positiva entre la acumulación de vitamina C y la expresión de los genes, particularmente del gen GGF; demostrando de esta manera, que a mayor maduración de los frutos el nivel de expresión del gen se va reduciendo.

VI CONCLUSIONES

- Se estableció un método para purificar, a partir de frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu", ARN total en cantidad y calidad apropiadas para estudios de expresión genética.
- Con el método de PCR empleando cebadores degenerados se logró obtener los genes codantes GDP-L-Galactosa Fosforilasa, L-Galactosa Deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa, involucrados en la biosíntesis de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu".
- Los genes codantes GDP-L-Galactosa Fosforilasa, L-Galactosa Deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa, involucrados en la biosíntesis de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* "camu camu" muestran diferentes niveles de expresión génica.

VII RECOMENDACIONES

- Estandarizar protocolos de purificación de ARN de otros tejidos, tales como flor, tallo, raíz y semillas de *Myrciaria dubia* "camu camu".
- Continuar con los trabajos moleculares en esta especie a fin de implementar un programa de mejoramiento genético que permita aumentar la productividad y el contenido de vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu camu".
- Realizar análisis de secuenciamiento a fin de obtener los ADNc completos de los genes implicados en la ruta biosintética de vitamina C.
- Analizar otras rutas alternativas para la biosíntesis de vitamina C a fin de comprender mejor los mecanismos de producción de la vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu camu".

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badejo, A.,Fujiokawa, Y., Esaka, M. (2009).**Gene Expression of Ascorbic Acid Biosynthesis Related Enzymes of the Smirnoff-Wheeler Pathway in acerola (*Malpighiaglabra*). *J. Plant Physiol.* Vol.166: Pág.652-660.
- Barth, C., De Tullio, M., Conklin, P. (2006).**The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence.*J Exp Botanic.* Vol. 57: Pág.1657-1665.
- Blast. (Basic Local Alignment Search Tool) Bethesda: National Library of Medicine; 1966.**Disponible en URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Consultado: 05de abril, 2011.
- Bulley, S.,Rassam, M., Hoser, D., Otto, W., Schüneman, N., Wright, M., Macrae, E.; Gleave, A. &Laing, W. (2009).** Gene Expression Studies in *Kiwifruit* and Gene Over-Expression in *Arabidopsis* Indicates that GDP-L-galactoseguanyltransferase is a Major Control Point of Vitamin C Biosynthesis. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 60: Pág.765-778.
- Castro, J., Cobos, M., Ramírez R., Egoávil, A., Gutierrez, F., Torres, F., Imán, S., Rojas, R., Siguas, M., Córdova, A., Adriánzén, P., Marapara, J. (2011).** Influencia deExpresión genética y actividad calalítica de enzimas de la vía de

Smirnoff-Wheeler en la variación de la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* (HBK) Mac Vaughn "camu camu". Encuentro científico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima – Perú. 2011.

Davey, M., Van Montagu, M., Inze, D., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, J., Strain, J., Favell, D & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Science Food Agric*, Vol 80: Pág. 825-860.

DNA Folding Form.The RNA Institute College of Art and Sciences University of Albany; 1995.Disponible en URL: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>. Consultado: 04de abril, 2011.

Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. & Smirnoff, N. (2007). *The Plant Journal*.Vol. 52, Pág.673-689.

Fleige, S. & Pfaffl, M. (2006).RNA integrity the effect on the real- time q RT- PCR Performance.*Molecular Aspects of Medicine*. Vol. 27: Pág.126-139.

Flores, S. (1997). Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista, *Ed.Tratado de Cooperación Amazónica - Secretaría Pro Tempore*. Pág.105-107.

Gao, Q. & Zhang, L. (2008). Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiologic* Vol. 165: Pág.138-148.

Greene SCPrimer: a rapid comprehensive tool for designing degenerate primers from multiple sequence alignments Center for Infection and Immunity; 2009.

Disponibile en URL:
<http://scprimer.cpmc.columbia.edu/SCPrimerApp.cgi>. Consultado: 02 de abril, 2011.

Imai, T., Ban, Y., Terakami, S., Yanamoto. &Moriguchi., T. (2009). L-Ascorbate Biosynthesis in peach: Cloning of Six L- galactose Pathway Genes and Their Expression During peach Fruit Development. *PhysiologiaPlantarum*. Vol.13, Pág.139-149.

Li, M., Ma, F., Liang, D., Li, J., Wang, Y. (2010).Ascorbate Biosynthesis during Early Fruit Development is the Main Reason for Its Accumulation in kiwi. *Plos One*.Vol, 5. Nº 2: Pág.1-14.

Li, M., Ma, F., Guo, Ch., Liu, J. (2010).Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in Apple leaves of different ages.*PlantPhysiology and Biochemistry*. Vol. 48:Pág. 216-224.

Lima, M. (2006).Estudo de genes expressos em fruto de camu camu: seqüenciamento de ESTs. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal. Pág. 169.

Linster, C., Adler, L., Webb, K., Christensen, K., Brenner, Ch. & Clarke, S. (2008).A Second GDP-L-galactosePhosphorylase in *Arabidopsis* en Route to Vitamin C.*The Journal of Biological Chemistry*.Vol 283, Nº 27: Pág.1843-18492.

Linster, C., Gomez, T., Christensen, K., Adler, L., Young, B., Brenner, C. & Clarke, S. (2007).*Arabidopsis VTC2* Encodes a GDP-L-GalactosePhosphorylase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheeler Pathway To Ascorbic Acid in Plants. *BiolChemJournal*. Vol. 282: Pág.14.

Maeda, R. & Andrade, J. (2003).Aproveitamento do camu camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *ActaAmazonica*. Vol. 33, Nº 3: Pág.489-498.

Melino, V. J., Soole, K. S., & Ford, C. M, (2009).Ascorbate Metabolism and the Developmetal Demand for Tartaric and Oxalic Acid in Ripening Grape Berries. *BMC Plant Biology*.Vol. 9, Nº 145: Pág. 1-14.

Mieda, T., Yabuta, Y., Rapolu, M., Motoki, T., Takaeda, T., Yoshimura, Y., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2004). Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant Cell Physiol.* Vol. 45, Nº 9: Pág. 1271-1279.

Müller, P. (2008). An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Mol Biol.* Vol. 68, Nº 1-2: Pág 31-41.

Multiple Sequence Alignment by Clustalw. The European Bioinformatics Institute; 1994. Disponible en URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Consultado: 30 de marzo, 2011.

Muscle. Multiple Sequence Alignment. The European Bioinformatics Institute; 2004. Disponible en URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Consultado: 02 de abril, 2011.

Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y. & Sugiura, M. (2003). Ascorbate Metabolism in Harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 54, Nº 392: Pág. 2439-2448.

Nucleotid (Base de Datos). Bethesda: National Library of Medicine; 1966. Disponible en: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado: 27 de marzo, 2011.

Oligo Analyzer 3.1. Integrated DNA Technologies; 1987. Disponible en URL:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Consultado: 04 de abril, 2001.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. Vol. 26. Pág: 509–515.

Pateraki, I., Sanmartin, M., Kalamaki, M., Gerasopoulos, D. & Kanellis, A. (2004). Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of *l-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase*. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, Nº 403. Pág: 1623-1633.

Pignocchi, C. & Foyer, A. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Plant Biol*. Vol. 6: Pág. 379–389.

Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F & Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *Plant Biology*. Vol. 6, Nº 27: Pág. 1-11.

- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM (2009).** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 2009 37: e45.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F & T, Maniatis. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Pág. 2344.
- Smirnoff, N., Conklin, P., Loewus, F. (2001).** Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: A Renaissance. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* Vol. 52: Pág.437-467.
- Smirnoff, N. (2000).** Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* Vol. 335: Pág.1455-1464.
- Simon P. (2003).** Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*,19(11):1439-1440.
- Villachica, H. (1996).** Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Ed. *Tratado de Cooperación Amazónica -Secretaría Pro-Tempore*. Pág.105-107.
- Wheeler, L., Jones, A. & Smirnoff, N. (1998).** The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature Journal*. Vol. 393: Pág.365-369.
- Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., Motoki, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T & Shigeoka, S. (2007).** Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but

independent of sugars in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*. Vol. 58,
Nº 10: Pág. 2661-2667.

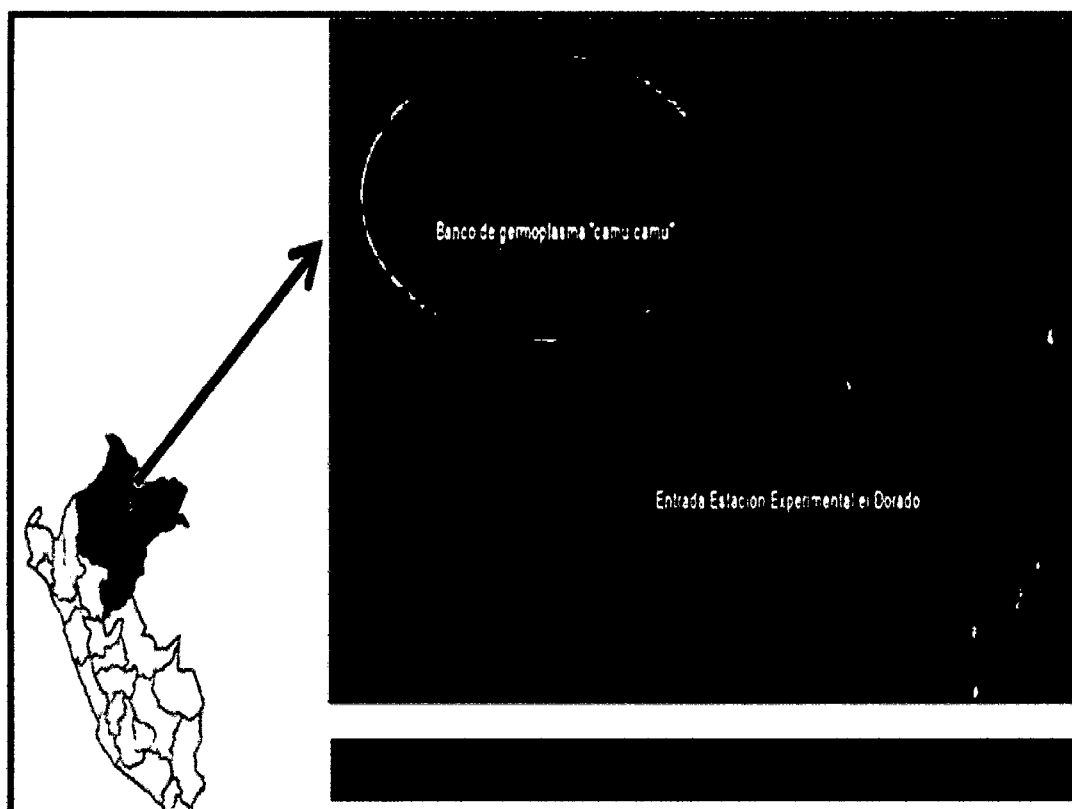
Zhang, L., Wang, Z., Xia, Y., Kai, G., Chen, W., Tang, K. (2007). Metabolic Engineering of Plant L-Ascorbic Acid Biosynthesis: *Recent Trends and Applications*. *Crit Rev Biotechnol* Vol.27: 173-182.

Zeng, Y.& Yang, T. (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol.20: Pág. 417–417.

IX ANEXOS

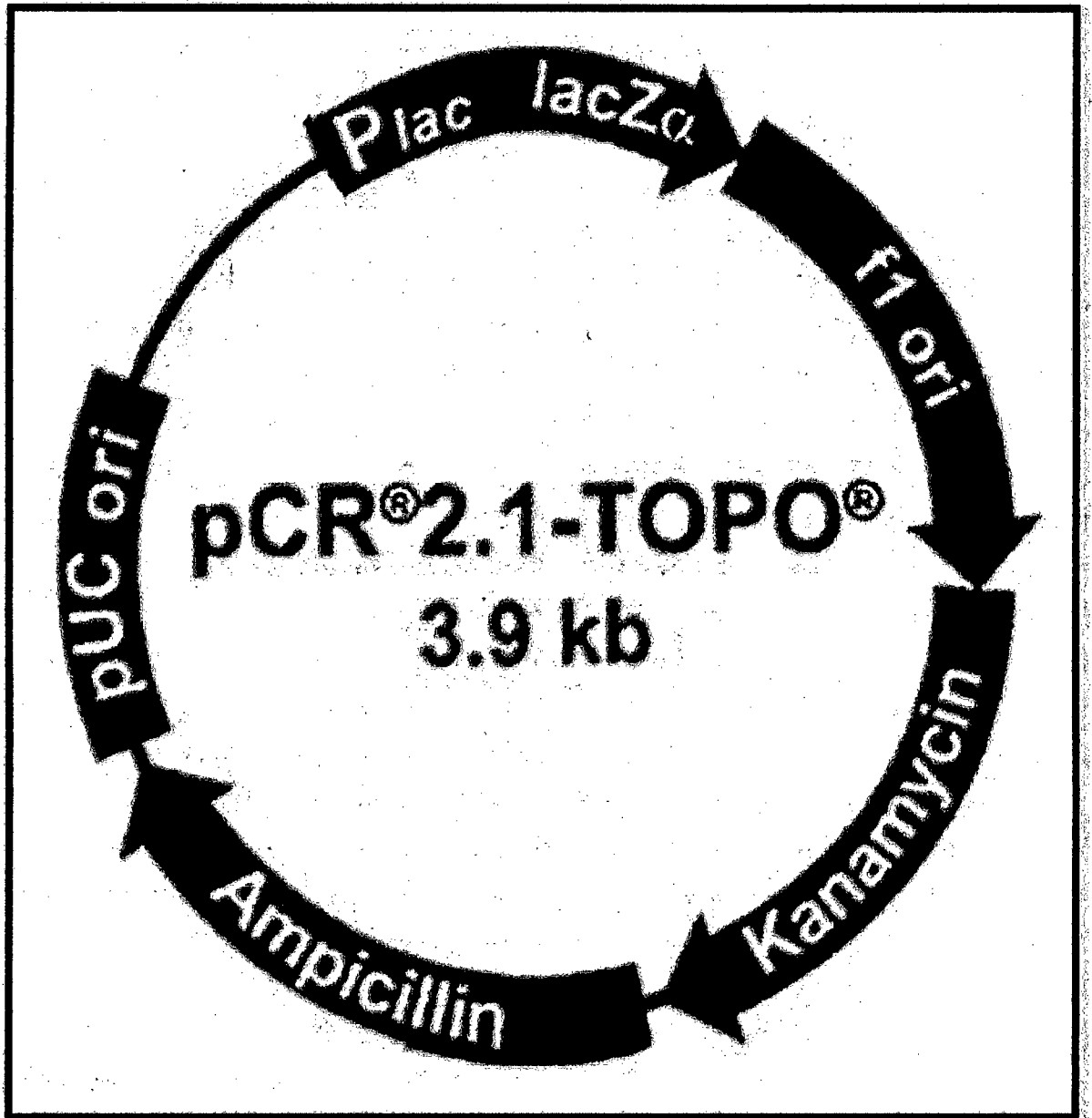
Anexo N°01

Figura N° 01: Ubicación geográfica de la zona de muestreo



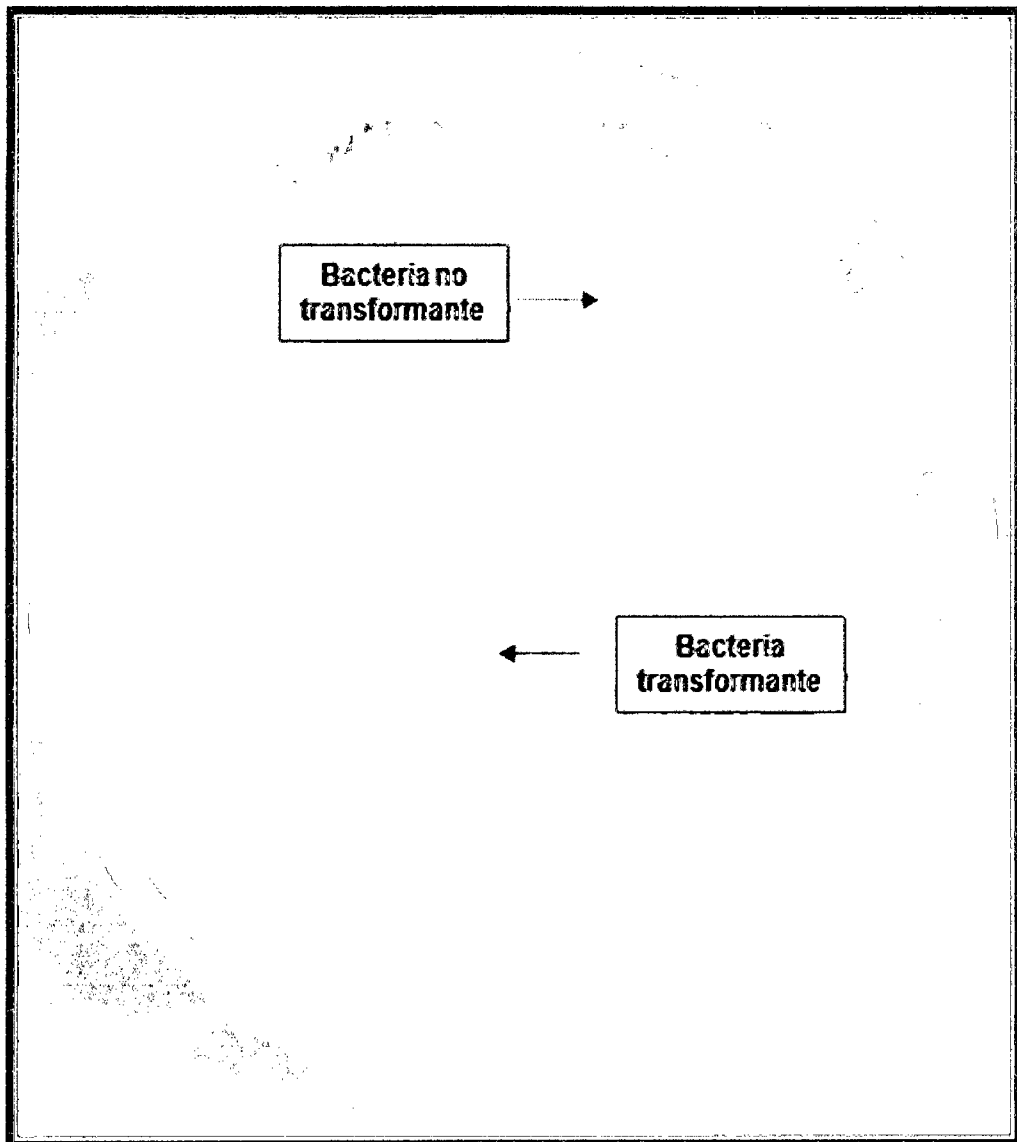
Anexo N°02

Figura N° 02 Mapa del Vector Plasmídico pCR® 2.1-TOPO®



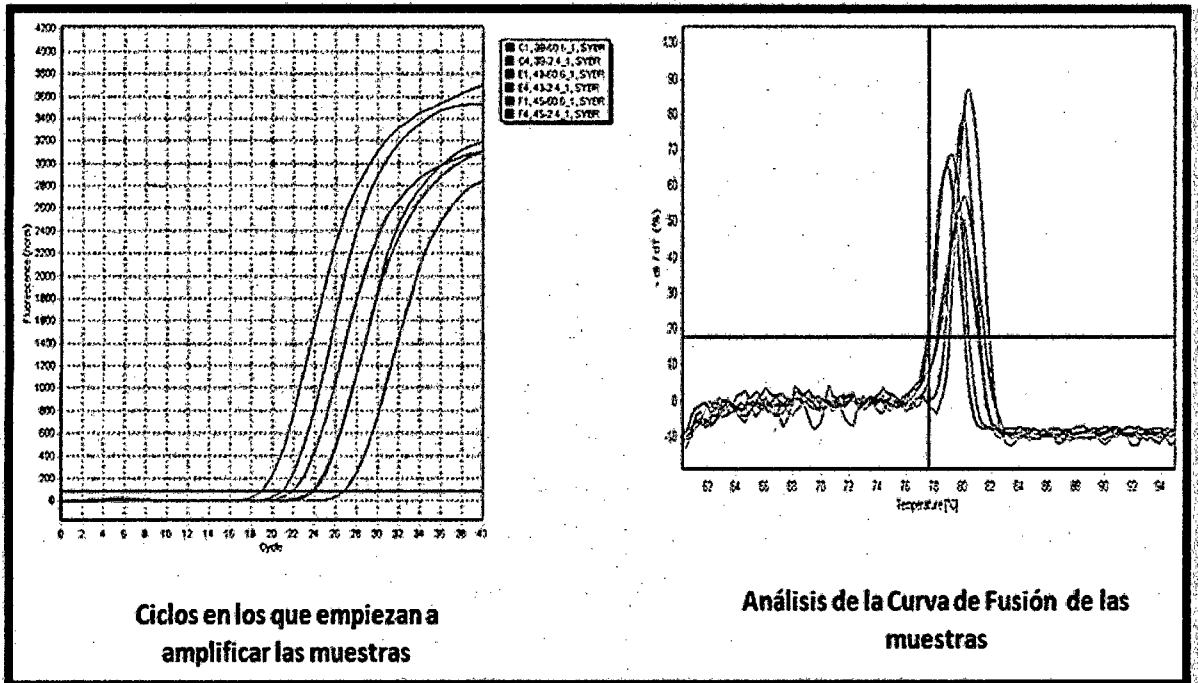
Anexo Nº 03

Figura Nº 03: Bacterias transformantes y no transformantes



Anexo N°04

Figura N° 04: Amplificación y análisis de la Curva de Fusión en un PCR en tiempo real



Anexo N° 05**Tabla N° 01: Pureza, calidad y concentración del ARN purificado**

Muestr a	Código	Absorbancia 230 nm	Absorbancia 260nm	Absorbancia 280nm	260/23 0	260/28 0	[] µg/ml
1	1.1	0,004	0,034	0,019	8,5	1,8	66,6
2	7.1	0,022	0,078	0,039	3,5	2,0	152,9
3	60.6	0,025	0,087	0,045	3,5	1,9	170,5
4	2.4	0,032	0,090	0,043	2,8	2,1	176,4
5	2.6	0,026	0,089	0,045	3,4	2,0	174,4
6	49.3	0,061	0,156	0,080	2,6	2,0	305,8
PROMEDIO					4,0	1,9	174,4

Anexo N° 06**Tabla N° 02: Pureza, calidad y concentración del ADN plasmídico purificado**

1	23,6	0,144	0,079	1,8	720,0
2	30,6	0,119	0,067	1,8	595,0
3	8,2	0,435	0,228	1,9	2.175,0
PROMEDIO				1,83	3.490,0

Anexo N° 07

Figura N° 13: Ruta Biosintética de Smirnof-Wheeler en plantas

