

CLONACIÓN Y FILOGENIA MOLECULAR DE UN SEGMENTO DEL GEN CODANTE DE LA ACTINA DE *MYRCIARIA DUBIA* "CAMU-CAMU": UN CANDIDATO PARA GEN DE REFERENCIA

Juan C. Castro Gómez,^{1*} Marianela Cobos Ruiz,¹ Alina Egoavil Reátegui,¹ Roberson Ramírez Saavedra,¹ Sixto Imán Correa,² Pedro Adrianzen Julca,¹ Jorge Marapara Del Aguila¹

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

²Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)-Estación Experimental San Roque.

*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

RESUMEN

Myrciaria dubia "camu-camu" es un frutal amazónico caracterizado por su amplia variación de vitamina C. Pero los estudios genético moleculares que puedan explicar esta variación son limitados. Por ello nuestro objetivo fue realizar la clonación y filogenia molecular de un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia*. Las muestras fueron obtenidas de la colección de germoplasma del INIA. Luego, el ARN fue purificado y mediante RT-PCR con cebadores degenerados se amplificó un segmento del gen. En base a la secuencia obtenida se diseñaron cebadores específicos para PCR en tiempo real. Los resultados muestran que se ha aislado, clonado y secuenciado un segmento del gen codante de actina de *M. dubia* y detectado su expresión en hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia*. Así, con el soporte de herramientas bioinformáticas y uso de técnicas de biología molecular hemos aislado, clonado y secuenciado un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia*. Asimismo, los análisis realizados muestran que el gen se expresa y presenta niveles similares de expresión en hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia*. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos a fin de verificar su estabilidad de expresión.

Palabras clave: Clonación, filogenia molecular, *Myrciaria dubia*, expresión genética, gen de referencia.

MOLECULAR CLONING AND PHYLOGENY OF A SEGMENT OF ACTIN GENE CODING FROM *MYRCIARIA DUBIA* "CAMU-CAMU": A CANDIDATE FOR REFERENCE GENE

ABSTRACT

Myrciaria dubia "camu-camu" is an amazonian fruit tree characterized for its ample variation in vitamin C. But molecular genetic studies that explains this variation are limited. Hence our objective was to accomplish cloning and molecular phylogeny of the segment of actin coding gene from *M. dubia*. The samples were obtained from germoplasma's collection of the INIA. Next, the ARN was purified and by RT-PCR with degenerate primers was amplified a segment of the gene. After, on the basis of the sequence obtained, specific primers were designed for real time PCR. Results showed that was isolated, cloned and sequenced a segment of actin gene coding from *M. dubia*. Thus with the support of bioinformatics tools and molecular biology techniques we have isolated, cloned and sequenced a segment of actin coding gene from *M. dubia*. Additionally, analyses showed that the gene have similar expression levels in leaves, pulp and peel from *M. dubia*. However, it is necessary to realize more experiments in order to verify its expression stability.

Keywords: cloning, molecular phylogenie, *Myrciaria dubia*, genetic expression, reference gene.

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia (Kunth) McVaught "camu-camu" es un frutal amazónico caracterizado por sus frutos con alto contenido de vitamina C (>2000mg/100 g pulpa) y otras sustancias de interés farmacológico (Bradfield y Roca 1964, Inoue *et al.* 2008). Pero, la producción de estas sustancias es muy variable (Zanatta *et al.* 2005). Esta peculiaridad representa un problema para todos los actores de la cadena productiva y de comercialización de *M. dubia*, porque no pueden ofrecer productos de alta calidad y con contenidos semejantes de vitamina C. Por tanto, la demanda de los productos de *M. dubia* puede disminuir en los mercados locales, nacionales e internacionales y afectar seriamente a los involucrados en las actividades económicas relacionadas a esta especie de planta.

La amplia fluctuación de las sustancias mencionadas, particularmente de la vitamina C, puede estar controlada genéticamente. Puesto que, investigaciones recientes realizadas por Castro *et al.* (2010), muestran que las plantas de *M. dubia* de la colección de germoplasma del INIA tienen amplia variación en la cantidad de vitamina C (650 a 2500 mg vit C/100g pulpa). Es preciso indicar que la colección está compuesta por plantas provenientes de ocho cuencas hidrográficas de la región amazónica (Imán 2000) y están sembradas en una zona que probablemente presenta suelos de composición química similar y tienen la misma influencia de otros factores ambientales (temperatura, humedad, intensidad luminosa, fotoperiodo, etc). Por ende, las diferencias en la producción de vitamina C, entre estas plantas de la colección, se pueden atribuir primariamente a factores genéticos moleculares que afectan las vías biosintéticas de vitamina C y otros procesos relacionados (transporte de nutrientes minerales y de precursores biosintéticos, fotosíntesis, entre otros). Al comprender cómo influyen los factores genéticos en la producción de vitamina C estaremos en condiciones de incrementar y uniformizar su producción mediante mejoramiento genético e ingeniería metabólica.

Sin embargo, para poder estudiar cómo los factores genéticos moleculares, por ejemplo las diferencias en la expresión de genes codantes de enzimas de las vías biosintéticas, afectan la producción de vitamina C en *M. dubia*, es necesario contar con genes de referencia validados. Uno de los genes frecuentemente empleados como gen de referencia para estudios de expresión genética en plantas es el que codifica la actina. Debido a sus múltiples roles en las células frecuentemente tiene expresión constante en varios tejidos vegetales y en diferentes condiciones (Czechowski *et al.* 2005, Bulley *et al.* 2009). Pero, aún estamos limitados para realizar estudios de expresión genética en *M. dubia*, a causa de que hasta ahora no disponemos de la secuencia del gen codante de la actina de esta especie, por esta razón hemos ejecutado esta investigación, cuyo objetivo fue "Realizar la clonación y filogenia molecular de un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia* "camu-camu".

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las hojas y frutos de *M. dubia* fueron obtenidos de la colección de germoplasma de camu-camu, de la estación 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. Las muestras extraídas fueron transportadas en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Biotecnología del CIRNA-UNAP, donde se almacenaron a -80°C, las que posteriormente fueron procesadas para purificar el ARN.

Purificación y análisis del ARN total

El ARN total se purificó a partir de hojas y frutos (pulpa y cáscara) de *M. dubia* con el protocolo modificado de Zeng y Yang (2002). La modificación consistió en lo siguiente: primero se excluyó el uso de nitrógeno líquido para pulverizar la muestra. Segundo, se empleó ARNt de levadura para facilitar la precipitación del ARN total y finalmente se utilizó una desoxirribonucleasa recombinante

para hidrolizar el ADN genómico contaminante de las muestras parcialmente puras obtenidas. También se acortó el tiempo de 14 h a 4 h.

La calidad y cantidad del ARN total purificado se determinó según Sambrook *et al.* (1989) con un espectrofotómetro (Genesys 6, Thermospectronic). De cada muestra se midieron sus absorbancias a 230, 260 y 280 nm, para estimar sus ratios de calidad $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. La cantidad del ARN total purificado se estimó con la ecuación: $\text{ARN } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$. Para comprobar la integridad del ARN y ausencia de ADN contaminante, se realizó la corrida electroforética en un gel desnaturalizante de agarosa al 1%. Los geles fueron fotografiados con el equipo Bio Doc Analyze (Kodak, Rochester, NY).

Diseño de cebadores degenerados

Se buscaron y descargaron del GenBank las secuencias XM_002282480.1 (*Vitis vinifera*), NM_179953.2 (*Arabidopsis thaliana*) y XM_002298674.1 (*Populus trichocarpa*). Luego, estas se alinearon con el programa ClustalW2. Las secuencias alineadas fueron ingresadas al programa SC Primer para diseñar los cebadores degenerados. De la lista de cebadores generada se seleccionó el par 5'-TYGTYTGYGACAATGGAAC-3' (*Mdactdf*) y 5'-ATTGTAGAAWGTGTGATGCCAA-3' (*Mdactdr*). Estos cebadores hibridan en el exón 2 y 3 respectivamente y flanquean al intrón dos del gen homólogo *ACT1* de *A. thaliana*. Los cebadores nos permiten amplificar un producto de 254 pb (a partir de ADNc) ó 390 pb (a partir de ADN genómico).

Transcripción reversa y PCR

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 1,5 μg de ARN total (de hoja, pulpa o cáscara), se usó la transcriptasa reversa MuLV y oligo(dT)₁₆, siguiendo las instrucciones del Kit GeneAmp®-RNA PCR Core (Applied Biosystems). La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf a 25°C por 10 min, 42°C por 60 min, 99°C por 5 min y 5°C por 5 min. El ADNc sintetizado fue usado para amplificar un segmento del gen actina 1 de *M. dubia* (254 pb) a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los componentes para la reacción de PCR fueron: Buffer 1X, MgCl_2 3 mM, dNTPs 0,8 mM, cebadores degenerados *Mdactdf* (5'-TYGTYTGYGACAATGGAAC-3') y *Mdactdr* (5'-ATTGTAGAAWGTGTGATGCCAA-3') 0,75 μM de cada uno, Taq polimerasa 0,4 U, ADNc 2 μl y agua csp 20 μl . Las amplificaciones se realizaron en un termociclador eppendorf bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 45 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 10 min y 4°C por 10 min. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (mas bromuro de etidio 70 $\mu\text{g/ml}$) según Sambrook *et al.* (1989). Los geles fueron fotografiados con el equipo Bio Doc Analyze.

Secuenciamiento

Los productos de PCR obtenidos a partir del ADNc (254 pb) fueron purificados a partir del gel de agarosa empleando el Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, CA, USA) y clonados en el vector pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El segmento clonado fue secuenciado con los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse en un termociclador ep gradient (eppendorf) de acuerdo al kit BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems), empleando 500 ng del plásmido purificado. Los productos de secuenciado fueron resueltos por electroforesis capilar en un analizador genético 3130XL (Hitachi, Applied Biosystems).

Diseño de cebadores para PCR en tiempo real

En base a la secuencia obtenida del gen *ACT1* de *M. dubia* se procedió a diseñar los cebadores específicos con el programa Allele ID 6,0. Para poder tener el mejor par de cebadores se establecieron varios niveles de selección. El primer nivel fue en el momento del diseño al establecer los siguientes criterios: Tm de 60°C, tamaño del amplicón 50 a 100pb, contenido de GC de 35-55%. Los cebadores obtenidos fueron sometidos al segundo nivel de selección mediante análisis con el programa OligoAnalyzer. Con este programa se seleccionó los cebadores que no forman estructuras secundarias, homodímeros o heterodímeros termodinámicamente estables ($\Delta G > -10$). El tercer nivel de selección se realizó con el programa MFOLD, que nos permitió elegir 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. Los cebadores para PCR en tiempo real que cumplieron con todas las exigencias señaladas fueron: *Mdactef*: 5'-AACAATGCTGGGGAAGACTGC-3' y *Mdacter*: 5'-ATGGAACTGGAATGGTGAAGGC-3' que permiten amplificar un segmento de 71 pb.

PCR en tiempo real

Para la reacción se empleó el SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems). Los componentes de la reacción fueron: 10x SYBR Green PCR Buffer 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,8 mM, cebadores *MdAct1f*: 5'-AACAATGCTGGGGAAGACTGC-3' y *Mdact1r*: 5'-ATGGAACTGGAATGGTGAAGGC-3' 0,5 μM de cada uno, Amplitaq Gold 0,025 U/μl, AmpErase UNG 0,01 U/μl, ADNc (diluido 1:5, obtenido de hojas, pulpa o cáscara) 2 μl y agua csp 20 μl. Las condiciones de amplificación en un termociclador Eppendorf ep RealplexS⁴ fueron: un ciclo de 50°C por 2 min, un ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 60°C por 1 min (detección de la señal fluorescente), y para el análisis de la curva de fusión se empleó un ciclo de 95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg y aumento gradual de la temperatura por 20 min hasta 95°C por 15 seg.

Análisis bioinformático

Las secuencias nucleotídicas "crudas" obtenidas del analizador genético fueron analizadas con el programa Sequencing analysis 2,5. La identidad de la secuencia nucleotídica se verificó investigando la base de datos de nucleótidos del GenBank empleando el programa BLAST®/blastn. Asimismo, la secuencia de nucleótidos traducida se empleó para buscar proteínas idénticas en las bases de datos REFSEQ-PROTEIN, SWISSPROT y PDB utilizando el programa BLAST®/blastx, para realizar la anotación correcta de la secuencia. Las secuencias relacionadas (nucleótidos y aminoácidos) obtenidas del GenBank se alinearon con el programa ClustalW2 y MUSCLE. Luego, las secuencias alineadas fueron empleadas para construir los filogramas moleculares con el programa Mega 5,1. Para determinar las posiciones más conservadas de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas alineadas se empleó el programa WebLogo 3,3. Asimismo, se empleó el programa Rasmol 2,6 para mostrar en la estructura tridimensional de una actina homóloga el dominio codificado por el segmento del gen *ACT1* de *M. dubia*. La eficiencia de los cebadores específicos empleados en el PCR en tiempo real y el C_T de las amplificaciones se determinaron con el programa LinRegPCR.

RESULTADOS

Con las estrategias empleadas se logró aislar, clonar y secuenciar un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia*. Lo mencionado se evidencia con los amplicones de tamaños esperados que fueron obtenidos al realizar el PCR con los cebadores degenerados (Fig. 1). Además, el amplicón (254 pb) clonado y secuenciado se verificó su identidad genética al comparar mediante análisis BLAST con las secuencias disponibles en el GenBank. Cabe indicar que la secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del GenBank con código de acceso JX569368.1.

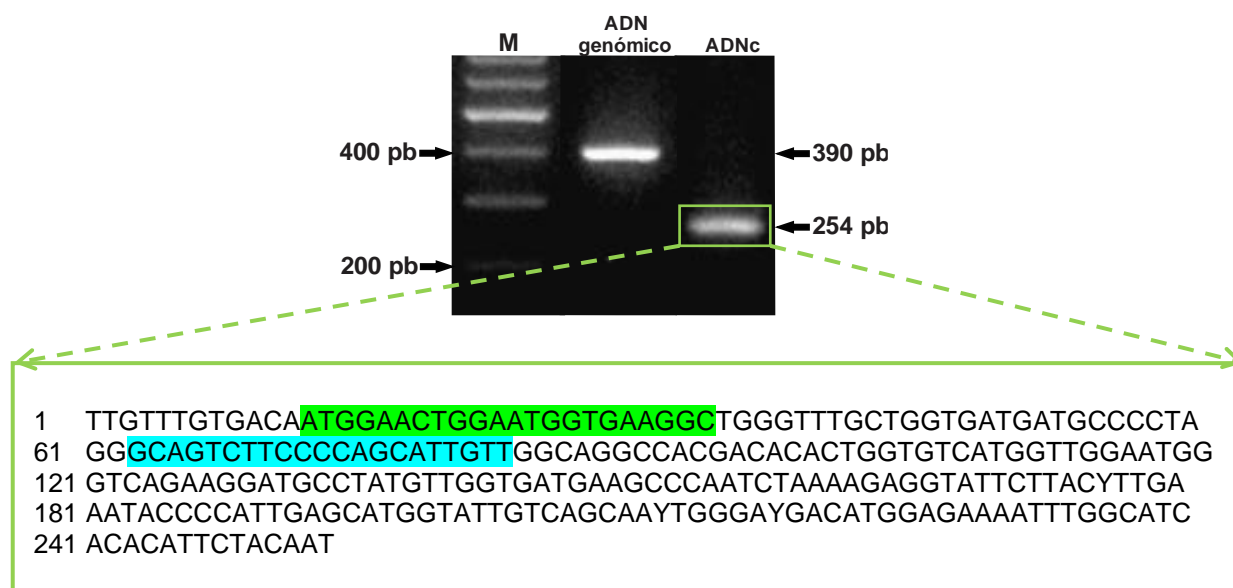


Figura 1. Amplicones obtenidos a partir de ADN genómico y ADNc con cebadores degenerados y secuencia del segmento del gen de *M. dubia*. Las áreas sombreadas son las zonas de hibridación de los cebadores específicos empleados en el PCR en tiempo real. M: marcador de peso molecular.

Al alinear la secuencia obtenida del gen codante de actina de *M. dubia* con otras secuencias similares encontradas en el GenBank, se observa que los cambios en las posiciones nucleotídicas fueron comunes en el tercer nucleótido de cada codón (Fig. 2). En la representación gráfica del alineamiento se nota que de los 84 codones, 65 presentaron cambios entre las 10 especies de plantas analizadas. Los cambios ocurrieron comúnmente en la tercera posición de los codones (91%) y con menos frecuencia fueron los cambios simultáneos en el primer y tercer nucleótido del codón (9%).

Además, el árbol filogenético molecular obtenido en base a las secuencias alineadas, presenta dos clados bien definidos (Fig. 2). El primer clado consta de dos subclados, en el que se observa que *M. dubia* muestra mayor similitud genética con *Ricinus communis* y *Populus trichocarpa*, pero menor similitud genética con las especies del otro subclado, conformado por *Vitis vinifera*, *Glycine max* y *Medicago truncatula*. También, es notorio que *M. dubia* presenta mayor distancia genética con las especies del género *Arabidopsis*, *Zea mays* y *Sorghum bicolor*, quienes forman un clado separado de las demás especies analizadas.

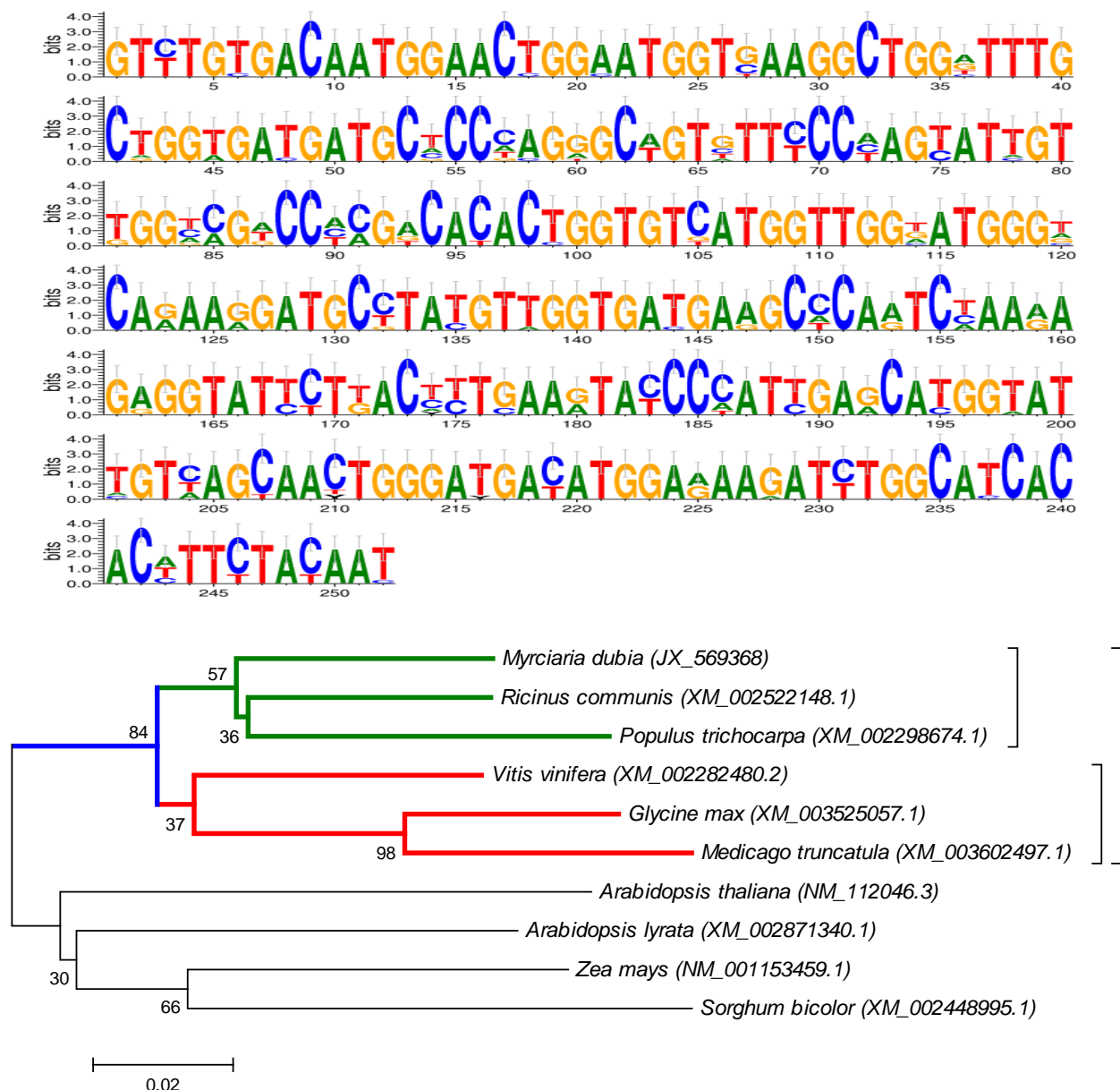


Figura 2. Representación gráfica del alineamiento múltiple y de las relaciones filogenéticas de las secuencias nucleotídicas del segmento de actina de *M. dubia* con las secuencias respectivas de nueve especies de plantas. Entre paréntesis se muestran los códigos de las secuencias registradas en el GenBank.

En contraste a las diferencias observadas en la secuencia nucleotídica de las diez especies analizadas, la secuencia de aminoácidos correspondiente muestra el 100% de identidad (Fig. 3). Como se muestra en la representación gráfica del alineamiento, todas las posiciones de los aminoácidos están conservadas en las especies analizadas. También, en la figura 3 se observa que la secuencia de aminoácidos constituye un dominio funcional altamente conservado de la proteína actina que interactúa con el ATP y presenta actividad de ATPasa. Este dominio funcional estructuralmente consta de dos alfa hélices (fucsia), dos hojas plegadas beta (amarillo) y un giro beta (blanco).

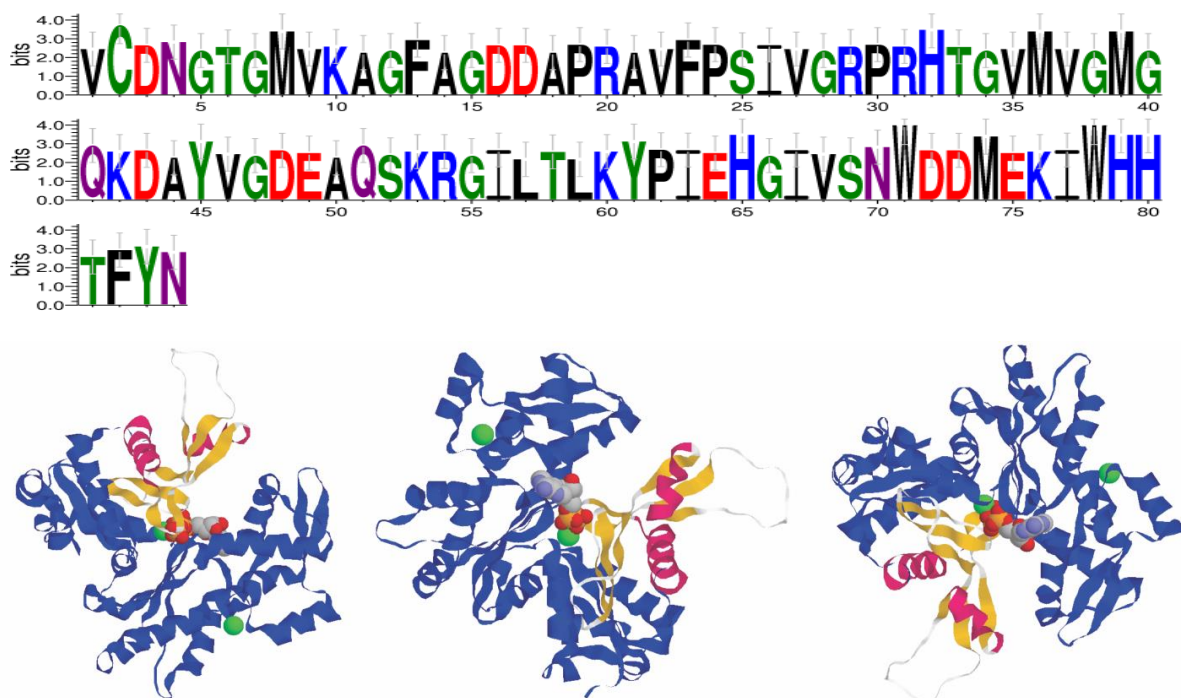


Figura 3. Representación gráfica del alineamiento múltiple y diferentes vistas de la proteína actina (PDB:3EKS) mostrando el dominio funcional (amarillo, fucsia y blanco) codificado por el segmento del gen codante de actina de *M. dubia*. Para el alineamiento se empleó la secuencia aminoacídica deducida de *M. dubia* y las secuencias respectivas de las especies: *A. lyrata* (XP_002871386.1), *A. thaliana* (NP_187818.1), *G. max* (XP_003525105.1), *M. truncatula* (XP_003602545.1), *P. trichocarpa* (XP_002298710.1), *R. communis* (XP_002522194.1), *S. bicolor* (XP_002449040.1), *V. vinifera* (XP_002282516.1) y *Z. mays* (NP_001146931.1).

El gen que codifica la actina de *M. dubia* se expresó en las hojas, pulpa y cáscara de los frutos. Esto se evidenció mediante el PCR en tiempo real (Fig. 4). Asimismo, se muestra que el nivel de expresión del gen es similar en los tres tejidos analizados, puesto que presentan en promedio un C_T de $25,5 \pm 0,5$. Además, se muestra que los cebadores diseñados son apropiados para los ensayos de PCR en tiempo real. Porque, primero obtuvimos una eficiencia en el PCR de $1,85 \pm 0,04$. La segunda razón, es que los cebadores son específicos debido a que se logró amplificar el producto de tamaño esperado (71 pb) y no se observaron productos inespecíficos de mayor o menor tamaño al producto de 71 pb. Finalmente, en las reacciones de PCR en tiempo real realizadas no se observó la formación de dímeros. Esto se verificó mediante el análisis de la temperatura de fusión de los amplicones generados y por análisis electroforético. Los resultados de la electroforesis se muestran en el gel de agarosa de la figura 4.

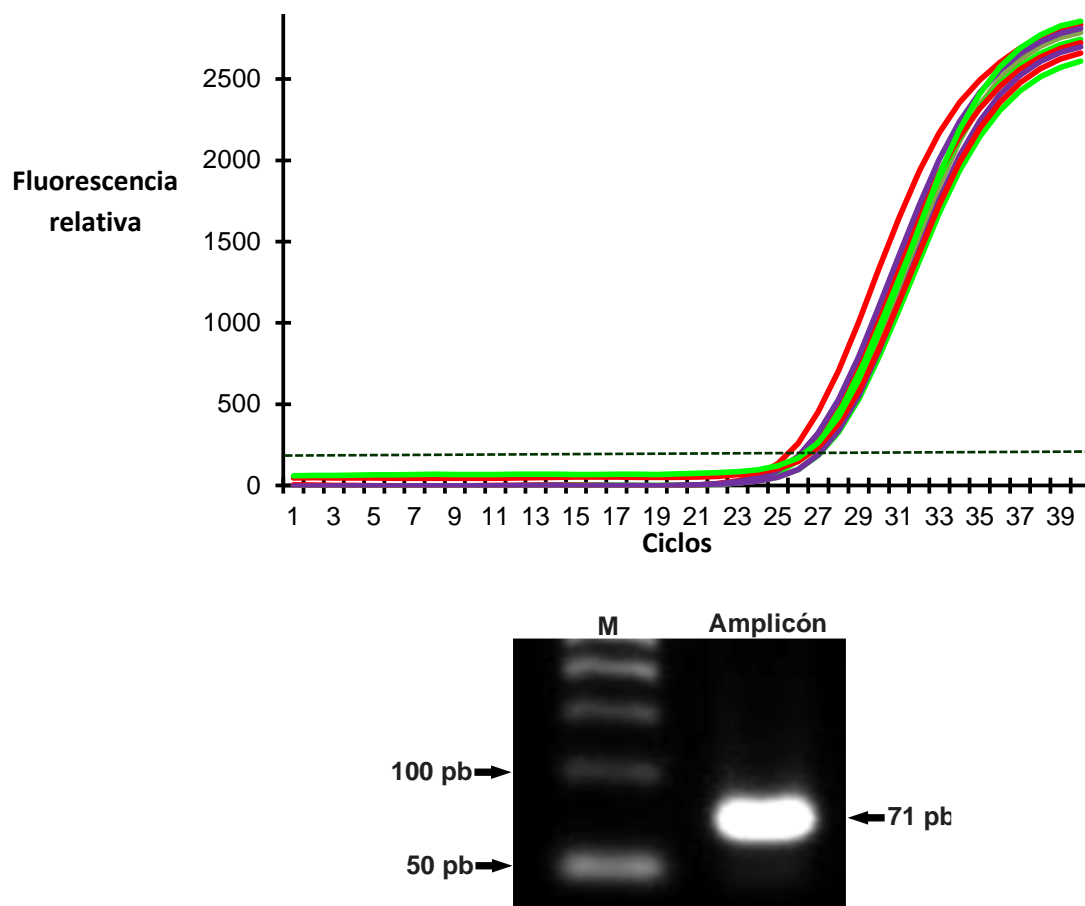


Figura 4. Perfil de fluorescencia relativa durante la amplificación por PCR en tiempo real del gen codante de la actina a partir de hojas (verde), pulpa (violeta) y cáscara (rojo) de *M. dubia* y electroforesis en gel de agarosa del amplicón sintetizado. M: marcador de peso molecular.

DISCUSIÓN

Con el soporte de las herramientas bioinformáticas y los experimentos laboratoriales hemos aislado, clonado y secuenciado un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia*. Todos los análisis bioinformáticos realizados nos indican que se trata del gen mencionado y en base a la secuencia disponible estamos en condiciones de aislar el gen completo mediante la estrategia de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), estrategia experimental que ha sido reportada para aislar genes completos (Frohman 1994, Lopes y Lindblad 2010).

Asimismo, con los análisis de filogenia molecular observamos que *M. dubia* constituye un clado con otras especies genéticamente similares, que cuentan con estudios genómicos más avanzados tales como *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Glycine max* y *Medicago truncatula* (Fig. 2). Si esta similitud se conserva en todo el genoma entonces será más factible, con las estrategias utilizadas en esta investigación, aislar y clonar otros genes de *M. dubia*, como los que codifican enzimas de las vías metabólicas para la biosíntesis de vitamina C, antocianinas y diversas sustancias de interés para las industrias alimentaria, farmacológica, agronómica, entre otras.

También, los resultados obtenidos nos muestran que el gen codante de actina de *M. dubia* puede ser un buen candidato como gen de referencia para estudios de expresión genética. Tal como apreciamos en la Figura 4, el gen se expresa y tiene niveles de expresión similares en las hojas, pulpa y cáscara de los frutos de *M. dubia*. Sin embargo, para seleccionarlo como un buen gen de

referencia debe ser normalizado, para ello se deben realizar más ensayos a fin de verificar su estabilidad de expresión en otros tejidos vegetales (flores, raíces, semillas, callos, etc), en diferentes estados fisiológicos y en diversas condiciones bióticas y abióticas adversas. Adicionalmente, es necesario identificar más genes que puedan ser útiles como genes de referencia normalizados tal como lo señalan Czechowski *et al.* (2005) y Bustin *et al.* (2010).

Cabe indicar que la investigación realizada presenta varias limitaciones. Porque sólo se han realizado tres réplicas biológicas en los ensayos de expresión genética, es necesario comparar el nivel de expresión del gen en más muestras de *M. dubia*, que incluya flores, frutos en diferentes estados de desarrollo y maduración y otras condiciones fisiológicas. También, es preciso evaluar la expresión del gen en muestras obtenidas de ambientes naturales y determinar cómo los periodos de vaciante y creciente influyen en su expresión.

Finalmente, debemos mencionar que es primordial realizar investigaciones a nivel del genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma de *M. dubia*. Porque estos estudios acelerarán sustancialmente la obtención de variedades mejoradas de esta especie. Ya sea a través de la identificación de marcadores genéticos asociados con resistencia a factores bióticos y abióticos adversos, así como la mejora en la calidad y cantidad de productos acumulados en los frutos y otros tejidos vegetales. Además, de la diversidad alélica que nos ofrece la biodiversidad de la especie en las diferentes cuencas amazónicas, podríamos generar nuevas variedades de *M. dubia* mediante intragénesis con nuevos alelos de los genes claves, producidos mediante mutaciones puntuales dirigidas al sitio activo de enzimas, regiones reguladoras o dominios funcionales importantes que permitan controlar diversos procesos metabólicos. Asimismo, los estudios mencionados nos permitirían identificar los ARN de interferencia (miRNA, siRNA, etc) que pueden estar influyendo en el tiempo de producción, floración, fructificación, tamaño de frutos, maduración de frutos, resistencia a condiciones de estrés biótico y abiótico, micropropagación *in vitro* entre otros procesos. Es decir, en conjunto estas investigaciones nos proporcionarán los conocimientos científicos para un mejor aprovechamiento de este importante recurso, que hasta la fecha sigue siendo sub aprovechado.

CONCLUSIONES

Con el soporte de las herramientas bioinformáticas y el empleo de técnicas de biología molecular hemos aislado, clonado y secuenciado un segmento del gen codante de la actina de *M. dubia*. Asimismo, los análisis realizados muestran que el gen se expresa y presenta niveles similares de expresión en las hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia*. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos a fin de verificar su estabilidad de expresión y pueda ser utilizado como un gen de referencia para estudios de expresión genética en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto a través del Contrato de Subvenciones 2009-CONCYTEC-OAJ. También a la alta dirección y personal administrativo del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), por el apoyo con Infraestructura y equipos. A la Dirección del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)- Estación Experimental San Roque por el soporte logístico y de acceso a la colección de germoplasma de "camu camu".

REFERENCIAS

- Bradfield RB, Roca A. 1964. Camu-Camu-a fruit high in ascorbic acid. J Am Diet Assoc. 44, 28-30.
- Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schünemann 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-galactose guanylttransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. J Exp Bot. 60(3), 765-778.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FSB, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. BMC Molecular Biology 11(74), 2-5.
- Castro JC, Adrianzen PM, Imán, Marapara J y Cobos M. 2010. Informe del Proyecto "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* (HBK) McVaugh "camu camu". Iquitos-Perú". Contrato de subvención: 298-2009. PROCYT-CONCYTEC.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-Wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiology 139, 5-17.
- Derveaux S, Vandescompele J, Hellemans J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods 50,227-230.
- Frohman MA. 1994. On beyond classic RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Genome Res. 4(1), S40-58.
- Imán C. S. 2000. Caracterización y evaluación morfoagronómica del germoplasma de "camu- camu" *Myrciaria dubia* Mc Vaugh. INIA. Iquitos-Perú
- Inoue T, Komoda H, Uchida T, Node K. 2008. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. J Cardiol. 52(2),127-132.
- Lopes F, Lindblad P. 2010. A guide for in-house design of template-switch-based 5' rapid amplification of cDNA ends systems. Anal. Biochem. 397, 227-232.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 1989. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. 2005. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. J Agric Food Chem. 53(24), 9531-9535.
- Zeng Y, Yang T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. Plant. Mol. Biol. Rep. 20, 417a-417e.

Recibido: 15 setiembre 2012 / **Aceptado:** 10 noviembre 2012