

Artículo Original

La expresión y actividad catalítica diferencial de GDP-manosa pirofosforilasa influye en la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu-camu"

[Differential expression and catalytic activity of GDP-mannose pyrophosphorylase influences the vitamin C production in *Myrciaria dubia* "camu-camu"]

Juan C. Castro-Gómez^{1*}, Marianela Cobos-Ruiz¹, Freddy Gutiérrez-Rodríguez¹ & Sixto Imán-Correa²

¹Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Psje. Los Paujiles S/N AAHH Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Iquitos.

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

*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

Resumen

Myrciaria dubia muestra una amplia variación en la producción de vitamina C (vit.C). Para entender las bases moleculares de esta variación, se determinó la relación del nivel de expresión genética y actividad de GDP-Manosa pirofosforilasa (GMP) con la variación del contenido de vit.C en *M. dubia*. Las muestras fueron obtenidas de una colección de germoplasma. La vit.C se cuantificó por HPLC, la actividad de GMP se midió por espectrofotometría. El ARN se purificó, el ADNc se sintetizó, amplificó, clonó y secuenció con técnicas estándares. La expresión del gen se midió mediante PCR en tiempo real. Las diferencias en el contenido de vit.C de las hojas, pulpa y cáscara dependieron de la expresión y actividad de GMP. Esta relación también se observó entre plantas que producen frutos con bajo y alto contenido de vit.C. En conclusión, Las hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia* muestran diferencias significativas en el contenido de vit.C, el cual se atribuye a la expresión y actividad catalítica diferencial de la GMP. Asimismo, las plantas que producen frutos con diferencias marcadas en el contenido de vit.C en sus pulpas, también dependen del nivel de expresión y actividad catalítica de esta enzima.

Palabras clave: expresión genética, frutal amazónico, vía Smirnov-Wheeler.

Abstract

Myrciaria dubia shows a wide variation in the content of vitamin C (vit.C). To understand the molecular basis of this variation, was determined the relation of the gene expression level and activity of GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) with the variation of vit.C in *M. dubia*. Samples were obtained from a germplasm collection. Vit.C was quantified by HPLC, enzyme activity was measured by spectrophotometry. RNA was purified, cDNA was synthesized, amplified, cloned and sequenced by standard techniques. Gene expression was measured by real time PCR. Differences in vit.C content among leaves, pulp and flesh depended on the gene expression and GMP enzymatic activity. This connection was also observed between plants producing fruits with low and high vit.C content in pulp. In conclusion, leaves, pulp and peel of *M. dubia* show significant differences in vit.C content, which is attributed to GMP differential expression and catalytic activity. Likewise, plants that produce fruits with marked differences in vit.C content in their pulp, also depend on gene expression level and catalytic activity of this enzyme.

Keywords: genetic expression, amazonian fruit, Smirnov-Wheeler pathway

Recibido: 08 Agosto 2013

Aceptado: 10 Noviembre 2013

Este artículo puede ser citado como: JC Castro-Gómez, M Cobos-Ruiz, F Gutiérrez-Rodríguez, SA Imán-Correa. 2013. La expresión y actividad catalítica diferencial de GDP-manosa pirofosforilasa influye en la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu-camu". **Cienc amaz (Iquitos) 3(2), 67-73.**

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia es un arbusto amazónico que produce altas concentraciones de vitamina C (Bradfield y Roca, 1964; Imán et al., 2011). Sin embargo, estudios recientes muestran que esta especie presenta una amplia variación en el contenido de esta vitamina (Castro et al., 2013; Imán et al., 2011). Esto se atribuye a la influencia de factores genéticos, porque ambos estudios encontraron esta amplia variación en una colección de germoplasma sembrada en menos de una Ha de terreno con características ambientales similares, pero la colección está constituida por 43 accesiones procedentes de diferentes cuencas hidrográficas. Además, estudios realizados en *Malus x domestica* y *Solanum lycopersicum* muestran que los factores genéticos son más importantes que los factores ambientales en la variación de vitamina C (Davey et al., 2006; Roselló et al., 2011).

Es decir, la amplia variación en el contenido de vitamina C registrada en *M. dubia* puede estar determinada por genes que controlan su metabolismo. Aunque existen múltiples vías biosintéticas de vitamina C en plantas (Gest et al., 2013; Smirnov et al., 2001; Valpuesta y Botella, 2004), una de las más importantes fue descubierta a finales de 1990 y es denominada la vía de Smirnov-Wheeler (Wheeler et al., 1998). En esta vía la D-manosa-1-fosfato es convertida a ácido L-ascórbico por acción de seis enzimas, siendo GDP-Manosa pirofosforilasa la primera enzima de la vía. Es considerada como la enzima reguladora de la vía y una mutación puntual no sinónima en el gen que lo codifica disminuye su actividad catalítica y hay baja producción de vitamina C en *Arabidopsis thaliana* (Conklin et al., 1999).

Por tanto, al estudiar cómo se expresan los genes y cómo es la actividad catalítica de las enzimas de la vía biosintética Smirnov-Wheeler, podríamos identificar algunos de los factores que influyen en la variación del contenido de vitamina C en *M. dubia*. Brindando, así un mayor soporte y nuevas estrategias para el mejoramiento genético de la especie. Consecuentemente, el objetivo de esta investigación fue determinar la influencia del nivel de expresión genética y actividad catalítica de la enzima GDP-Manosa pirofosforilasa en la variación del contenido de vitamina C en *M. dubia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y transporte del material botánico

Las hojas y frutos maduros de *M. dubia* fueron obtenidos de la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, Estación Experimental San Roque-Loreto, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el Km 25½ de la carretera Iquitos- Nauta (03°57'17" LS, 73°24'55" LO), el cual está constituido por 43 accesiones representativas de la variabilidad genética de esta especie; pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas), establecidas hace aproximadamente 20 años. Las muestras obtenidas fueron transportadas en condiciones de refrigeración a los laboratorios de la UEB-CIRNA-UNAP, donde se almacenaron a -80°C, las que posteriormente fueron procesadas para determinar su contenido de vitamina C y purificación de ARN total.

Determinación de Vitamina C por HPLC-DAD

Se realizó de acuerdo a Ledezma-Gairaud, (1993). En un mortero se trituró 500 mg de la muestra y 2 mL de solución extractora (HPO₃ 3%, ácido acético 8% y ácido etilendiamino tetraacético 0,36%). El homogenizado se transfirió a microtubos de 1,5 mL y centrifugó a 20000 x g por 10 minutos a 4°C, 100 µL del sobrenadante obtenido se diluyó diez veces (excepto de hojas), se filtró a través de un filtro para jeringa de 0,45 µm y 25 µL de las muestras filtradas se analizaron en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos HPLC-DAD (Elite La Chrome, modelo HP 1100). El análisis cromatográfico se hizo empleando una columna Purospher®STAR LiChroCART RP-18e (5 µm, 250 x 4,6 mm). La temperatura de la columna fue mantenida a 56°C. El flujo de la fase móvil (KH₂PO₄ 100 mM pH 2,5) fue 0,7 mL/min y la vitamina C se detectó a 245 nm. La cuantificación de la vitamina C se realizó en base a la ecuación de la curva estándar preparada.

Extracción de enzimas y medición de la actividad catalítica

Las enzimas fueron extraídas de acuerdo a Gatzek *et al.* (2002), Hancock *et al.* (2003) y (Conklin *et al.* (2006) pero se incluyó una etapa de precipitación con sulfato de amonio y diálisis. Luego, en base a Davis *et al.* (2004) se midió la actividad de GDP-Manosa pirofosforilasa. Todos los ensayos se realizaron empleando un control negativo con extracto enzimático inactivo (extracto enzimático hervido por 10 minutos). Después de inactivar las muestras se procedió a determinar el fosfato inorgánico en los controles negativos y muestras evaluadas de acuerdo a González-Romo *et al.*, 1992).

Purificación de ARN total y síntesis de ADN complementario

El ARN total se purificó según Castro *et al.* (2013) y la síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1,5 µg de ARN total (obtenido de hojas, pulpa ó cáscara) empleando el Kit GeneAmp®-RNA PCR Core (Applied Biosystems). En un microtubo de 0,2 mL se añadió los siguientes componentes: PCR Buffer II 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 1 mM de cada uno, RNase inhibitor 1 U/µL, Oligo d(T)16 2,5 µM, MuLV Reverse Transcriptase 2,5 U/µL. La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf programado a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos, 99°C por 5 minutos y 5°C por 5 minutos. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

Diseño de cebadores degenerados y amplificación del gen

Las secuencias nucleotídicas de genes homólogos (*Arabidopsis thaliana*: NM_129535.3, *Malus x domestica*: GQ149071.1, *Prunus persica*: AB457581.1, *Medicago sativa*: AY639647.1, *Actinidia latifolia*: FJ643600.1) obtenidas del banco de genes fueron alineadas con el programa ClustalW2, estas secuencias alineadas se emplearon para diseñar los cebadores degenerados con el programa SC Primer. Los pares de cebadores seleccionados se emplearon para amplificar el gen de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la reacción se usó 10X PCR Buffer 1X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs Mix 0,8 mM, cebadores 0,5 µM de cada uno, Amplitaq Gold 0,025 U/µL, ADNc (dilución 1:5) 2 µL y

agua csp 20 µL. Las condiciones de amplificación en un termociclador Eppendorf ep gradient fueron: un ciclo de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55-60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los amplicones obtenidos fueron resueltos por electroforesis (con buffer TBE 0,5X a 85 voltios por 60 minutos) en gel de agarosa al 2% con 75 µg/mL de bromuro de etidio y los geles fueron fotografiados con el sistema Bio Doc Analyze.

Clonación, secuenciamiento del gen y diseño de cebadores específicos

La clonación del gen se realizó de acuerdo al Kit de Clonación TOPO®TA (Invitrogen) y las colonias de *Escherichia coli* con inserto fueron seleccionadas por PCR y cultivaron en caldo LB por 24 horas. Luego, los plásmidos recombinantes fueron purificados según Sambrook *et al.* (1989). Quinientos nanogramos de plásmidos puros fueron empleados para secuenciar el inserto con el kit Big Dye Terminator V3,1 (Applied Biosystems) en un termociclador Eppendorf ep gradient. Los productos del secuenciamiento fueron purificados por precipitación con etanol/EDTA, desnaturalizados y resueltos en un analizador genético 3130XL. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Sequencing Analysis v5,2,0 (Applied Biosystems). La identidad de las secuencias se determinó con un análisis BLAST. Finalmente, la secuencia se usó en el programa Allele ID v6 para diseñar los cebadores específicos con los siguientes criterios: T_m = 60°C, tamaño del amplicón = 50 a 250pb, contenido de GC = 35-55%.

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 Mix 0,8 mM, cebadores específicos 0,5 µM de cada uno, Amplitaq Gold 0,025 U/µL, AmpErase UNG 0,01 U/µL, ADNc (dilución 1:5) 2 µL y agua csp 20 µL. Las condiciones de amplificación en un termociclador de tiempo real Eppendorf ep RealplexS⁴ fueron: un ciclo de 50°C por 2 minutos, un ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos y 60°C por 1 minuto (detección de

la señal fluorescente), y para el análisis de la curva de fusión se empleó un ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y aumento gradual de la temperatura en 20 minutos hasta 95°C por 15 segundos.

Análisis de datos

Para identificar los genes de referencia se analizó la estabilidad de expresión de los genes codantes de actina 1 y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa con el programa BestKeepert (Pfaffl *et al.*, 2004). La eficiencia de los cebadores de PCR en Tiempo Real y el CT de las amplificaciones se determinaron con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). La expresión relativa de los genes (expresión normalizada, NE) en cada tipo de muestra analizada (hojas, pulpa y cáscara) se estimó de acuerdo a Simon (Simon, 2003). Los análisis estadísticos descriptivos, el ANVA con prueba HSD de Tukey y la prueba t de Student se hicieron con el programa IBM SPSS Statistics 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los tejidos analizados de *Myrciaria dubia* se detectó la vitamina C (Fig. 1). Esto puede deberse a las múltiples funciones que cumple esta vitamina en las plantas. Tales como antioxidante, fotoprotector y como cofactor para la biosíntesis de diversos compuestos fundamentales (Gest *et al.*, 2013; Smirnoff y Wheeler, 2000). Además, la figura 1A muestra que *M. dubia* tiene diferencias en el contenido de vitamina C en sus tejidos. Así, las hojas presentaron bajo contenido de vitamina C ($0,18 \pm 0,06$ g/100g hoja), mientras que la pulpa hasta ~ 7 veces más que la hoja y la cáscara ~ 11 veces más que la hoja y aproximadamente 1,6 veces más vitamina C que la pulpa, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($F = 219$, $gl = 2$, $p < 0,001$).

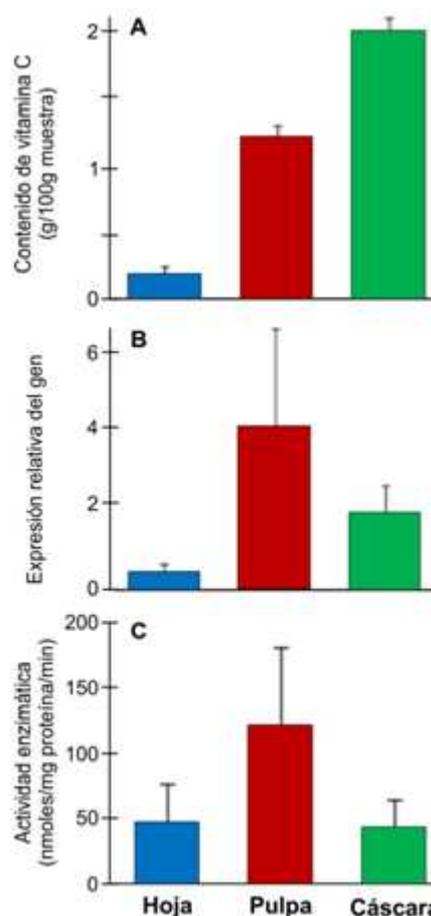


Figura 1. Contenido de vitamina C (A), expresión relativa del gen (B) y actividad enzimática de GDP-Manosa pirofosforilasa (C) en hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia*.

El menor contenido de esta vitamina en las hojas se debe a que en este órgano se realiza la biosíntesis pero no su almacenamiento. En contraste, en la pulpa la vitamina C es almacenada, aunque aparentemente tiene menos que la cáscara, pero esto se debe al mayor contenido de agua de la pulpa, porque en peso seco la pulpa contiene $\sim 1,4$ veces más vitamina C que la cáscara (Sotero *et al.*, 2009). El mayor contenido de vitamina C en la pulpa con respecto a la hoja y cáscara (en peso seco) se explica por una mayor expresión del gen y actividad enzimática de la GDP-Manosa pirofosforilasa. Este hallazgo concuerda con Badejo *et al.* (2008), quienes también reportan que los frutos de *Malpighia glabra* contienen ~ 8 veces más vitamina C que las hojas y el nivel de expresión de este gen fue 5 veces mayor en los frutos con respecto a las hojas. Asimismo, la presencia de vitamina C, la expresión del gen y actividad enzimática de la GDP Manosa pirofosforilasa en los tres tejidos analizados nos indican que tienen capacidad de biosíntesis de esta

vitamina, tal como han sido descritas en otras especies de plantas (Badejo *et al.*, 2009; Bulley *et al.*, 2009).

Adicionalmente, al comparar plantas que producen frutos con obvias diferencias en el contenido de vitamina C ($0,93 \pm 0,10$ vs $2,15 \pm 0,12$ g/100g pulpa), se observa una dependencia del contenido de esta vitamina y el nivel de expresión del gen y actividad de la enzima GDP-Manosa pirofosforilasa (Fig. 2).

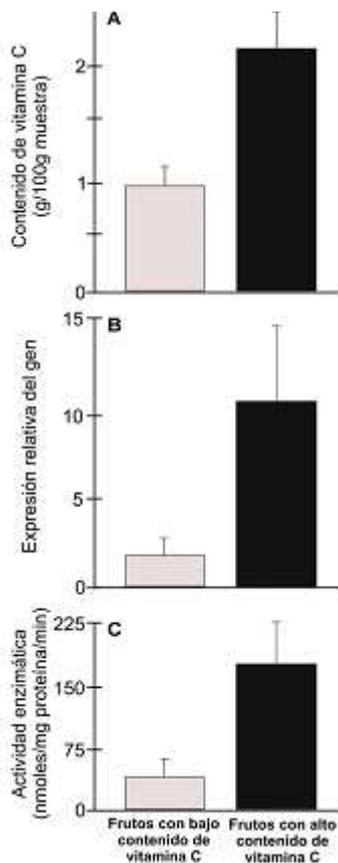


Figura 2. Contenido de vitamina C (A), expresión relativa del gen (B) y actividad enzimática de GDP-Manosa pirofosforilasa (C) en frutos con bajo y alto contenido de vitamina C de *M. dubia*.

Este hallazgo es similar a los resultados que han sido obtenidos con genotipos de *Actinidia* spp. que muestran diferencias marcadas en el contenido de vitamina C en sus frutos y una dependencia con el nivel de expresión del gen en estudio y otros genes de la vía biosintética Smirnov-Wheeler (Bulley *et al.*, 2009).

También, Yang *et al.* (2011) al comparar la expresión de genes de la vía Smirnov-Wheeler entre *Citrus sinensis* ($3,46 \mu\text{mol}$ vitamina C/g pulpa) y *Citrus unshiu* ($1,95 \mu\text{mol}$ vitamina C/g pulpa), encuentran más expresión de los genes de la vía Smirnov-Wheeler en la pulpa de *Citrus sinensis*.

CONCLUSIONES

Las hojas, pulpa y cáscara de *M. dubia* muestran diferencias significativas en el contenido de vitamina C, el cual se atribuye a la expresión y actividad catalítica diferencial de la GDP-Manosa pirofosforilasa. Asimismo, las plantas que producen frutos con diferencias marcadas en el contenido de vitamina C en sus pulpas, también dependen del nivel de expresión y actividad catalítica de esta enzima.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por el financiamiento de la investigación y al Instituto Nacional de Innovación Agraria por el acceso a la colección de germoplasma de *Myrciaria dubia*.

REFERENCIAS

- Badejo AA, Tanaka N, and Esaka M. 2008. Analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene promoter from acerola (*Malpighia glabra*) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing the acerola gene. *Plant Cell Physiol.* 49, 126–132.
- Badejo AA, Fujikawa Y, and Esaka M. 2009. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnov-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *J. Plant Physiol.* 166, 652–660.
- Bradfield RB, and 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, *et al.* 2009. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in Arabidopsis indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 60, 765–778.
- Castro JC, Gutierrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Cobos M, *et al.* 2013. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* "camu camu. *Rev. Soc. Quím. Perú.* en prensa.
- Castro JC, Egoávil A, Torres J, Ramírez R, Cobos M, and Imán SA. 2013. Isolation of high-quality total RNA from leaves of

- Myrciaria dubia* "CAMU CAMU. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43, 527–538.
- Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, and Last RL. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4198–4203.
- Conklin PL, Gatzek S, Wheeler GL, Dowdle J, Raymond MJ, Rolinski S, et al. 2006. *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 15662–15670.
- Davey MW, Kenis K, and Keulemans J. 2006. Genetic control of fruit vitamin C contents. *Plant Physiol.* 142, 343–351.
- Davis AJ, Perugini MA, Smith BJ, Stewart JD, Ilg T, Hodder AN, and Handman E. 2004. Properties of GDP-mannose pyrophosphorylase, a critical enzyme and drug target in *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* 279, 12462–12468.
- Gatzek S, Wheeler GL, and Smirnoff N. 2002. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J.* 30, 541–553.
- Gest N, Gautier H, and Stevens R. 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64, 33–53.
- González-Romo P, Sánchez-Nieto S, and Gavilanes-Ruíz M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal. Biochem.* 200, 235–238.
- Hancock R, McRae D, Haupt and Viola R. 2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol.* 3, 7.
- Imán S, Bravo L, Sotero V, and Oliva C. 2011. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci. Agropecu.* 2, 123–130.
- Imán SA, Pinedo S, and Melchor M. 2011. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. *Sci. Agropecu.* 2, 189–201.
- Ledezma-Gairaud M. 1993. Validación del método: Determinación de vitamina C total por Cromatografía Líquida de Alta Resolución "HPLC". *Tecnología En Marcha* 417, 15–23.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, and Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Roselló S, Adalid AM, Cebolla-Cornejo J, and Nuez F. 2011. Evaluation of the genotype, environment and their interaction on carotenoid and ascorbic acid accumulation in tomato germplasm. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1014–1021.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff, et al. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simon P. 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 19, 1439–1440.
- Smirnoff N, and Wheeler GL. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 291–314.
- Smirnoff N, Conklin PL, and Loewus FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 52, 437–467.
- Sotero V, Silva L, García D, and Imán SA. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del Camu-Camu (*Myrciaria dubia*). *Rev. Soc. Quím. Perú* 75, 293–299.
- Valpuesta V, and Botella MA. 2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.* 9, 573–577.

- Wheeler GL, Jones MA, and Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365–369.
- Yang XY, Xie JX, Wang FF, Zhong J, Liu YZ, Li GH, and Peng SA. 2011. Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp. *J. Plant Physiol.* 168, 2196–2205.