

Clonación molecular de los genes GDP-L-galactosa fosforilasa, L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa de la vía biosintética de vitamina C en *Myrciaria dubia* (camu camu)

Molecular cloning of the genes GDP-L-galactose phosphorylase, L-galactose dehydrogenase and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase of the biosynthetic pathway for vitamin C in *Myrciaria dubia* (camu camu)

Alina Egoávil¹, Julián Torres¹, Marianela Cobos², Sixto A. Imán³,
Jorge L. Marapara¹ y Juan C. Castro⁴

Recibido: julio 2014

Aceptado: septiembre 2014

RESUMEN

El objetivo del estudio fue realizar la clonación molecular de los genes que codifican las enzimas, GDP-L-galactosa fosforilasa (GGF), L-galactosa deshidrogenasa (GDH) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH) de la ruta biosintética de vitamina C de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. Los frutos fueron obtenidos de la Colección Nacional de Germoplasma de *M. dubia* del Instituto Nacional de Innovación Agraria. El ARN se purificó, se sintetizó el ADNc y amplificó con cebadores degenerados, se clonó y secuenció con técnicas estándares. Sobre la base de la secuencia obtenida se diseñaron cebadores para posteriores estudios de expresión genética. El ARN total purificado fue de alta calidad por los ratios de absorbancia ($A_{260}/A_{280} = 1,9 \pm 0,1$, $A_{260}/A_{230} = 4,0 \pm 0,2$) y la integridad del ARN (bandas visibles de ARN ribosomal 28S y 18S en el gel de agarosa). Con los cebadores degenerados se amplificaron con éxito segmentos de los tres genes (GGF = 388 pb, GDH = 783 pb y GLDH = 921 pb) y diseñaron cebadores específicos apropiados para estudios de expresión genética mediante PCR en tiempo real. En conclusión, con las estrategias empleadas se realizó la clonación molecular de segmentos de los genes GGF, GDH y GLDH que participan en la biosíntesis de vitamina C en *M. dubia*.

Palabras claves: ácido L-ascórbico, secuenciamiento de genes, síntesis de vitamina C.

ABSTRACT

The aim of the study was to make the molecular cloning of the genes encoding the enzymes GDP-L-galactose phosphorylase (GGF), L-galactose dehydrogenase (GDH) and L-galactono 1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) of the biosynthetic pathway for vitamin C in *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. The fruits were obtained from the National Germplasm Collection of *M. dubia* of the National Institute of Agro Innovation. The RNA was purified; cDNA was synthesized and amplified with degenerate primers, cloned and sequenced with standard techniques. Based on the obtained sequence specific primers were designed for future gene expression studies. The purified total RNA was of high quality by absorbance ratios ($A_{260}/A_{280} = 1,9 \pm 0,1$, $A_{260}/A_{230} = 4,0 \pm 0,2$) and RNA integrity (visible bands of 28S and 18S ribosomal RNA in agarose gel). With the degenerate primers were successfully amplified segments of the three genes (GGF = 388 bp, GDH = 783 bp and GLDH = 921

¹Unidad Especializada de Biotecnología. Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

²Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética. Universidad Científica del Perú (UCP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

³Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

⁴Unidad Especializada de Biotecnología. Cirna. UNAP. Psje. Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. juanccgomez@yahoo.es

bp). In conclusion, with the strategies used, the molecular cloning of segments of the genes GGF, GDH, and GLDH involved in vitamin C biosynthesis in *M. dubia* was performed.

Key words: L-ascorbic acid, gene sequencing, vitamin C synthesis.

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia es un frutal nativo de la cuenca amazónica con alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C), que según su procedencia puede acumular hasta 3 g por cada 100 g de pulpa (Flores, 1997; Maeda y Andrade, 2003; Villachica, 1996). La vitamina C cumple roles importantes en el hombre y en las plantas. En el primer caso, participa como antioxidante, como precursor para la biosíntesis de hormonas y del colágeno (Davey *et al.*, 2000). En las plantas, estimula el crecimiento de la pared celular y es necesario para la maduración de los frutos (Pignocchi y Foyer, 2003). También, participa en respuesta a fitopatógenos, a hormonas, en el florecimiento, en la senescencia, en la resistencia al estrés ambiental, en la radiación ultravioleta, en altas temperaturas e intensidades luminosas (Barth *et al.*, 2006; Conklin y Barth, 2004; Gao y Zhang, 2008).

Debido a estas múltiples funciones de la vitamina C en las plantas, estas tienen la capacidad de biosíntesis de esta vitamina. La vía Smirnov-Wheeler es considerada la principal vía para la biosíntesis de vitamina C en las plantas (Wheeler *et al.*, 1998; Smirnov *et al.*, 2001). Por tanto, esta vía metabólica tiene el potencial para ser explotada biotecnológicamente e incrementar el contenido de vitamina C en las plantas (Zhang *et al.*, 2007). Por consiguiente, consideramos que al estudiar la expresión de los genes de la ruta biosintética de la vitamina C en *M. dubia*, contribuiremos en establecer las bases científicas para el desarrollo de programas de mejoramiento genético y el uso biotecnológico de esta especie. Al incrementar la producción de vitamina C se brindará beneficios a los consumidores y

productores. Por tal motivo, el objetivo del estudio fue determinar la expresión de genes que codifican las enzimas 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 frutos de *M. dubia*.

MATERIAL Y MÉTODO

Área de estudio

Los frutos fueron obtenidos de la Colección Nacional de Germoplasma de *M. dubia* del Instituto Nacional de Innovación Agraria, ubicado en el km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta (03° 57' 17" LS y 73° 24' 55" LW). Los frutos recolectados fueron transportados en refrigeración a la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna) perteneciente a la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), donde fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

Purificación de ARN total

Se realizó a base de un protocolo modificado de Lima (2006), que consistió de los siguientes pasos: 3 gramos de pulpa fueron trituradas en un mortero estéril, añadiendo gradualmente 20 mL del buffer de extracción de ARN (Tris-HCl 200 mM pH 8,2, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%) y 20 µL de β-mercaptoetanol. El homogenizado se incubó a 65 °C por 1 h, mezclando en el vortex por 30 seg cada 15 min. Luego, se agregó 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), homogenizó en el vortex por 1 min y centrifugó a 15 000 g por 5 min. La fase acuosa fue transferida a un microtubo y se repitió el paso de extracción anterior. Al sobrenadante obtenido se le añadió 300 µL de LiCl 10 M y

ARNt de levadura (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se homogenizó en el vortex e incubó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. Después, se centrifugó a 15 000 g por 10 min y descartó el sobrenadante. El ARN total precipitado fue disuelto con 100 μL de SDS al 0,5% e incubó en baño maría a $55\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Luego se añadió 100 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en el vortex por 30 seg y centrifugó a 15 000 g por 10 min. La fase acuosa fue transferida a otro microtubo, se mezcló con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugó a 15 000 g por 10 min. La fase acuosa fue transferida a otro microtubo, se agregó 10 μL de acetato de sodio 3M pH: 5,2 y tres volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló en el vortex, se centrifugó brevemente a 1500 g por 30 seg e incubó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. Después, se centrifugó a 15 000 g por 15 min, se descartó el sobrenadante y el ARN total precipitado fue lavado con 500 μL de etanol al 70%, se centrifugó a 15 000 g por 5 min y descartó el sobrenadante. El ARN precipitado fue secado a temperatura ambiente por 10 min y fue disuelto con 89 μL de agua tratada con DEPC. Para eliminar el ADN contaminante, se trató con el Kit TurboTM DNase según indicaciones del fabricante (Applied Biosystems).

Para constatar la calidad del ARN total purificado, las muestras fueron sometidas a electroforesis denaturante en gel de agarosa al 2% que contenía 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio y formaldehído 2,2 M. Como buffer de electroforesis se empleó MOPS 1X (MOPS 200 mM pH: 7,0, acetato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM). El análisis espectrofotométrico se realizó según Sambrook et al. (1989). Para ello, el ARN total puro fue diluido 50 veces con buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM). La absorbancia se leyó de 200 a 860 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 6). La calidad del ARN total puro se calculó mediante los ratios: $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. La

cantidad del ARN total se estimó con la ecuación: $\text{ARN } (\mu\text{g}/\text{mL}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times 50$.

Síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificación de segmentos de genes

Se realizó según instrucciones del kit Gene Amp[®]RNA PCR Core, (Applied Biosystems). Empleando Oligo dT₍₁₆₎ como cebador en un volumen final de 20 μL . La amplificación de los genes de interés se realizó con buffer de PCR 1X, MgCl_2 2,5 a 3,0 mM, dNTPs 0,8 mM, par de cebadores degenerados 1 μM c/u, Taq polimerasa 0,125 U, ADNc 2 μL y H_2O ultrapura c.s.p. 20 μL . Los ciclos programados en el termociclador fueron: $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, 40 ciclos de $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 45 seg, $53,2$ a $55,5\text{ }^\circ\text{C}$ por 45 seg, $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min y una extensión final a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min. Los amplicones fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2% y los amplicones de tamaños esperados fueron extraídos del gel y purificados según instrucciones del Kit Pure LinkTM Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

Reacción de clonación, transformación en células competentes DH5 α TM -T1^R y selección de colonias transformadas

La reacción de clonación se realizó de acuerdo con el Kit de Clonación TOPO[®]TA (Invitrogen). Para la transformación se añadió 4 μL de los plásmidos recombinantes a las células competentes de *Escherichia coli*, se mezcló suavemente y el vial se puso en hielo por 5 min y sometió a un shock térmico ($40\text{ }^\circ\text{C}$) por 30 seg y en hielo por 5 min. Luego, al vial con células transformadas se añadió 250 μL de medio SOC atemperado a $37\text{ }^\circ\text{C}$, e incubó por 1 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en agitación a 200 rpm. Luego, alícuotas de 10 y 50 μL del cultivo se sembraron uniformemente en una superficie de agar Luria Bertani (LB) que contenía 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Treinta minutos antes de sembrar las bacterias transformadas se dispersaron en toda la

superficie del medio de cultivo 40 μL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas se incubaron a 37 °C de 12 a 18 horas. Posteriormente, se tomaron de 10 a 12 colonias blancas y fueron sembradas en caldo LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Estos se incubaron por 18 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm.

Confirmación de cultivos transformantes por PCR

Para la amplificación se empleó buffer de PCR 1X, MgCl_2 3,0 mM, dNTPs 0,2 mM, Primer M13 Forward/Reverse 0,05 μM de c/u, Taq polimerasa 0,125U, 7 μL del cultivo y H_2O c.s.p. 20 μL . Los ciclos programados en el termociclador fueron: 94 °C por 10 min, 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% que contenía 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio. Las bandas de ADN se visualizaron y fotografiaron con el sistema de documentación de geles BioDocAnalyze (Biometra).

Secuenciamiento y análisis de las secuencias

Se realizó con el kit BigDye Terminator v1,1 (Applied Biosystems) en un analizador genético 3130XL (Hitachi, Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Sequencing Analysis v5,2,0 (Applied Biosystems). La identidad de las secuencias se determinó mediante un análisis BLAST y alineándolas con las secuencias usadas para el diseño de cebadores degenerados con el programa ClustalW2.

Diseño de cebadores específicos

Las secuencias de los tres genes fueron empleadas para diseñar los cebadores específicos y apropiados para PCR en tiempo real con el programa Allele ID v6,0. Para el diseño de los cebadores específicos se em-

plearon los siguientes criterios: $T_m = 60$ °C, tamaño del amplicón = 50 a 250 pb, contenido de GC = 35-55%.

PCR en tiempo real

Se realizó según las instrucciones del SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación 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 en 20 min hasta 95 °C por 15 seg. Los amplicones obtenidos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2% y las bandas de ADN se fotografiaron con el sistema BioDocAnalyze (Biometra).

RESULTADOS

Purificación de ARN total

El protocolo empleado para purificar el ARN total fue apropiado para obtener este ácido nucleico en cantidad y calidad adecuadas. La óptima calidad del ARN purificado se evidencia por la integridad de las bandas de los ARN ribosomales 28S y 18S (figura 1) y la ausencia de ADN genómico.

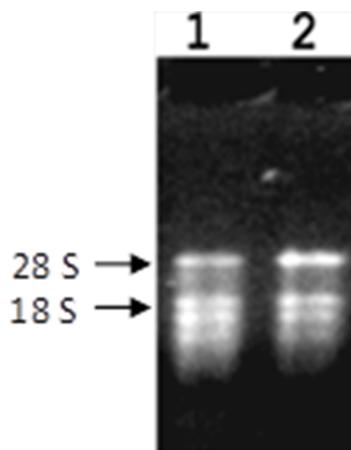


Figura 1. Análisis electroforético del ARN total purificado a partir de la pulpa de frutos de *Myrciaria dubia*.

Adicionalmente, el análisis espectrofotométrico nos muestra la alta calidad del ARN total purificado (figura 2). Esta característica se pone de manifiesto por la presencia de un único pico de máxima absorbancia a 260 nm (longitud de onda en la que absorben los ácidos nucleicos). La concentración promedio del ARN total purificado fue de $174,4 \pm 76,63 \mu\text{g/mL}$ y el ratio de calidad promedio (A_{260}/A_{280}) fue de $1,9 \pm 0,1$, considerándose un ARN de calidad aceptable. Además, la relación A_{260}/A_{230} fue óptima con un valor promedio de $4,0 \pm 0,2$.

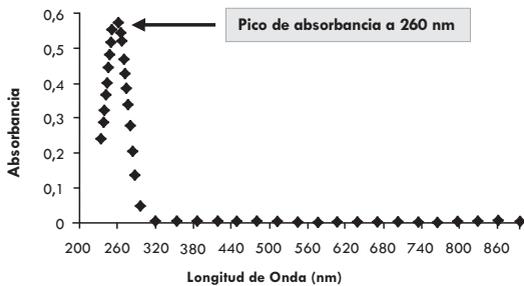


Figura 2. Análisis espectrofotométrico del ARN total purificado a partir de la pulpa de frutos de *Myrciaria dubia*.

Amplificación de segmentos de genes con cebadores degenerados

Mediante el PCR con cebadores degenerados se obtuvieron los productos de tamaños esperados para los tres genes analizados (figura 3). Para el gen GDP-L-galactosa fosforilasa (GGF) se obtuvo un amplicón de 388 pares de bases (pb), el fragmento de 783 pb corresponde al gen L-galactosa deshidrogenasa (GDH) y el producto de 921 pb corresponde al gen L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH). 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 aprecian 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.

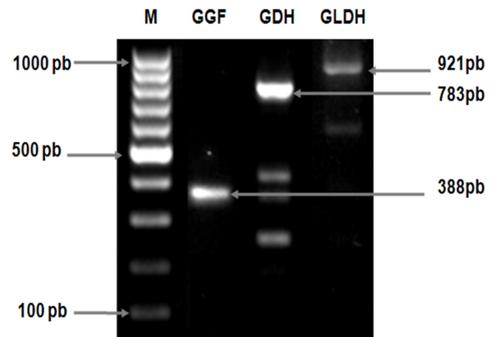


Figura 3. Amplicones de los genes GGF, GDH y GLDH de *M. dubia* obtenidos por el PCR con cebadores degenerados. M: Marcador de peso molecular: 100-1000 pb.

Clonación de los productos de PCR

El análisis por PCR de cultivos de *E. coli* portadores de plásmidos recombinantes, muestra que se lograron clonar los tres 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 de los segmentos de los genes más 202 pb de una región del vector (figura 4).

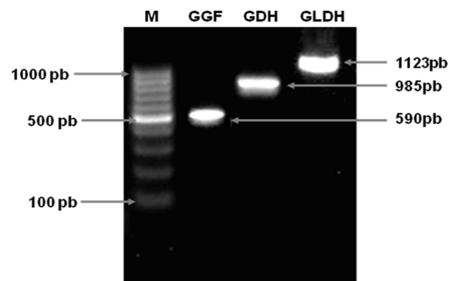


Figura 4. Amplicones obtenidos por PCR de los cultivos de *E. coli* portadores de plásmidos recombinantes. M: Marcador de peso molecular = 100-1000 pb.

Amplificación de los genes con cebadores específicos

Para corroborar la identidad y especificidad de los amplicones de los genes GGF, GDH,

GLDH y GADPH obtenidos mediante PCR en tiempo real, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (figura 5). Tal como se evidencia en esta figura todos los productos amplificados fueron del tamaño esperado.

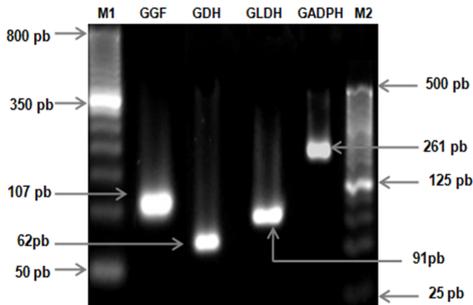


Figura 5. Amplicones obtenidos con cebadores específicos para PCR en tiempo real de los genes GGF, GDH, GLDH y GADPH de *M. dubia*. M1: Marcador de peso molecular = 50-800 pb, M2: Marcador de peso molecular = 25-500 pb.

DISCUSIÓN

Con el protocolo descrito, a partir de la pulpa de frutos de *M. dubia*, se ha obtenido ARN total de alta calidad apropiado para estudios de expresión genética. Esto es atribuible a las modificaciones que se realizaron al protocolo descrito por Lima (2006). Estas modificaciones fueron: aumento en las velocidades de centrifugación, disminución del tiempo de almacenamiento de las muestras con cloruro de litio y acetato de sodio, aumento de la proporción tampón de extracción/muestra. En conjunto estas modificaciones garantizaron la obtención de ratios de calidad e integridad del ARN (figura 1) superiores a los reportados por Lima (2006). Otras investigaciones realizadas con diferentes especies de plantas y a partir de diferentes tejidos también reportan altas calidades de ARN total similares al obtenido en nuestro estudio; entre estas tenemos a *Cinnamomum tenuipilum* (Zeng y Yang, 2002), *Malpighia glabra* (Badejo et al., 2009) y *Vitis vinifera* (Reid et al., 2006).

Debido a la carencia de secuencias de los genes de la vía biosintética de vitamina C de *M. dubia* en el GenBank y otras bases de datos, se optó por diseñar cebadores degenerados con base en secuencias homólogas de otras especies. Por la alta conservación de las secuencias de exones fue posible amplificar con éxito los genes en estudio. Con aproximaciones similares otros investigadores también lograron aislar y clonar genes involucrados en la biosíntesis de vitamina C en otras especies de plantas como *Brassica oleraceae* (Nishikawa et al., 2003), *Malpighia glabra* (Badejo et al., 2009) y *Prunus persica* (Imai et al., 2009).

Nuestro estudio representa el primer reporte que muestra que la vía Smirnoff-Wheeler, considerada la vía más importante para la biosíntesis de vitamina C en plantas (Wheeler et al., 1998), está activa en los frutos de *M. dubia*. Estos resultados nos sugieren que la acumulación de vitamina C en los frutos de esta especie se deben a exportación desde otros tejidos como las hojas y cáscara, y a la biosíntesis *in situ*. Es muy probable que la vía Smirnoff-Wheeler sea también la vía más importante para la biosíntesis de vitamina C en esta especie, pero no se descarta el aporte de otras vías metabólicas, porque existen múltiples vías metabólicas que contribuyen a la acumulación de vitamina C en las plantas (Valpuesta y Botella, 2004).

CONCLUSIONES

Con las estrategias empleadas se realizó la clonación molecular de segmentos de los genes GGF, GDH y GLDH que participan en la biosíntesis de vitamina C en *M. dubia*.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAP y al Concytec por el financiamiento del proyecto "Influencia de la expresi-

sión genética y actividad catalítica de enzimas de la vía biosintética Smirnoff-Wheeler en la variación de la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh (camu camu)" que ha proporcionado los fondos para la ejecución de la tesis. También, expresamos nuestro agradecimiento a la doctora Lastenia Ruiz Mesía, directora del Cirna-UNAP, por brindarnos todas las facilidades en el acceso y uso de la infraestructura y equipos del laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badejo A, Fujiokawa Y, Esaka M. 2009. Gene Expression of Ascorbic Acid Biosynthesis Related Enzymes of the Smirnoff-Wheeler Pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *J. Plant Physiol.* 166: 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.* 57:1657-1665.
- Conklin P, Barth C. 2004. Ascorbic acid, a Familiar Small Molecule Intertwined in the Response of Plants to Ozone, Pathogens, and the Onset of Senescence. *Plant Cell Environ.* 27: 959-970.
- 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.* 80: 825-860.
- Flores S. 1997. Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista, Ed. *Tratado de Cooperación Amazónica - Secretaría Pro Tempore*. Pp.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* 165: 138-148.
- Imai T, Ban Y, Terakami S, Yamamoto T, Moriguchi T. 2009. L-Ascorbate Biosynthesis in peach: Cloning of Six L-galactose Pathway Genes and Their Expression During peach Fruit Development. *Physiologia Plantarum.* 13:139-149.
- 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. P. 169.
- Maeda R, Andrade J. 2003. Aproveitamento do camu camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazônica.* 33(3):489-498.
- Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiura M. 2003. Ascorbate Metabolism in Harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany.* 54(392):2439-2448.
- Pignocchi C, Foyer A. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Plant Biol.* 6:379-389.
- 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.* 6(27):1-11.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. P. 2344.

- Smirnoff N, Conklin P, Loewus F. 2001. Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: A Renaissance. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 52:437-467.
- Valpuesta V, Botella M. 2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science.* 9(12):573-577.
- Villachica H. 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Ed. *Tratado de Cooperación Amazónica-Secretaría Pro-Tempore.* Pp.105-107.
- Wheeler L, Jones A, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature Journal.* 393:365-369.
- Zeng Y, Yang T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter.* 20(4):417.
- 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* 27:173-182.