



UNAP FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional de
Ciencias Biológicas

**“NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA
ASCORBATO-GLUTATIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL
CONTENIDO DE VITAMINA C EN *Myrciaria dubia* (Kunth)
McVaugh “camu-camu”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

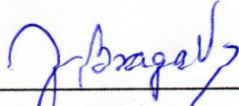
AUTOR:

Anderson Eleasar Medina Bardales

IQUITOS – PERÚ

2018

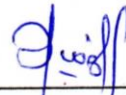
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



**Blga. JANETH BRAGA VELA., Dra.
PRESIDENTE**



**Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA., Dr.
MIEMBRO**



**Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA., Dra.
MIEMBRO**

ASESOR

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized loop followed by a smaller, more intricate scribble.

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
ASESOR



UNAP

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

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS Nº 029

Iquitos, 18 de enero de 2018

En la ciudad de Iquitos, a los dieciocho días del mes de enero del 2018 y, siendo las 11:10 am horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 0106-2014-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; **Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra., (Presidente); Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr., (Miembro), Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA, Dra., (Miembro)**, para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: **"NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA ASCORBATO-GLUTATIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL CONTENIDO DE VITAMINA C EN *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu-camu"**, por el Br. **ANDERSON ELEASAR MEDINA BARDALES**.

La dirección de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral N° 220-2017-DEFP-B-FCB-UNAP, de fecha 19 de diciembre de 2017, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. **ANDERSON ELEASAR MEDINA BARDALES**, promoción 2013-II, graduado con R.R. N° 0970-2014-UNAP de fecha 23 de junio 2014. Se reconoce como **ASESOR** de la tesis al profesional: **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.**

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

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; aprobado **LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO Muy bueno**; quedando en consecuencia el candidato **apto** para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12.20 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por quintuplicado.


Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.
PRÉSIDENTE


Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.
MIEMBRO


Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA, Dra.
MIEMBRO

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

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

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, que me ha iluminado en todos estos años, a mi familia en Iquitos por todo el apoyo brindado, a mi hermosa familia en Lima quienes fueron, son y serán mi mayor motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, por el apoyo como asesor, amigo y ejemplo en el desarrollo del presente trabajo de Tesis.

A la Dra. Marianella Cobos, Jefa del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, por las facilidades en el acceso a las instalaciones y uso de sus equipos.

Al recurso humano que labora en la Unidad Especializada de Biotecnología - CIRNA por la ayuda prestada en varios procesos de la Tesis.

A la Dra. Lastenia Ruíz, Directora del CIRNA por permitirme hacer uso de las instalaciones y equipos del Centro.

Al Ing. Sixto Imán, por facilitar el acceso a la Colección de Germoplasma de “camu-camu” del Instituto Nacional de Innovación Agraria de donde se obtuvieron las muestras.

ABREVIATURAS

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
CIRNA	Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
CP	<i>Crossing point</i>
SD	Standar deviation
APX	Ascorbato peroxidasa
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
GR	Glutación reductasa
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
HR	Humedad relativa
NE	Expresión normalizada

INDICE DEL CONTENIDO

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	ii
ASESOR.....	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 029	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ABREVIATURAS.....	vii
INDICE DEL CONTENIDO	viii
RESUMEN	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
I.INTRODUCCION	1
II.REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
1. <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) Mc Vaugh “camu camu”	3
A. Ubicación taxonómica (19):	3
2. Ácido L-ascórbico (Vitamina C)	3
3. Vía Ascorbato-Glutatión	4
4. Genes de referencia y normalización	5
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
1. Descripción del área de estudio	6
2. Procedimientos.....	6
2.1Obtención de las muestras botánicas.....	6
2.2Extracción y cuantificación de vitamina C	11
3. Análisis y procesamiento de datos	12
IV.RESULTADOS	13
1. Estabilidad de expresión de genes de referencia candidatos	13
1.1. Calidad e integridad del ARN total purificado.....	13
1.2. Identificación del gen de referencia	13
2. Contenido de vitamina C en hojas de <i>M. dubia</i> en diferentes condiciones de estrés.....	14
3. Nivel de expresión de genes de la vía ascorbato-glutatión de <i>M. dubia</i> en diferentes condiciones de estrés	15

V.DISCUSION	17
1. Estabilidad de expresión de genes de referencia candidatos	17
2. Contenido de vitamina C en hojas de <i>M. dubia</i> en diferentes condiciones de estrés.....	18
3. Nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutación de <i>M. dubia</i> en diferentes condiciones de estrés	18
VI.CONCLUSIONES	20
VII.RECOMENDACIONES.....	21
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
IX.ANEXOS	28

RESUMEN

Myrciaria dubia (H.B.K) McVaugh, “camu-camu” presenta frutos con alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C), pero los estudios bioquímicos y moleculares sobre cómo se sintetiza y recicla esta vitamina son escasos. Por ello el objetivo de esta investigación fue medir el nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutación y su influencia en el contenido de vitamina C en *M. dubia* “camu-camu”. Para lo cual seleccionamos un gen de referencia usando frutos en diferentes estados de maduración y tejidos de *M. dubia*. Luego cuantificamos la vitamina C por el método de la ascorbato oxidasa y lo comparamos con la expresión relativa de los genes implicados en la vía ascorbato-glutación, la muestra se tomó en hojas de plántulas de *M. dubia* sometidas a diferentes condiciones de estrés. Los resultados mostraron que los genes candidatos ACT11, CACS, CRL2, EF1A, PP2A Y UBCE tenían valores alrededor 1,4 CP ($1,228 \text{ CP} < \text{SD} < 1,768$) y el gen SAND mostró un valor de 0,25 CP siendo este el mejor candidato. La mayor concentración de vitamina C se observó en las hojas cuyas plántulas estuvieron sometidas por 24 horas con sulfato de cobre (0,056 mg de vitamina C por cada mL de muestra), hojas 24 horas en sequía (0,043 mg/mL) y las muestras de hojas expuestas por 24 horas a la luz (0,044 mg/mL). Sin embargo, las condiciones de estrés con menos contenido de vitamina C fueron las hojas 24 en oscuridad (0,012 mg/mL) y las hojas 24 horas en inundación (0,022 mg/mL). Con respecto a la expresión relativa de los genes de la vía ascorbato-glutación, los controles mostraron una mayor cantidad de copias de ARNm, a excepción de la DHAR que en la condición de Hojas 24 inundación, mostró una mayor expresión relativa con respecto a los otros genes de la vía. Las condiciones de estrés presentaron una disminución en la cantidad de copias de ARNm de los 4 genes de la vía. Estos resultados sugieren que *M. dubia* está respondiendo al estrés oxidativo con altas concentraciones de vitamina C, sin embargo, esta no solo se genera mediante la vía de reciclaje, sino que usa otras vías para sintetizar vitamina C.

LISTA DE CUADROS

TABLA 1. GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS, DE LA VÍA ASCORBATO GLUTATION Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES.....	10
TABLA 2. COMPONENTES Y CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS USADOS PARA EL MASTERMIX DEL PCR	11

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VÍA DE BIOSÍNTESIS SMIRNOFF-WHEELER,.....	4
FIGURA 2. VÍA ASCORBATO-GLUTATIÓN,	5
FIGURA 3. DATOS MOLECULARES PARA ENCONTRAR EL GEN DE REFERENCIA	14
FIGURA 4. CONCENTRACIÓN DE VITAMINA C EN CADA CONDICIÓN DE ESTRÉS.....	15
FIGURA 5. NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES DE LA VÍA ASCORBATO- GLUTATIÓN EN CADA CONDICIÓN DE ESTRÉS.....	16

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FLUJOGRAMA DE PROCESOS: CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA C Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA	28
ANEXO 2. TEJIDOS DE CAMU CAMU USADOS PARA LA OBTENCIÓN DE ARN.....	28
ANEXO 3. LECTURAS DE ABSORBANCIAS EN CADA CONDICIÓN DE ESTRÉS	29
ANEXO 4. RATIOS DE CALIDAD Y ELECTROFORESIS DEL ARN DE HOJAS.....	29
ANEXO 5. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA C.....	29

I. INTRODUCCION

Myrciaria dubia (H.B.K) McVaugh, “camu-camu” presenta frutos que se caracterizan por su alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C), que puede fluctuar entre 1,39 y 1,49 g por cada 100 g de pulpa de fruto maduro (1). Debido a esta característica de importancia nutricional, el Centro de Promoción de la Biodiversidad Amazónica lo señala como uno de los productos con alto potencial desde la perspectiva del mercado (2). Esto se evidenció entre el año 2005 y 2006, periodo en el que la exportación de productos derivados de *M. dubia* como pulpa, néctares y jugos se incrementó hasta en un 130% (3).

Sin embargo, en los últimos años se evidencia un descenso significativo en la exportación de estos productos (4). Este problema se atribuye principalmente a la amplia variación en el contenido de vitamina C en los frutos de esta especie (5). Debido a esto, los productores y empresarios dedicados a este rubro no tienen la capacidad de ofrecer productos derivados de *M. dubia* que cumplan con los estándares internacionales de calidad (6). Estas dificultades limitan su aprovechamiento por parte de los grupos interesados en esta especie, ya que ellos buscan uniformidad en los productos bioactivos que esta ofrece y los cuales podrían ser utilizados como alimento funcional a nivel regional, nacional y mundial (7).

El problema de la gran variación de vitamina C en los frutos de *M. dubia* puede atribuirse a factores medio ambientales y genéticos. De acuerdo a lo indicado, Justi *et al.* (8) reporta que la fluctuación de vitamina C en frutos de *M. dubia* proveniente de dos regiones distintas, se atribuye a diferencias climáticas como la humedad y las características del suelo. Asimismo, Correa *et al.* (9) muestra que la fluctuación diurna en el contenido de vitamina C en hojas de *M. dubia* se debe a variaciones en la intensidad lumínica. Otras investigaciones realizadas por Castro *et al.* (5) muestran que la amplia variación en el contenido de vitamina C en frutos de la colección de germoplasma de *M. dubia* del INIA se pueden atribuir a factores genéticos; ya que en esta especie se ha reportado que existe una amplia diversidad genética (10).

Además, de los factores mencionados, otros factores genéticos como los niveles de expresión de los genes que controlan el metabolismo de vitamina C en *M. dubia*

también estarían involucrados. Recientemente, estudios sobre la expresión de genes de la vía biosintética de vitamina C (Smirnoff-Wheeler) en *M. dubia* indican que estos influyen en el contenido de esta vitamina en sus diferentes tejidos (11,12). Sin embargo, esta no es la única vía metabólica implicada, porque varios estudios demuestran que las plantas presentan otras vías metabólicas para la biosíntesis de vitamina C. Entre estas figuran, la vía de la GDP-L-gulosa, la vía semejante a la de animales, la vía del myo-inositol y la vía del ácido D-galacturónico (13).

Adicionalmente, a las vías biosintéticas mencionadas, las plantas presentan una vía de reciclaje denominada vía del Ascorbato-Glutatión. En esta vía intervienen las enzimas ascorbato peroxidasa (APx), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (14). Esta vía metabólica se activa cuando las plantas están bajo condiciones de estrés ambiental, contribuyendo en la eliminación de radicales libres (15) y en el reciclaje de la vitamina C a partir de monodehidroascorbato y dehidroascorbato(16), por lo que tendría un rol importante en la variación del contenido de vitamina C en *M. dubia*. Por tanto, el objetivo general de este trabajo fue determinar si el nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutatión influye en el contenido de vitamina C en *M. dubia*. Para lograrlo los objetivos específicos trazados fueron, seleccionar genes de referencia que sean apropiados para normalizar la expresión de los genes en diferentes tejidos de *M. dubia*, medir el contenido de vitamina C de hojas de *M. dubia* y en las mismas hojas medir el nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutatión.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh “camu camu”

Esta especie pertenece a la familia Myrtaceae, es un arbusto que crece de forma natural en zonas pantanosas y llanuras de inundación de la cuenca Amazónica. Se cultiva en Perú y Brasil, con rendimientos de entre 12 y 20 t x ha⁻¹ x año⁻¹ (17). Presenta hábito arbustivo y llega a medir hasta 3 m de altura, con inflorescencias axilares, en grupos de racimos cortos, brácteas; flores glabras; pétalos blancos. Fruto baya que llega a medir aproximadamente 2,5 cm de diámetro (18).

A. Ubicación taxonómica (19):

Tipo: Fanerógamas

Subtipo: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Myrciaria*

Especie: *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh

Nombres: Camu camu (Perú), guayabito (Venezuela), caçari, arazá de agua y crista de galo (Brasil).

2. Ácido L-ascórbico (Vitamina C)

El ácido L-ascórbico es el nombre común para el derivado del azúcar de seis carbonos L-Galactono-1,4-lactona (13). El ácido L-ascórbico es una sustancia cristalina, con sabor ácido e insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos (20). Se sintetiza a partir de L-galactosa a través de la vía de Smirnoff-Wheeler (Figura 1), en donde L-Galactono-1,4-lactona ingresa a la mitocondria para salir transformada en ácido L-ascórbico (21).

Otros autores como Valpuesta y Botella (13). señalan que el ácido L-ascórbico puede ser sintetizado de novo en la ruta del ácido hexurónico del hígado o del riñón de las especies que tienen actividad oxidasa L-gulono-1,4-lactona; pero humanos, primates no humanos y otros mamíferos no pueden sintetizar ácido L-

ascórbico (13). Sin embargo, en el cuerpo humano funciona como captador de radicales libres y se la encuentra en forma de anión libre, siendo transferida por difusión simple al interior de los leucocitos y eritrocitos (22).

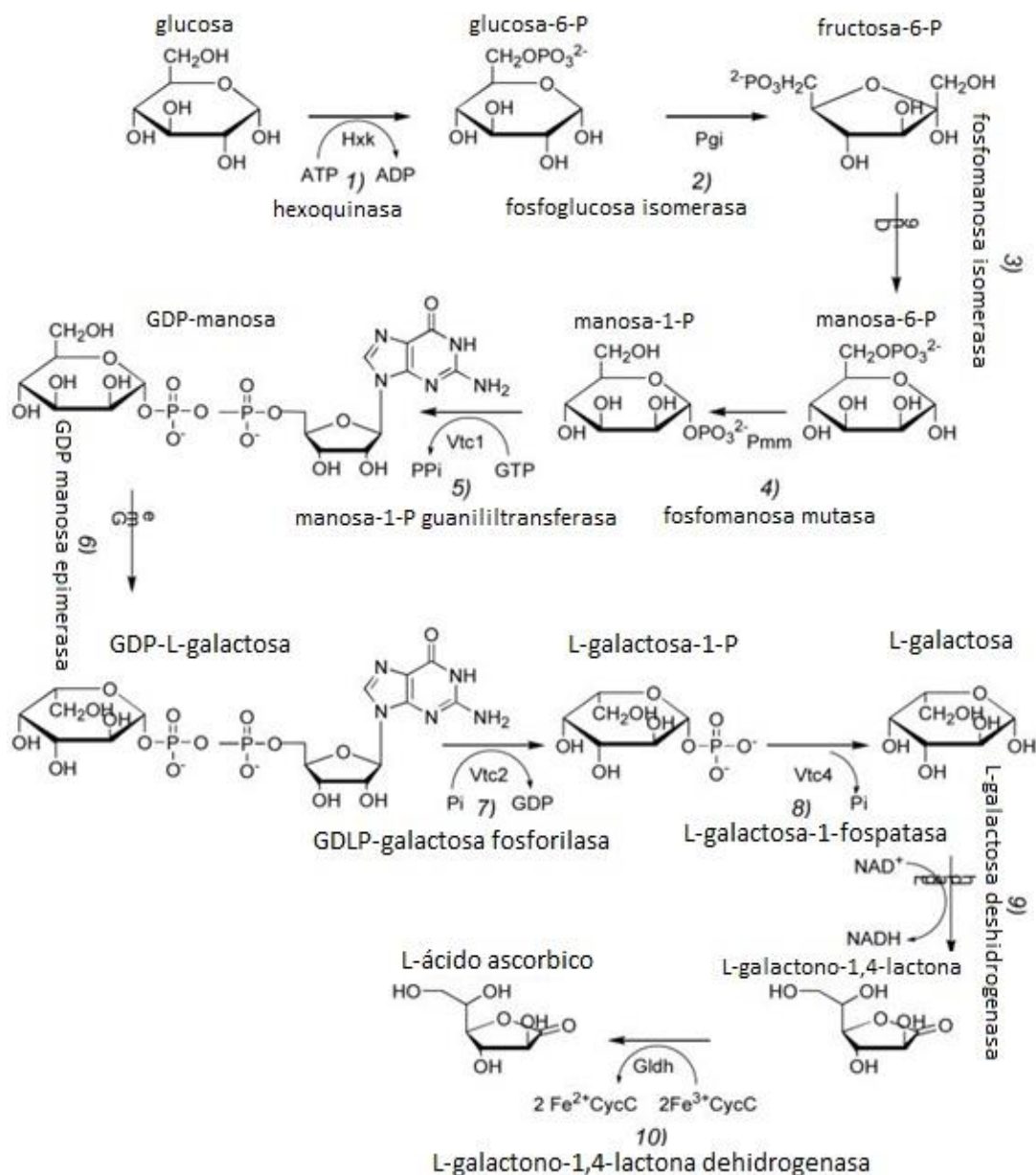


Figura 1. Vía de Biosíntesis Smirnoff-Wheeler, editado de Linster *et al.* (23)

3. Vía Ascorbato-Glutatión

En el ciclo del ascorbato-glutatión (Figura 2), el peróxido de hidrógeno es convertido en agua, el agente reductor en la primera reacción catalizada por el ascorbato peroxidasa es el ascorbato (ASA), el cual se oxida en

monodehidroascorbato (*MDHA*). Posteriormente, la *MDHA* reductasa (*MDAHR*) reduce el *MDHA* a ascorbato ante la presencia del agente reductor NAD(P)H. El dehidroascorbato (*DHA*) se produce espontáneamente a partir de *MDHA* y puede ser reducido a ascorbato por la *DHAR* reductasa (*DHAR*) con glutatión (*GSH*), el cual es oxidado a glutatión oxidado (*GSSG*). El ciclo se cierra cuando la glutatión reductasa (*GR*) convierte el *GSSG* en *GSH* con el agente reductor NAD(P)H (15).

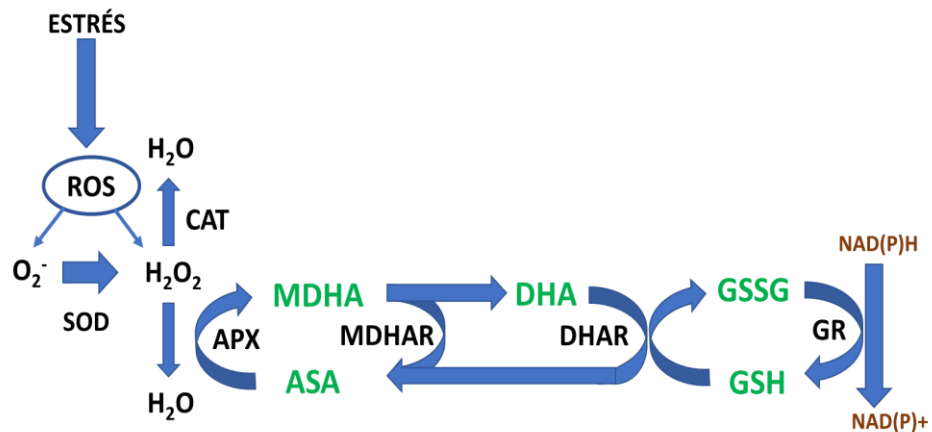


Figura 2. Vía Ascorbato-Glutatión, editado de Medina (14).

4. Genes de referencia y normalización

La transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) se ha convertido en una técnica muy utilizada en investigaciones de expresión génica. Los beneficios de esta técnica incluyen su sensibilidad, reproducibilidad y alto rendimiento. A pesar de ello existen varios factores que pueden influir en los resultados como la calidad del ARN, variación por tipo de muestra, la enzima transcriptasa reversa, la concentración de ADN complementario (ADNc) y los genes de referencia empleados(24). Para solucionar este problema se utiliza uno o varios genes de referencia para normalizar los niveles de expresión de los genes diana y así tener una cuantificación relativa compensando las variaciones que pueden generarse debido a procedimientos experimentales y analíticos (25). Sin embargo, algunos investigadores usan los genes de “mantenimiento” (*housekeeping*) como genes de referencia, pero estos no son estables en todas las condiciones, ni tampoco en todas las especies, lo que implicaría la necesidad de una verificación antes de cada experimento y en cada especie (26,27).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Descripción del área de estudio

Las muestras se obtuvieron de la Colección de germoplasma de *M. dubia*, Campo Experimental “El Dorado” del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado a la altura del km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta en las coordenadas geográficas 3°57'17"LS, 73°24'55"LO con una altitud de 112 msnm. La colección está por 43 accesiones, que son muestras representativas pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas). El material biológico fue transportado en contenedores con hielo a la Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA-UNAP donde se prosiguió con la parte experimental y molecular (Anexo 1).

2. Procedimientos

2.1 Obtención de las muestras botánicas

Los diferentes tejidos de *M. dubia* tales como cáscara y pulpa de frutos verdes, pintones y maduros, hojas, tallos, brotes florales y flores (Anexo 2) se colectaron de plantas de las accesiones 2 y 60, de la colección de Germoplasma de *M. dubia* del INIA.

Las muestras botánicas también se obtuvieron de plántulas (15 a 20 cm de longitud) que se hicieron germinar en condiciones controladas y que fueron sometidas a diferentes condiciones de estrés por 24 h. Estas condiciones fueron las siguientes:

2.1.1. Tratamiento con sulfato de cobre: Las plántulas fueron transferidas a una solución de 500 μM de CuSO_4 e incubadas por 24 h a 28°C, con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad y humedad relativa de 88% en una cámara climática.

2.1.2. Tratamiento con sequía e inundación: Para los experimentos de sequía las plántulas fueron retiradas del sustrato acuoso y puestas en envases de plástico sin agua. Los experimentos de inundación se hicieron dejando las plántulas totalmente sumergidas en recipientes con agua destilada. En ambos casos las plántulas fueron incubadas por 24 h a 28°C, con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad y humedad relativa de 88% en una cámara climática.

2.1.3. Tratamiento con luz y oscuridad: Primero las plántulas fueron sometidas por 48 horas continuas a oscuridad y posteriormente un grupo de plántulas (10 plántulas) fueron expuestas por 24 horas a luz blanca de fluorescentes ($100 \mu\text{mol fotones.m}^2.\text{s}^{-1}$) y un segundo grupo mantenidos por 24 horas en oscuridad. En ambos casos las plántulas fueron incubadas a 28°C y humedad relativa de 88% en una cámara climática.

Una vez completado el tiempo de los experimentos, se colectaron las hojas de las plántulas para inmediatamente extraer y cuantificar el contenido de vitamina C y una parte del material botánico se almacenó a - 80°C para posteriormente purificar el ARN y realizar los análisis de expresión genética.

A. Purificación de ARN

Se realizó en base al protocolo de Castro *et al.* (28), que consistió de los siguientes pasos:

- Pesar 500 mg de la muestra y transferirlo a un mortero, agregar 5 mL del tampón de extracción (precalentado a 70°C), 100 μL de β -mercaptoethanol, 20 μL de Proteinasa K (10 mg/mL) y 50 μL de celulasa (10 mg/mL) tritularlo y homogenizarlo completamente.
- Transferir la solución a los microtubos de 2 mL, mezclar en el vortex por 30 s y colocar en baño maría a 70°C por 15 min, homogenizando por inversión cada 5 min. A temperar a 25°C por 5 min y centrifugar a 23000 x g por 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo.

- Agregar igual volumen de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1). Homogenizar en el vortex, centrifugar a 23000 x g por 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Repetir este paso de extracción con solvente orgánico.
- Transferir el sobre nadante a microtubos de 1,5 mL y agregar 0,25 volúmenes de cloruro de litio (LiCl) 10 M. Homogenizar en el vortex e incubar a -20°C por 1 h.
- Centrifugar a 23000 x g por 30 min a 4°C. Descartar el sobre nadante, agregar 500 µL de etanol 70% y repetir la centrifugación.
- Agregar 500 µL de etanol absoluto, centrifugar a 23000 x g por 30 min a 4°C.
- Descartar el sobre nadante, secar en un *hot-plate* el ARN total precipitado a 45°C por 5 min y re suspender con 89 µL de agua ultra pura.
- Agregar 10 µL del tampón 10xTURBO DNase® y 1 µL de TURBO DNase®, homogenizar suavemente e incubar a 40°C por 60 min.
- Añadir 100 µL de H₂O-DEPC, agregar 200 µL cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), homogenizar en el vortex por 30 s y centrifugar a 23000 x g por 5 min a 4°C.
- Transferir el sobre nadante a un microtubo, precipitar el ARN total con LiCl y lavar con etanol como se indicó previamente. Finalmente, re suspender el ARN total con 50 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 Mm Ph 8,0, EDTA 1 Mm) Y ALMACENAR A – 80°C para posteriores análisis.

B. Evaluación de la calidad y cantidad de ARN

La calidad y cantidad del ARN total purificado se determinó mediante análisis espectrofotométrico según Sthephenson (29) con un NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000), que nos proporciona los siguientes datos: concentración (ng/µL), absorbancias a 260 nm y 280 nm y los ratios de calidad A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{23} .

C. Evaluación de la integridad del ARN en gel de agarosa

Se realizó geles desnaturalizantes de agarosa al 1% p/v en tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA 0,5 M, pH 8,0). Los geles fueron teñidos

con bromuro de etidio y las bandas se observaron en un transluminador de luz ultravioleta y fotografiadas con el equipo marca Biometra, modelo Bio Doc Analyze Darkhood.

D. Diseño de cebadores para el PCR en tiempo real

Se realizó la recopilación de secuencias de cadenas polipeptídicas de diferentes especies vegetales correspondientes a los candidatos usados en otras especies para genes de referencia (Tabla 1). Para la búsqueda se empleó un Blast local con secuencias de aminoácidos de las enzimas mencionadas de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Luego se seleccionó los transcritos con $E\text{-value} < 10^{-6}$ e identidades $> 60\%$ para realizar una búsqueda de secuencias homólogas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Las secuencias de los transcritos fueron usadas para diseñar los cebadores específicos con el programa OligoAnalyzer 3.1 bajo las siguientes condiciones: Temperatura media de fusión (T_m) de 60°C , tamaño del amplicón 50 a 100 pb, contenido de G+C de 35-55%. Los cebadores obtenidos fueron analizados para determinar si forman estructuras termodinámicamente estables ($\Delta G < -10$) que pueden interferir con el PCR (p.ej., homodímeros, heterodímeros, etc). Finalmente, con el programa MFOLD, se eligió el par de cebadores cuyos amplicones (productos de PCR) no forman estructuras secundarias termodinámicamente estables en las zonas de hibridación de los cebadores o estructuras internas que pueden afectar la eficiencia del PCR a la temperatura de hibridación y extensión de 60°C .

E. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó por transcripción reversa a partir de $2\ \mu\text{g}$ de ARN total obtenido de los diferentes tejidos indicados previamente. La síntesis se efectuó con la enzima transcriptasa reversa MuLV usando Oligo(dT) como cebador y siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit GeneAmp®-RNA PCR Core (Applied Biosystems, California – Estados Unidos). La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf, Mastercycler ep

Realplex2, Hamburgo – Alemania) bajo las siguientes condiciones: 25°C por 10 min, 42°C por 60 min, 99°C por 5 min y 5°C por 5 min.

Tabla 1. Genes de referencia candidatos, de la vía ascorbato glutation y características de los cebadores

Nombre	Código GenBank	Especie	Secuencia (5' a 3')	PM (µg/µmole)	% G-C	Tm °C
ACT11F1	OAP06988.1	<i>Arabidopsis</i>	5' - GGC ATT CAC GAG ACC ACA TA	6,096.00	50	60
ACT11R1		<i>thaliana</i>	5' - GAA CCA CCA CTG AGG ACA AT	6,105.00	50	57
CACSF1	BAH20421.1	<i>Arabidopsis</i>	5' - GAT GGA GTT TCA GGT TCC TAT GT	7,101.60	44	59
CACSR1		<i>thaliana</i>	5' - GAC GGT GTT GTA TCC ACT CTT T	6,708.40	46	58
CRL2F1	OAP09946.1	<i>Arabidopsis</i>	5' - TTA CCA CAA GTT CCG AGT GAA G	6,744.40	46	59
CRL2R1		<i>thaliana</i>	5' - GGA TGC TCA ACA GGG TTC AT	6,158.00	50	60
EF1AF1	AES74993.1	<i>Medicago</i>	5' - CGA GCA TTG CCA AAC CAA TAG	6,409.20	48	63
EF1AR1		<i>truncatula</i>	5' - CCT TAT AAC CAG CCG TGA AGA T	6,704.40	46	60
PP2AF1	NP_177154.1	<i>Arabidopsis</i>	5' - CAG CTT GTC ATG GAA GGA TAC A	6,784.40	46	60
PP2AR1		<i>thaliana</i>	5' - CAG CCA TAT TTC CAC AAC GAT AAC	7,250.80	42	62
SANDF1	NP_029426.1	<i>Arabidopsis</i>	5' - CTG GCC TTT GGC ATT TCA TAT AC	6,981.60	44	62
SANDR1		<i>thaliana</i>	5' - TGT CGA AGA CTG CTG AAT GG	6,198.00	50	60
UBCEF1	AFY06649.1	<i>Carica</i>	5' - ACG GGA GCA TTT GTC TTG ATA	6,477.20	43	60
UBCER1		<i>papaya</i>	5' - CCG TCA AGA GAG AAC AGA TTG A	6,802.40	46	59
APX-F1	CAA55209.1	<i>Raphanus</i>	5' - CCG CCC TCT TGT TGA GAA ATA - 3'	6,382.20	48	61
APX-R1		<i>sativus</i>	5' - GAG AGC TTC AGA TGG GAT TCA G - 3'	6,840.40	50	60
DHAR-F2	NP_001267992.1	<i>Vitis</i>	5' - ACG GCA GTT GAC TTG AGT TTA - 3'	6,477.20	43	58
DHAR-R2		<i>vinifera</i>	5' - GCT TTC TGG GAT TGT CCA TTT C - 3'	6,699.40	46	62
GR-F3	AAK27157	<i>Brassica</i>	5' - TGT TCC ATC AGC TGT GTT CTC - 3'	6,355.20	48	59
GR-R3		<i>juncea</i>	5' - ATC AAC GTC GCC ATA CTC TTC - 3'	6,302.20	48	59
MDHAR-F2	BAD14934.1	<i>Brassica</i>	5' - GTG GCA GTT CTA CGG TGA TAA - 3'	6,502.20	48	58
MDHAR-R2		<i>oleracea</i>	5' - GGC TTT GGT AAT GTG GGA TTG - 3'	6,564.20	48	61

F. PCR en tiempo real

Para la reacción se empleó el SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems). Los componentes de la reacción (Tabla 2) fueron: 10x SYBR Green PCR Buffer 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,8 mM, 0,5 mM de cebadores F y R (Tabla 2), Amplitaq Gold 0,025 U/mL, AmpErase UNG 0,01 U/mL, ADNc (diluido 1:5) 2 µL y agua csp 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C por 2 min, 45 ciclos de 95°C por 20

s, 52°C por 20 s y 68°C por 30 s (detección de la señal fluorescente), y para el análisis de la curva de fusión se empleó un ciclo de 68°C por 3 min, 65°C por 5 s y aumento gradual de la temperatura por 20 min hasta 85°C por 50 s.

Tabla 2. Componentes y concentraciones de los reactivos usados para el MasterMix del PCR

Reactivos	Concentración [1x]
H ₂ O ultra pura	3,6
Buffer Gold 10x + SYBR GOLD 10X	1,0
25 mM MgCl ₂	1,2
dNTPs mix 10 mM	0,2
Primer 1F (5 uM)	1,0
Primer 1R (5 uM)	1,0
Taq Polimerasa	1,0
ANDc	1,0
TOTAL	10,0

2.2 Extracción y cuantificación de vitamina C

Para la extracción de la vitamina C 40 mg de hojas obtenidas de las plántulas sometidas a diferentes tratamientos de estrés, fueron transferidos a un mortero que contenía 1 mL de tampón de extracción (EDTA 5 Mm, ácido metafosfórico 6% y polivinil poli pirrolidona 1%) y fueron homogenizados completamente. Luego, el homogenizado fue transferido a un microtubo de 1,5 mL y centrifugado a 23000 x g a 4°C por 5 min.

La vitamina C extraída fue cuantificada con el método enzimático del ascorbato oxidasa descrita por Vermeir et al.(30). Para ello, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de vitamina C de 0,1 mg/mL a 0,001 mg/mL (Anexo 5). Los ensayos enzimáticos de cuantificación fueron realizados con una solución de 870 µL tampón ácido, 125 µL de solución estándar o muestra y 5 µL de enzima (0,5 U/µL⁻¹). En los ensayos, el tiempo de evaluación de la reacción fue de 10 min registrándose los valores de absorbancia cada 10 s. Todos los ensayos se hicieron en un espectrofotómetro UV/Visible Thermospectronic Genesys 6.

3. Análisis y procesamiento de datos

Para identificar los genes de referencia se analizó su estabilidad de expresión con el programa BestKeeper (25).

La expresión relativa o expresión normalizada (NE, por sus siglas en inglés) de los genes se estimó de acuerdo a Simon (31) , 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 de interés.

IV. RESULTADOS

1. Estabilidad de expresión de genes de referencia candidatos

1.1. Calidad e integridad del ARN total purificado

Con el protocolo usado se obtuvo ARN total de alta calidad e integridad. Los ratios de calidad mostraron valores aceptables mayores a 2,0 (260/280) lo que refleja muestras libres de proteínas; valores mayores a 1,4 (260/230) que refleja muestras libres de carbohidratos. La integridad se reflejó en el gel de agarosa, en donde las bandas de ARN ribosomal 28s y 18s no muestran degradación (Figura 3A). La eficiencia de los cebadores se determinó mediante amplificación por PCR en tiempo real de diluciones seriadas del ADNc. Tal como se muestra en la Tabla 3, la eficiencia de los cebadores fue alta, siendo en todos los casos mayor de 1,70, Asimismo, en la Figura 3.B se muestra que con estos cebadores se logró amplificar regiones génicas de ~100 pb de los 7 genes de referencia candidatos.

1.2. Identificación del gen de referencia

Los niveles de expresión de los siete genes de referencia candidatos se detectaron por RT-qPCR y se analizaron en todas las muestras. Valores variables de CP y por ende alta desviación estándar para un gen indican que este no es apropiado para ser empleado como gen de referencia. De lo contrario si el gen muestra uniformidad en los valores de CP y consecuentemente bajos valores de desviación estándar, indican que el gen tiene expresión estable. El análisis BestKeeper (Figura 3C) reveló que de la mayoría de los genes de referencia candidatos evaluados (*ACT11* [24,68 ± 1,77 CP], *CACS* [23,94 ± 1,63 CP], *CRL2* [23,96 ± 1,61 CP], *EF1A* [24,42 ± 1,75 CP], *PP2A* [22,77 ± 1,23 CP] y *UBCE* [21,85 ± 1,64 CP]) mostraron amplias variaciones en sus niveles de expresión. En contraste, el gen *SAND* mostró mayor estabilidad de expresión (23,1 ± 0,25 CP) bajo todas las condiciones experimentales evaluadas.

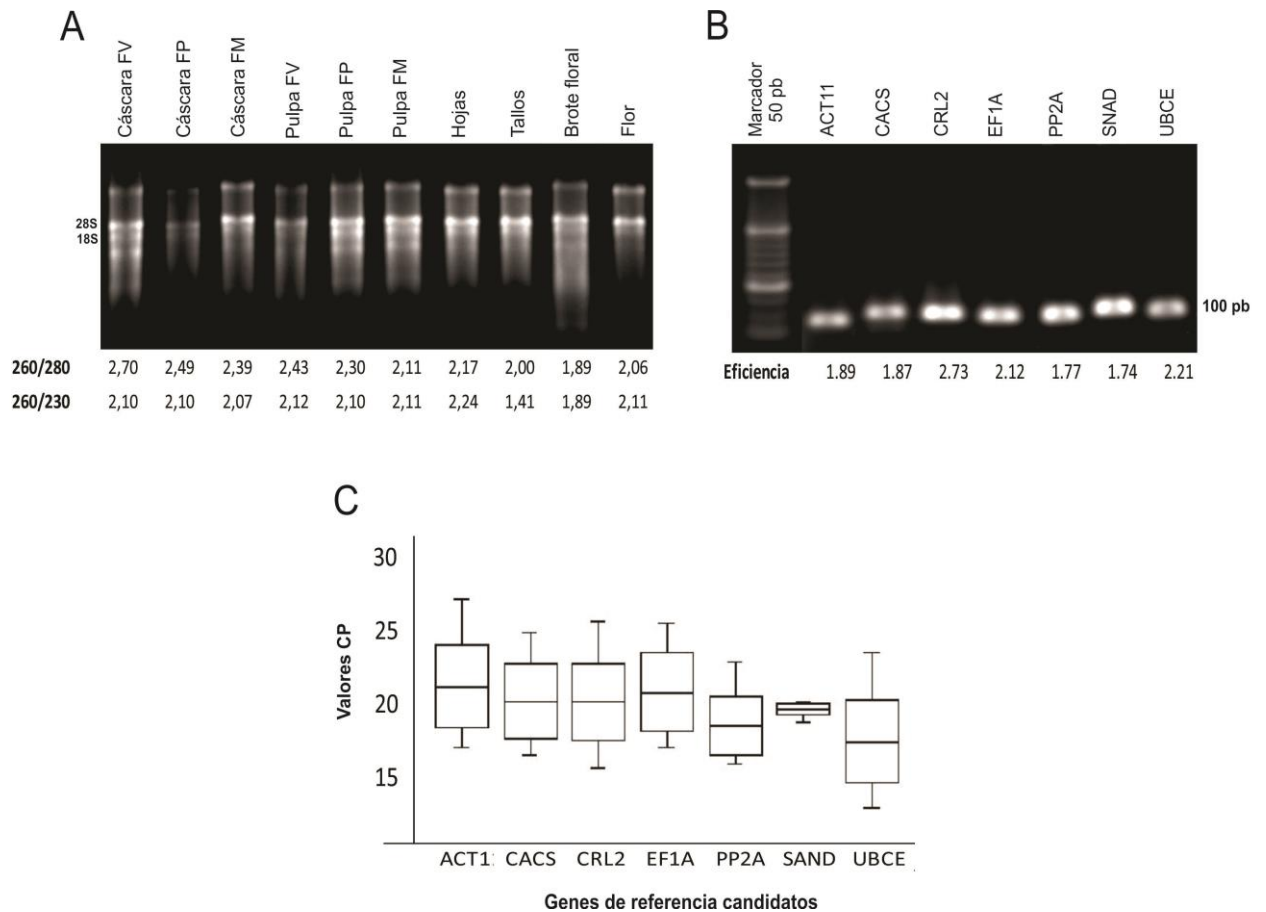


Figura 3. Datos moleculares para encontrar el gen de referencia

2. Contenido de vitamina C en hojas de *M. dubia* en diferentes condiciones de estrés

Todas las plántulas sometidas a las condiciones de estrés, a excepción de las mantenidas en oscuridad, tuvieron un aumento significativo en la concentración de vitamina C en sus hojas ($F = 449$, $df = 5$, $p < 0,001$). Esto se reflejó en las lecturas espectrofométricas de las muestras, en donde la absorbancia fue disminuyendo en función al tiempo (Anexo 3). Asimismo, las plántulas que presentaron mayor contenido de vitamina C (0,056 mg de vitamina C/mL) en sus hojas fueron las que fueron sometidas por 24 horas al sulfato de cobre (Figura 4). Mientras que las plántulas mantenidas en inundación aumentaron su contenido de vitamina C, aproximadamente 3 veces con respecto al grupo control.

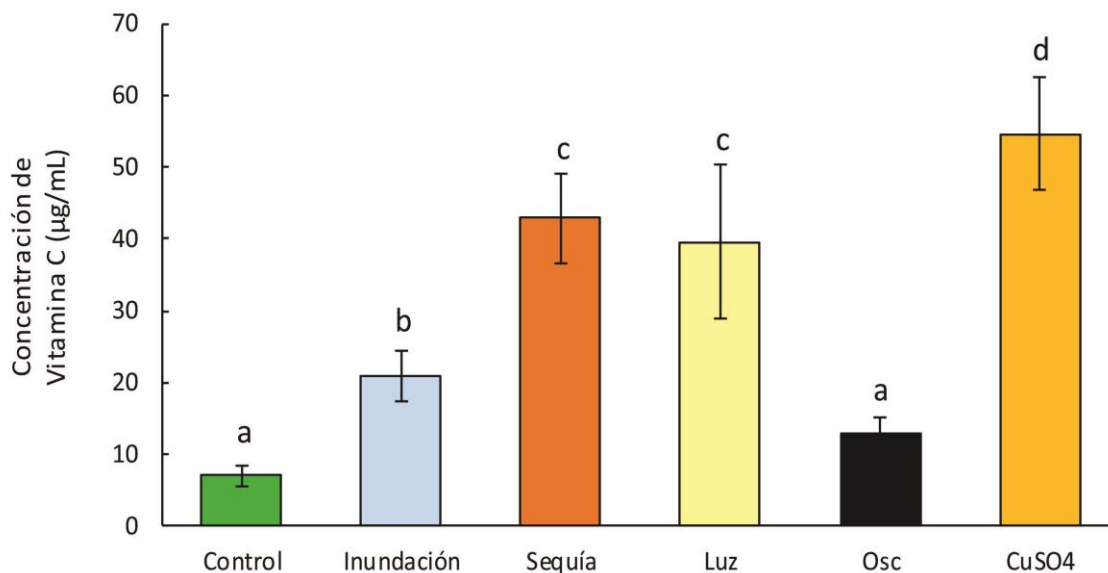


Figura 4. Concentración de Vitamina C en cada condición de estrés

3. Nivel de expresión de genes de la vía asorbato-glutación de *M. dubia* en diferentes condiciones de estrés

La expresión relativa de los genes de la vía asorbato-glutación mostraron diferencias entre las condiciones evaluadas (Figura 5). Por ejemplo, las plántulas sometidas a inundación mostraron un aumento significativo en la expresión de los genes que codifican para *APX* ($F = 122$, $df = 5$, $p < 0,001$) y *DHAR* ($F = 232$, $df = 5$, $p < 0,001$). Mientras que, en condiciones de sequía, el gen *DHAR* también incrementó sus niveles de expresión, mientras que los niveles de expresión de los otros genes evaluados fueron similares o disminuyeron con respecto al control. Sin embargo, las plántulas expuestas a luz o mantenidas en oscuridad mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de todos los genes evaluados. Finalmente, las plántulas expuestas al cobre mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión del gen *DHAR*, mientras que los otros genes disminuyeron sus niveles de expresión al comparar con el grupo control.

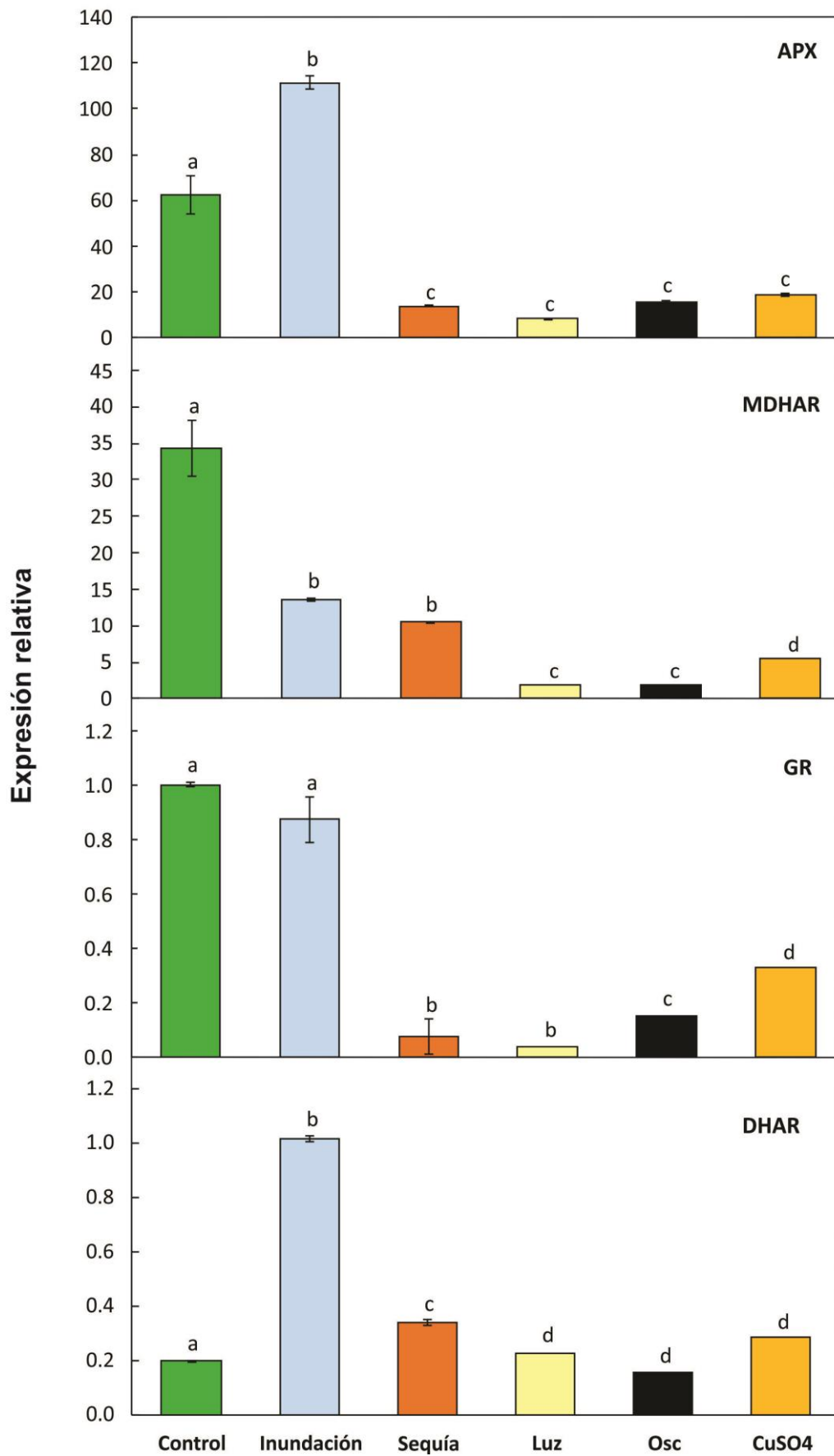


Figura 5. Nivel de expresión relativa de los genes de la vía Ascorbato-Glutatión en cada condición de estrés

V. DISCUSION

1. Estabilidad de expresión de genes de referencia candidatos

La correcta medición de la expresión génica utilizando el qRT-PCR se basa en la elección de uno o varios genes de referencia que nos permitan la normalización de los datos de expresión de los genes en estudio (25,32). Pero a pesar de que estos generalmente están asociados a procesos celulares comunes en todas las células, no es recomendable que un mismo gen de referencia sea usado para otra especie ya que podrían existir diferencias significativas en la forma en que se expresa dicho gen (33). Por ejemplo, Brunner *et al.* (34) comprobaron que los genes de referencia pueden variar su expresión en diferentes tejidos y condiciones. A pesar de esto, son pocos los trabajos realizados en plantas en donde la validación sistemática de los genes de referencia es esencial, siendo así un componente integral para la producción de datos precisos y fiables en análisis de qRT-PCR (35). Parte de esta validación es la eficiencia del qRT-PCR, que se determina con una curva de calibración empleando programas estadísticos. Investigadores como Pfaffl (36) obtuvieron eficiencias cercanas a 2, los cuales son similares a los obtenidos en este trabajo donde se usó la curva de calibración y una posterior medición de la eficiencia. Asimismo, programas como el BestKeeper facilitan el análisis de los datos para determinar la estabilidad de los genes; con esta herramienta, Pfaffl *et al.* (25) determinó la estabilidad de los genes β -actina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) y ubiquitina (UBQ) con valores aproximados de 0,75 CP ($0,74 \text{ CP} < \text{SD} < 0,79 \text{ CP}$). Con el mismo software, pero con otros genes, en este trabajo se determinó que seis de los siete genes de estudio presentan una gran variabilidad en su expresión con valores $> 1,6 \text{ CP}$, siendo *SAND* el único gen que mostró mayor estabilidad de expresión en todas las condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, estudios realizados en otras especies de plantas tales como *Cenchrus ciliaris*, *Dendrocalamus latiflorus* y *Sedum alfredii* (24,37,38) reportan una mayor estabilidad de expresión de los genes *UBCE*, *EF1A*, *ACT11*, mientras que el gen *SAND* presenta menor estabilidad de expresión. Usando otros software como el geNorm (39) y el NormFinder (40), Nicot *et al.* (41) determinaron que el gen *EF1A* es el más estable en diferentes especies de papa, mientras que los genes menos estables son los que codifican a la actina y tubulina. Datos que son contradictorios con los reportados por Kong

et al. (42) quienes muestran que el gen de la actina es el más estable y al *EF1A* como el menos estable. Adicionalmente, Die y Rowland (43) en un estudio realizado en frutos de *Vaccinium* spp. determinaron que el gen *CACS* es uno de los más estables en sus niveles de expresión, datos que contrastan con los obtenidos en este trabajo.

2. Contenido de vitamina C en hojas de *M. dubia* en diferentes condiciones de estrés

El aumento de vitamina C en las plántulas de *M. dubia* expuestas a las diferentes condiciones estresantes se puede atribuir en parte al incremento de los niveles de expresión y por ende en la cantidad de la enzima DHAR. Recientemente se ha demostrado que *M. dubia* tiene hasta cinco vías metabólicas para la biosíntesis de vitamina C (51), por lo que es posible que bajo las condiciones evaluadas varios de los genes de estas vías estén siendo activados, lo que causa un aumento de la concentración de vitamina C. Estudios hechos en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidos a fotoperiodos de luz y diferentes temperaturas han encontrado aumento en la concentración de vitamina C, que se explica por una mayor expresión de los genes de la vía Smirnov-Wheller (52,53).

3. Nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutatión de *M. dubia* en diferentes condiciones de estrés

Por otro lado, ya se conoce que la vía ascorbato-glutatión se activa en las plantas como respuesta al estrés oxidativo (44–46). Esto aumenta la síntesis de las enzimas que participan en esta vía, generando una elevada expresión relativa en los genes involucrados (47,48), manteniendo así una relación directa entre la concentración de vitamina C y los genes de esta vía (49,50). Pero este no siempre es el caso, en este trabajo se observó que solo los genes APX y DHAR incrementaron sus niveles de expresión solo en algunas condiciones estresantes. Sin embargo, es preciso indicar que APX estaría causando una disminución del contenido de vitamina C, ya que la enzima que codifica este gen cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua con la simultánea conversión del ascorbato en monodehidroascorbato disminuyendo así el pool de vitamina C. En tanto, DHAR puede contribuir con el incremento de vitamina C,

debido a que la enzima que es codificada por este gen cataliza la conversión de dehidroascorbato en ascorbato, reponiendo así los niveles de vitamina C que haya sido utilizada en los diferentes procesos bioquímicos. El comportamiento de ambos genes se puede atribuir a una respuesta normal de la planta ya que esta especie en su medio natural queda sumergida varios meses durante la creciente de los ríos, esto genera una demanda de vitamina C en respuesta al estrés oxidativo. Esto podría inducir a que la planta eleve la expresión de genes involucrados directamente en la síntesis de vitamina C para así mantener el pool de este componente.

Trabajos como los de Li *et al.* (54) demuestran una elevada expresión de genes de la vía Smirnoff-Wheller y un elevado contenido de vitamina C durante el desarrollo de hojas de *Malus domestica* (manzana); a su vez indican que la expresión de DHAR se correlaciona con la concentración de vitamina C. Ma y colaboradores (49) reportan datos similares en hojas de *M. domestica* con un aumento en la expresión de los genes APX, DHAR, MDHAR, GR y la concentración de vitamina C luego de 2 horas de exposición a altas temperaturas. Otros estudios revelan que durante la maduración artificial de semillas de arroz los niveles de GR y DHAR presentan cambios mientras que la de APX, MDHAR disminuye, atribuyendo esto a complejos mecanismos de regulación (55) que están determinados por factores como el genotipo, crecimiento, estrés, etc. (48,56,57).

VI. CONCLUSIONES

1. De todos los genes de referencia candidatos analizados, solo el gen *SAND* mostró mayor estabilidad de expresión en todos los tejidos (hojas, frutos, botones florales y flores) y condiciones de estrés (inundación, sequía, luz, oscuridad y exposición a sulfato de cobre). Por tanto, el gen *SAND* es apropiado para ser empleado como gen de referencia para estudios de expresión genética en *M. dubia*.
2. Todas las condiciones de estrés, excepto las condiciones de oscuridad, indujeron la acumulación de vitamina C en las hojas de las plántulas de *M. dubia*. Pero las plántulas expuestas a sulfato de cobre fueron las que acumularon significativamente mayores niveles de vitamina C.
3. En las diferentes condiciones de estrés, se encontró mayor concentración de vitamina C en las muestras sometidas a CuSO_4 , esto no guardó relación con el nivel de expresión de los genes de la vía ascorbato-glutación. Por lo que otras vías estarían funcionando en respuesta a este tipo de condición estresante.
4. La relación entre la producción de vitamina C en condiciones de estrés y la expresión de los genes involucrados en la vía ascorbato-glutación mostró que solo los genes APX y DHAR incrementaron sus niveles de expresión de manera significativa en la condición estresante de "Inundación". Sin embargo, solo el gen DHAR estaría implicado en el aumento del contenido de vitamina C debido a su relación con transformación de dehidroascorbato en ascorbato. Esto sugiere que no solo la vía ascorbato-glutación estaría involucrada en los niveles de vitamina C, sino que las demás vías metabólicas de biosíntesis de este componente también estarían participando en la respuesta al estrés y consecuentemente en el aumento de los niveles de esta vitamina.

VII. RECOMENDACIONES

Por diversos factores algunos aspectos deben considerarse para realizar un mejor trabajo de investigación, estas recomendaciones son:

- Realizar un qRT-PCR en el momento cero de cada condición experimental, esto permitirá minimizar el error en los análisis estadísticos.
- Hacer una cuantificación de vitamina C y un qRT-PCR a las 6, 12 y 18 horas en cada condición experimental. Así se podrá ver como fluctúa la concentración de vitamina C así como la expresión de los genes involucrados en la vía de reciclaje.
- Hacer un análisis en condiciones de estrés de las diferentes vías por las cuales *M. dubia* sintetiza vitamina C, esto con el fin de determinar cuál de todas las vías sería la responsable de respuesta a las condiciones de estrés y por tanto la que estaría elevando la concentración de vitamina C.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Correa I, Sixto BZ, Luz SS. Víctor et al. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci Agropecu.* 2011;2(3):123–130.
2. Biocomercio CVY, Andina UM. Departamento de Economía. 2013 [citado 30 de marzo de 2014]; Disponible en: <http://departamento.pucp.edu.pe/economia/images/documentos/DDD363.pdf>
3. Unión Europea, Ministerios de Comercio Exterior y Turismo. Sistematización de experiencias en la cadena de camu camu para la propuesta de un sistema de gestión de información. Lima: Proyecto de cooperación UE – Perú en materia de asistencia técnica relativa al comercio; 2009 may p. 45.
4. Rodríguez HF. Estadística Agroindustrial 2013. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos Ministerio de Agricultura y Riego; 2014.
5. Castro Gómez JC, Gutiérrez Rodríguez F, Acuña Amaral C, Cerdeira Gutiérrez LA, Tapullima Pacaya A, Cobos Ruiz M, et al. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* "camu camu". *Rev Soc Quím Perú.* 2013;79(4):319–330.
6. Valderrama C. Exportaciones peruanas. #001. junio de 2011;#1:22.
7. Akter MS, Oh S, Eun J-B, Ahmed M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Res Int.* 2011;44(7):1728–1732.
8. Justi KC, Visentainer JV, Evelázio de SN, Matsushita M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch Latinoam Nutr.* 2000;50(4):405–408.
9. Correa SI, Zamudio LB, Solís VS, Cruz CO. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci Agropecu.* 2011;2(3):123–130.
10. Teixeira AS, Chaves L da S, Yuyama K. Esterases no exame da estrutura populacional de camu-camu *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae. *Acta Amaz.* 2004;34(1):75–88.
11. Cobos M. Nivel de expresión genética de la L-Galactono- 1,4-lactona deshidrogenasa y su relación con el contenido de la vitamina C en *Myrciaria dubia*

(HBK) McVaugh «camu camu» [Tesis Doctoral]. [Iquitos - Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2013.

12. Egoávil A. 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 de Biólogo]. [Iquitos - Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2012.
13. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.* 2004;9(12):573–577.
14. Medina LMC. Respuesta fisiológica y metabólica a la toxicidad por boro en plantas de tomate. Estrategias de tolerancia. 21 de julio de 2014 [citado 21 de julio de 2014]; Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/18068960.pdf>
15. Jiménez S. J de la C, Moreno F. LP, Magnitskiy S. Respuesta de las plantas al estrés por inundación. Una revisión. *Rev Colomb Cienc Hortic.* 2012;6(1):96-109.
16. Acuña Amaral C, Cerdeira Gutiérrez L. Comparación de la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-Asada entre plantas de *Myrciaria dubia* “camu-camu” que producen frutos de alto y bajo contenido de vitamina C [Tesis de Químico Farmacéutico]. [Iquitos - Perú]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2013.
17. Rodrigues RB, De Menezes HC, Cabral L, Dornier M, Reynes M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Fruits.* 2001;56(05):345–354.
18. Inga H, Pinedo M, Delgado C, Linares C, Mejía K. Fenología reproductiva de *Myrciaria dubia* McVaugh (HBK) camu camu. *Folia Amaz.* 2001;12(1-2):99–106.
19. Pinedo M, Anguiz R, Linares C, Mendoza H. Plan de mejoramiento genético de camu camu [Internet]. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana; 2004 [citado 8 de diciembre de 2014]. Disponible en: <http://www.ibcperu.org/doc/isis/mas/7375.pdf>
20. Aranha FQ, Barros ZF, Moura LSA, Gonçalves M da CR, Barros JC de, Metri JC, et al. The role of vitamin C in organic changes in aged people. *Rev Nutr.* 2000;13(2):89–97.
21. Smirnoff N, Conklin P, Loewus F. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001;52:437-67.

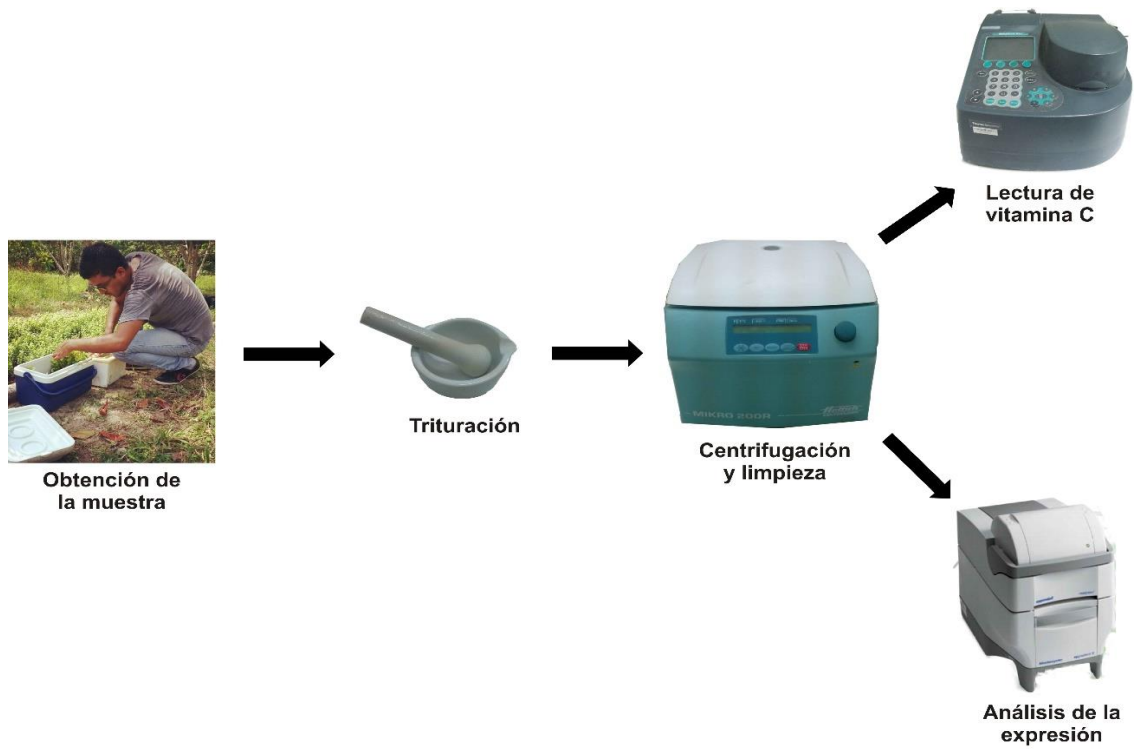
22. Aranha FQ, Barros ZF, Moura LSA, Gonçalves M da CR, de Barros JC, Metri JC, et al. O papel da vitamina c sobre as amina c sobre as alterações orgânicas no idoso terações orgânicas NO IDOSO1. *Rev Nutr.* 2000;13(2):89–97.
23. Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, et al. Arabidopsis VTC2 Encodes a GDP-I-Galactose Phosphorylase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheeler Pathway to Ascorbic Acid in Plants. *J Biol Chem.* 29 de junio de 2007;282(26):18879-85.
24. Liu M, Jiang J, Han X, Qiao G, Zhuo R. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qRT-PCR data in *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *PLoS One.* 2014;9(2):e87417.
25. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26(6):509–515.
26. Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell.* 2008;20(7):1734–1735.
27. Le Bail A, Scholz S, Kost B. Evaluation of reference genes for RT qPCR analyses of structure-specific and hormone regulated gene expression in *Physcomitrella patens* gametophytes. *PLoS One.* 2013;8(8):e70998.
28. Gómez JCC, Reátegui ADCE, Flores JT, Saavedra RR, Ruiz MC, Correa SAI. Isolation of high-quality total RNA from leaves of *Myrciaria dubia* “camu camu”. *Prep Biochem Biotechnol.* 2013;43(6):527–538.
29. Stephenson F. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology.* Vol. 1. United States of America: Academic Press; 2013.
30. Vermeir S, Hertog M, Schenk A, Beullens K, Nicolai BM, Lammertyn J. Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast l-ascorbic acid quantification in fruit and vegetables. *Anal Chim Acta.* 2008;618(1):94–101.
31. Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT–PCR data. *Bioinformatics.* 2003;19(11):1439–1440.
32. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(4):856–862.
33. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A, et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004;37:112–119.

34. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol.* 2004;4(1):1.
35. Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot.* 2009;60(2):487–493.
36. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45–e45.
37. Sang J, Han X, Liu M, Qiao G, Jiang J, Zhuo R. Selection and validation of reference genes for real-time quantitative PCR in hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* under different heavy metals stresses. *PloS One* [Internet]. 2013 [citado 10 de mayo de 2016];8(12). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858333/>.
38. Simon B, Conner JA, Ozias-Akins P. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in apomictic and sexual *Cenchrus ciliaris*. *BMC Res Notes.* 2013;6(1):397.
39. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):research0034–1.
40. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245–5250.
41. Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot.* 2005;56(421):2907–2914.
42. Kong Q, Yuan J, Niu P, Xie J, Jiang W, Huang Y, et al. Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription quantitative real-time PCR analysis in melon. *PloS One.* 2014;9(1):e87197.
43. Die JV, Rowland LJ. Superior cross-species reference genes: a blueberry case study. *PloS One.* 2013;8(9):e73354.
44. Chen Z, Young TE, Ling J, Chang S-C, Gallie DR. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(6):3525–3530.

45. Goo Y-M, Chun HJ, Kim T-W, Lee C-H, Ahn M-J, Bae S-C, et al. Expressional characterization of dehydroascorbate reductase cDNA in transgenic potato plants. *J Plant Biol.* 2008;51(1):35–41.
46. Qin A, Shi Q, Yu X. Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. *Mol Biol Rep.* 2011;38(3):1557–1566.
47. Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, et al. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell.* 2001;13(4):889–905.
48. Tsai Y-C, Hong C-Y, Liu L-F, Kao CH. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. *J Plant Physiol.* 2005;162(3):291–299.
49. Ma Y-H, Ma F-W, Zhang J-K, Li M-J, Wang Y-H, Liang D. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate–glutathione cycle in apple leaves. *Plant Sci.* 2008;175(6):761–766.
50. Baek K-H, Skinner DZ. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 2003;165(6):1221–1227.
51. Castro JC, Maddox JD, Cobos M, Requena D, Zimic M, Bombarely A, et al. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. *BMC Genomics.* 2015;16(1):1.
52. Gest N, Garchery C, Gautier H, Jiménez A, Stevens R. Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnol J.* 2013;11(3):344–354.
53. Massot C, Bancel D, Lauri FL, Truffault V, Baldet P, Stevens R, et al. High temperature inhibits ascorbate recycling and light stimulation of the ascorbate pool in tomato despite increased expression of biosynthesis genes. *PloS One.* 2013;8(12):e84474.
54. Li M, Ma F, Guo C, Liu J. Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(4):216–224.
55. Yin G, Xin X, Song C, Chen X, Zhang J, Wu S, et al. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate–glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiol Biochem.* 2014;80:1–9.

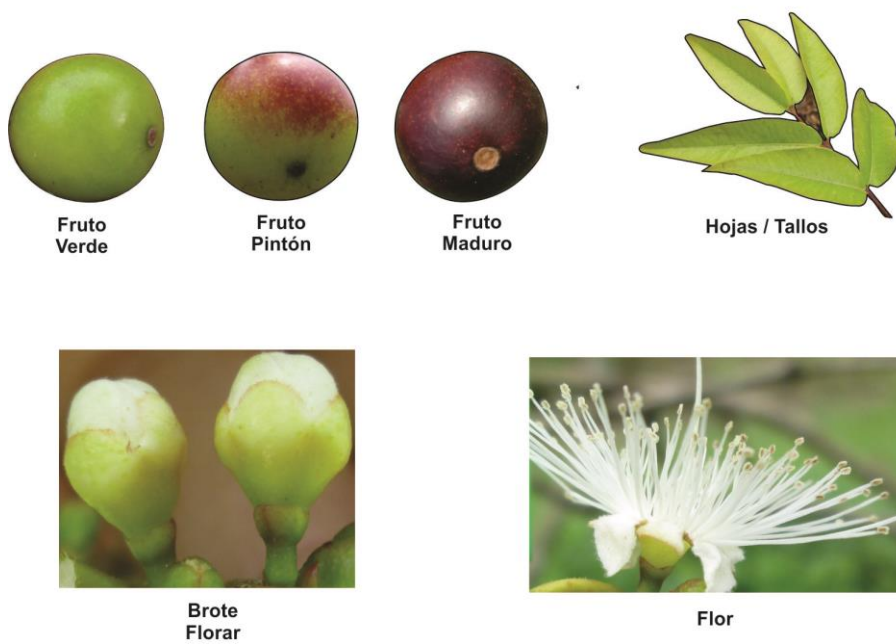
56. Blauer JM, Kumar GM, Knowles LO, Dhingra A, Knowles NR. Changes in ascorbate and associated gene expression during development and storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Postharvest Biol Technol.* 2013;78:76–91.
57. Xu Y, Zhu X, Chen Y, Gong Y, Liu L. Expression profiling of genes involved in ascorbate biosynthesis and recycling during fleshy root development in radish. *Plant Physiol Biochem.* 2013;70:269–277.

IX. ANEXOS

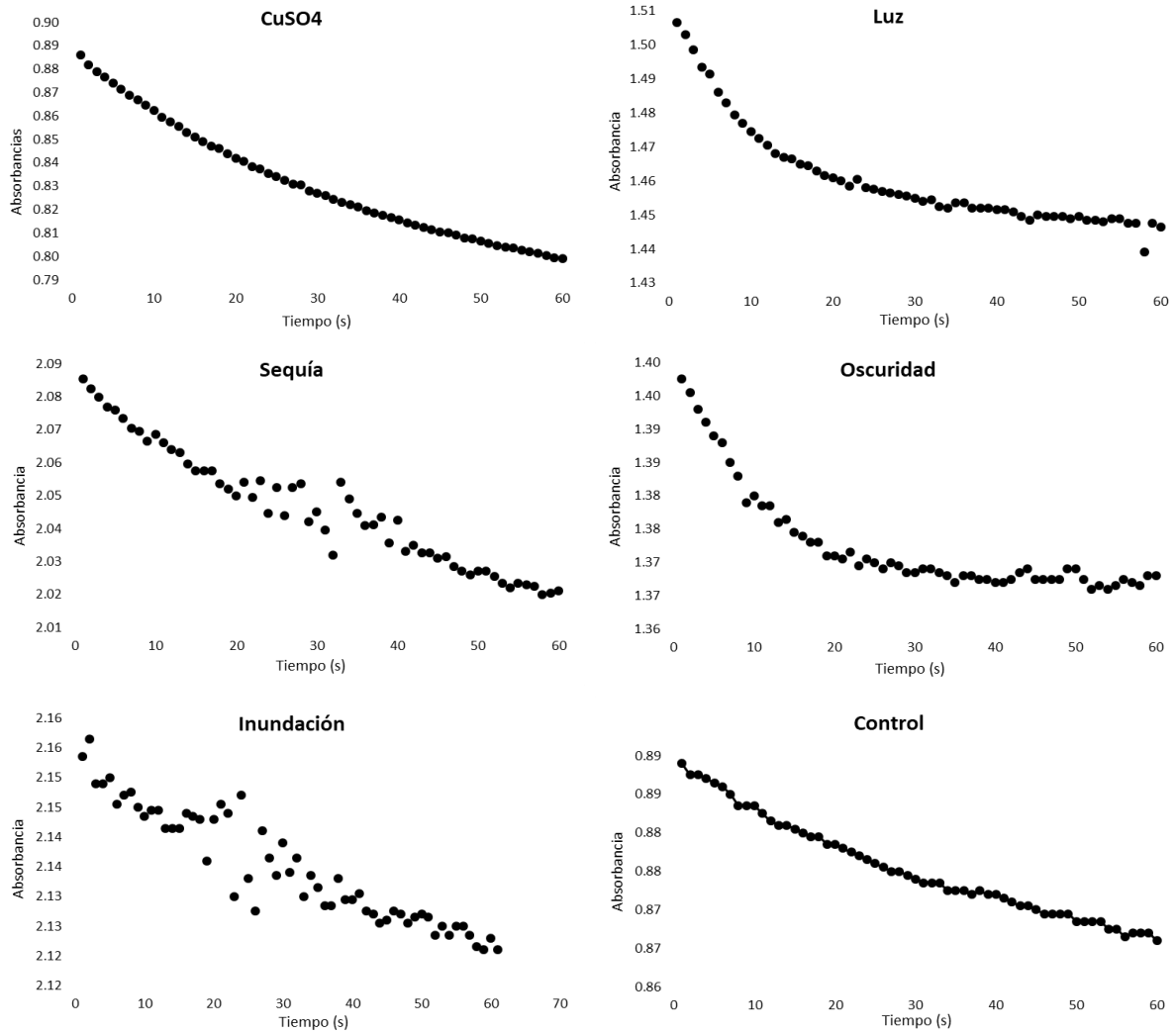


Anexo 1. Flujograma de procesos: cuantificación de vitamina C y análisis de expresión relativa

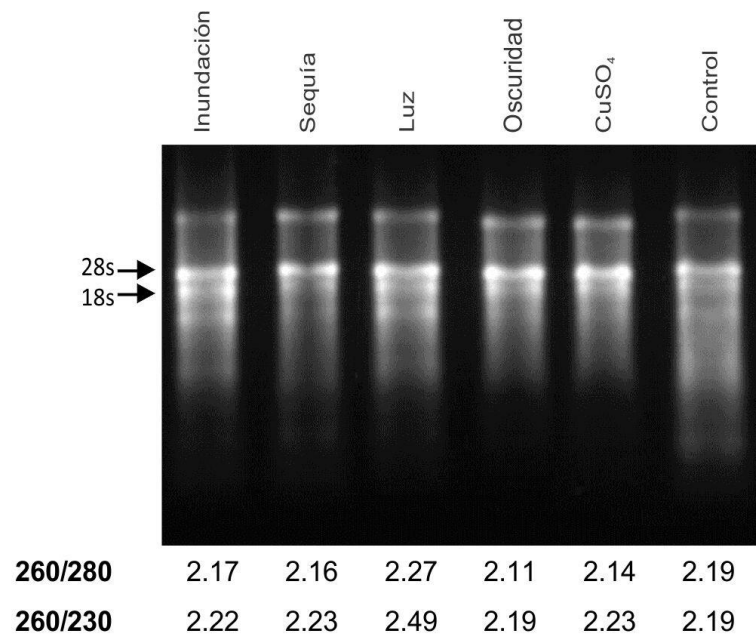
Tejidos de camu camu



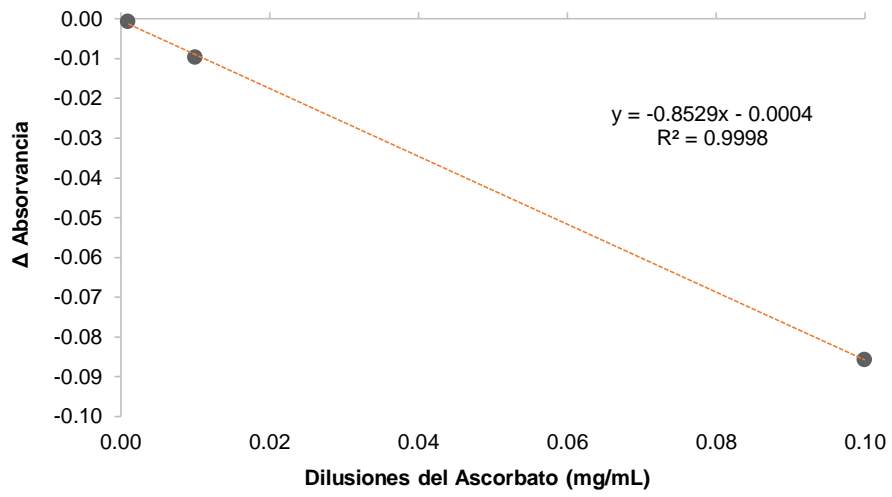
Anexo 2. Tejidos de camu camu usados para la obtención de ARN



Anexo 3. Lecturas de absorbancias en cada condición de estrés



Anexo 4. Ratios de calidad y electroforesis del ARN de hojas.



Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de vitamina C