

Ciencia Amazónica (Iquitos), 2012, Vol. 2, No. 1, 7-16

<http://dx.doi.org/10.22386/ca.v2i1.19>

AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE *Myrciaria dubia* (HBK) "CAMU CAMU" APROPIADO PARA ANÁLISIS MOLECULARES

Juan C. Castro Gómez,^{1*} Marianela Cobos Ruiz,^{1,2} Roberson Ramírez Saavedra,¹ Sixto Imán Correa³

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

²Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Científica del Perú, Av. José A. Quiñones Km 2.5, Iquitos, Perú.

³Instituto Nacional de Innovación Agraria-Estación Experimental San Roque, Iquitos, Perú.

*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

RESUMEN

Myrciaria dubia "camu-camu", una especie nativa de la Amazonía que produce frutos con alto contenido de vitamina C y otras sustancias importantes. Sin embargo, los estudios moleculares de esta planta son escasos, por falta de un protocolo reproducible para purificar sus ácidos nucleicos. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para aislar el ADN genómico a partir de hojas de *M. dubia*, apropiado para análisis moleculares. El ADN se purificó con un protocolo modificado, la calidad y cantidad se estimó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Adicionalmente, la calidad se evaluó mediante RAPD. El ratio de calidad (A_{260}/A_{280}) promedio del ADN fue 1.9 ± 0.1 y el espectro de absorción UV/Vis presentó un único pico de máxima absorbancia a 260nm. Mediante electroforesis el ADN fue íntegro y sin ARN. También, la síntesis de amplicones RAPD nos sugiere ausencia de inhibidores para polimerasas. La concentración promedio del ADN fue 99 ± 33 ng/ μ l y el rendimiento promedio fue 237 ± 80 μ g ADN/g hoja. En conclusión, se ha establecido un protocolo de aislamiento de ADN genómico a partir de hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu", caracterizado por permitirnos obtener ADN de alta calidad y cantidad suficiente para análisis moleculares como el RAPD.

Palabras clave: ADN genómico, Aislamiento, *Myrciaria dubia*, camu camu

ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM *Myrciaria dubia* (HBK) "CAMU CAMU" SUITABLE FOR MOLECULAR ANALYSIS

ABSTRACT

Myrciaria dubia "camu camu", a native species of the Amazon that produces fruits high in vitamin C and other important substances. However, molecular studies of this plant are scarce, for lack of a reproducible protocol to purify their nucleic acids. The aim of this study was to establish a protocol to isolate genomic DNA from leaves of *M. dubia*, suitable for molecular analysis. DNA was purified with a modified protocol, the quality and quantity was estimated by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Additionally, the quality was assessed by RAPD. The mean ratio of quality (A_{260}/A_{280}) of DNA was 1.9 ± 0.1 . By means of electrophoresis the DNA was intact and without RNA. Also, the synthesis of RAPD amplicons suggests absence of inhibitors for polymerases. The average concentration of DNA was 99 ± 33 ng/ μ l and the average yield was 237 ± 80 μ g ADN/g leaf. In conclusion, was established a protocol for isolation genomic DNA from leaves of *Myrciaria dubia* "camu camu", characterized for allowing us obtain DNA of high quality and quantity sufficient for molecular analysis as RAPD.

Keywords: Genomic DNA, Isolation, *Myrciaria dubia*, camu camu

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia "camu-camu" es un frutal arbustivo que se caracteriza por sus frutos con alto contenido de vitamina C (>2000mg/100g pulpa), antocianinas y diversas sustancias con potencial uso farmacológico (Bradfield et al., 1964; Inoue et al., 2008). Razones que han contribuido a una mayor demanda de sus frutos por mercados locales, nacionales e internacionales. Pero, existe una amplia variación en la producción de estas sustancias de interés (Zanatta et al., 2005; Castro, 2010) y los procesos implicados son poco entendidos. Los componentes genéticos moleculares pueden tener un efecto importante en la determinación de estas variaciones. Sin embargo, a pesar de la importancia de esta especie amazónica los estudios a nivel molecular son escasos, en parte atribuibles a la falta de protocolos reproducibles para purificar los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Un primer paso crítico y limitante para los estudios moleculares en plantas es la obtención del ADN. El procedimiento para aislar el ADN genómico debe cumplir tres requisitos importantes. Primero debe permitirnos obtener una cantidad suficiente de ADN genómico. Otro aspecto a considerar es que el ADN debe ser íntegro y de la mayor pureza posible. Diversas técnicas moleculares (ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP) e ISSR) requieren ADN en el rango de nanogramos, que sea intacto y sin inhibidores enzimáticos, porque en todas las técnicas mencionadas se emplean enzimas (polimerasas, ligasas, endonucleasas de restricción). Un tercer requisito indispensable es que el protocolo debe ser fácil, simple, barato y en lo posible no debe emplear sustancias químicas peligrosas (Mogg y Bond, 2003; Nieto et al., 2005; Scoot y Playford, 1996).

Existen diferentes procedimientos para purificar el ADN genómico de las plantas, pero las etapas son similares. El primer paso consta en añadir nitrógeno líquido en un mortero que contiene el tejido vegetal y se rompe la pared celular mediante trituración. En esta primera etapa, también se añade gradualmente el tampón de extracción, que contiene una mezcla de varios compuestos químicos que cumplen funciones importantes. Entre estos, el tris que actúa como tampón para estabilizar el pH de la solución; los detergentes comúnmente empleados son el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)(Doyle y Doyle, 1987; Porebski et al., 1997; Madhan et al., 2009) y el dodecil sulfato de sodio (SDS)(Dehestani y Kazami, 2007) que destruyen las membranas celulares (plasmática, nuclear y de organelos membranosos citoplasmáticos) para liberar el ADN. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante, que al atrapar los iones metálicos (Mg^{2+} , Mn^{2+} , etc), deja desprovistas de sus cofactores a las ADNasas, previniendo así, la hidrólisis del ADN por estas enzimas. El NaCl en altas concentraciones (>1M) junto con el CTAB permiten remover los polisacáridos contaminantes (Jobes et al., 1995; Dellaporta et al., 1983). Los polisacáridos pueden inhibir la actividad de ciertas enzimas que modifican el ADN y también pueden interferir en la cuantificación de los ácidos nucleicos por espectrofotometría (Fang et al., 1992). El polivinilpirrolidona (PVP) forma complejos con los polifenoles, permitiendo su remoción (John, 1992). En el segundo paso, se incuba el homogenizado de 60 a 75°C, para desnaturalizar proteínas e inactivar las enzimas que pueden degradar al ADN. La tercera etapa, consiste en extraer varios de los contaminantes (proteínas, lípidos, pigmentos, etc), homogenizando el extracto con solventes orgánicos, como el fenol y el cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) por separado o mezclados (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1). Esta etapa se puede repetir 2 a 3 veces, hasta obtener un sobrenadante limpio después de la centrifugación. El ADN presente en el sobrenadante se precipita con etanol absoluto o isopropanol y se lava con etanol al 70%. Como el ADN co-precipita con el ARN, este contaminante se elimina por hidrólisis con la enzima ARNasa A (Nieto et al., 2005; Puchooa, 2004).

El nitrógeno líquido es comúnmente empleado en el aislamiento de ácidos nucleicos de tejidos vegetales, porque facilita la destrucción de la pared celular y es considerado importante para garantizar una alta calidad y cantidad suficiente de estas macromoléculas después de su purificación (Nieto et al., 2005; Dehestani y Kazami, 2007; Khanuja et al., 1999). Sin embargo, en nuestra región no es fácil obtener este compuesto, debido a que sólo disponemos de la vía fluvial para su transporte.

Ante esta limitante, describimos un protocolo que no requiere nitrógeno líquido, y nos permite purificar el ADN genómico de *Myrciaria dubia* "camu camu" con características cualitativas y cuantitativas apropiadas para análisis moleculares como el RAPD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de material botánico

Las muestras biológicas (hojas tiernas) de "camu camu" fueron obtenidas 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 (Figura 1). Las muestras obtenidas fueron transportadas en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, donde se almacenaron a -20 °C, las que posteriormente fueron procesadas para purificar el ADN genómico.



Figura 1. Ubicación de la Colección de Germoplasma de "camu camu" del INIA. Lugar donde se colectaron las hojas del "camu camu" para purificar el ADN genómico. Imagen tomada de Google Earth.

Purificación del ADN genómico

Se realizó en base a Doyle y Doyle (1987) modificado, que constó de las siguientes etapas: se pesó 50 mg de hojas tiernas y trituró en un mortero, añadiendo gradualmente 1ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, PVP 1%, β -mercaptoetanol 1%). El triturado se homogenizó en el vortex por 30 seg e incubó a 65 °C por 1 hora, homogenizando por inversión cada 15 min. Luego se añadió 500 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en el vortex por 30 seg y centrifugó a 15000 rpm por 10 min. El sobrenadante se puso en un microtubo, añadió 100 μ l de CTAB 10X, mezcló por inversión, se adicionó 700 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión. La mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 10 min. El sobrenadante se mezcló por inversión suave con igual volumen de isopropanol helado (proporción 1:1) e incubó a -20 °C por 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, descartó el sobrenadante y el precipitado (ADN genómico) se lavó dos veces con etanol al 70%. Después de centrifugar a 10000 rpm por 5 min, el ADN precipitado se secó a 37 °C por 10 min. Luego el ADN se disolvió con 100 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), se añadió 1 U de ARNasa A e incubó a 37°C por 30 min. Para eliminar la ARNasa A, el ADN se volvió a purificar. Para ello se adicionó 100 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión. La mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 10 min. El sobrenadante se mezcló por inversión suave con igual volumen de isopropanol helado e incubó a -20 °C por 1 hora. Luego, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, descartó el sobrenadante y el precipitado (ADN genómico) se lavó con etanol al 70%. Después se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, el ADN precipitado se secó a 37 °C por 10 min, añadió 120 μ l de tampón TE y disolvió a 37 °C por 30 min. El ADN fue almacenado a -20 °C.

La calidad y cantidad del ADN genómico purificado se determinó de acuerdo a Sambrook et al. (1989), empleando espectrofotometría UV/Vis (con un espectrofotómetro Spectronic Genesys 6) y electroforesis en gel de agarosa al 1%. El registro fotográfico de los geles se hizo con el sistema Bio Doc Analyze.

Amplificación del ADN mediante RAPD

Los componentes de la reacción fueron: Buffer PCR 1X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs Mix 0.8 mM, cebador MTI12f 5'-CTGCCAGCGTTCCGATTC-3' 0.5 μM, Taq polimerasa 0.025 U/μl (Fermentas), ADN 50 ng y agua csp 20 μl. Las condiciones de amplificación en un termociclador Eppendorf *ep gradient* consistieron de: un ciclo de 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 36 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los amplicones (productos de RAPD) obtenidos fueron separados mediante electroforesis (100 V por 2 horas) en gel de poliacrilamida al 8% empleando tampón TBE 1X. Las bandas de ADN se visualizaron por tinción argéntica del gel de poliacrilamida de acuerdo a Bassam y Gresshoff (2007).

Análisis de datos

La calidad del ADN genómico purificado se estimó mediante espectrofotometría con la siguiente ecuación: $Ratio\ de\ calidad = \frac{A_{260}}{A_{280}}$

Para estimar la concentración del ADN genómico purificado mediante espectrofotometría se empleó la ecuación: $ADN\ (\mu g. ml^{-1}) = (Am_{260})(50\mu g. ml^{-1})(fd)$

Donde,

Am_{260} : absorbancia de la muestra de ADN a 260nm

fd : factor de dilución

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva empleando el programa PASW 18.

El flujograma del procedimiento se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Flujograma del protocolo empleado para aislar el ADN genómico a partir de hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu"

RESULTADOS

El protocolo empleado para purificar el ADN genómico a partir de las hojas del "camu camu" fue apropiado. Los análisis realizados (Tabla 1) muestran que el ratio de calidad (A_{260}/A_{280}) promedio fue 1.9 ± 0.1 , variando entre 1.7 y 2.0. Respecto a la concentración del ADN genómico, se muestra que en promedio fue 99 ± 33 ng/ μ l, fluctuando entre 51 y 168 ng/ μ l. También es evidente que el protocolo de purificación tuvo un rendimiento promedio de 237 ± 80 μ g ADN/g de hoja, este parámetro osciló de 123 a 402 μ g ADN/g de hoja.

Tabla 1. Resultado del análisis espectrofotométrico de muestras de ADN genómico purificado a partir de hojas de 10 ejemplares de *Myrciaria dubia* "camu camu"

Muestra	Absorbancia		Ratio de calidad (A_{260}/A_{280})	Concentración (ng/ μ l)	Rendimiento (μ g ADN/g hoja)
	260nm	280nm			
1	0.041	0.022	1.9	51	123
2	0.042	0.023	1.8	53	126
3	0.065	0.036	1.8	81	195
4	0.069	0.039	1.8	86	207
5	0.077	0.039	2.0	96	231
6	0.077	0.040	1.9	96	231
7	0.083	0.045	1.8	104	249
8	0.096	0.051	1.9	120	288
9	0.106	0.053	2.0	133	318
10	0.134	0.078	1.7	168	402
Promedio	0.079	0.043	1.9	99	237
DESVEST	0.027	0.015	0.1	33	80

Además, el espectro de absorción UV/Vis del ADN genómico muestra su alta pureza (figura 3) por la presencia de un pico de máxima absorbancia a 260nm, longitud de onda en que los ácidos nucleicos tienen la mayor absorbancia. No se evidencia la formación de más picos en las otras longitudes de onda evaluadas, ni en el rango ultravioleta ni el visible. Indicándonos la ausencia de contaminantes como los pigmentos constituyentes de las hojas.

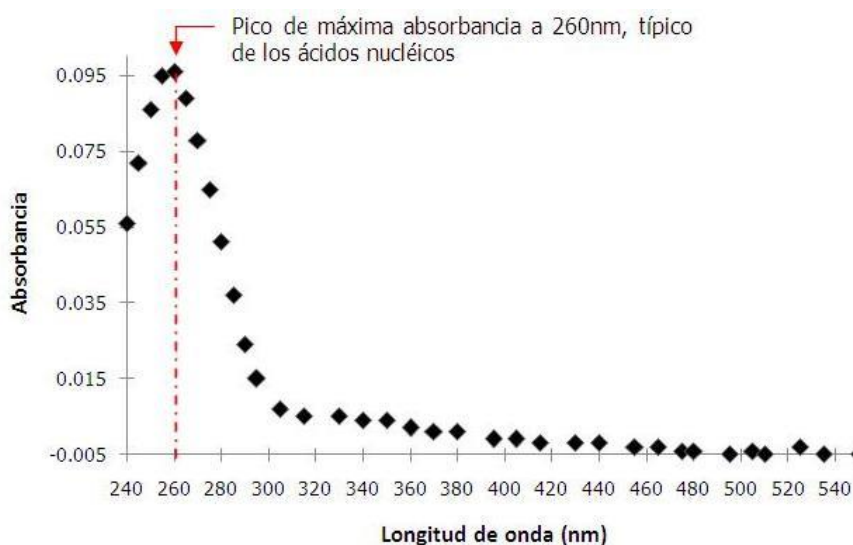


Figura 3. Espectro de absorción UV/Vis (240 a 550 nm) de una muestra pura de ADN genómico obtenido de hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu"

También, el análisis electroforético del ADN genómico purificado, indica que está íntegro y no tiene contaminantes como polisacáridos y ARN (Figura 4). Es evidente que el ADN no está degradado, se observa una banda única e intensa, aunque las intensidades son variables debido a diferencias en la concentración del ADN obtenido de las diez muestras. Asimismo, la ausencia de polisacáridos podemos atribuir a que no se observa ADN retenido en los pocillos del gel. Por otra parte, en la sección inferior del gel no se detecta ARN ribosomal.

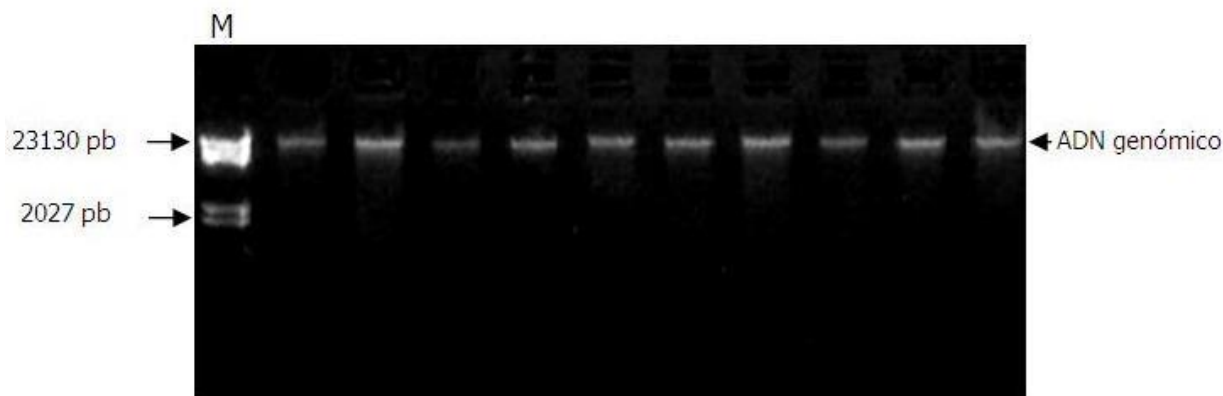


Figura 4. Gel de agarosa al 1% con muestras de ADN genómico obtenido de hojas de diez ejemplares de *Myrciaria dubia* "camu camu". Electroforesis se realizó a 80V por 1 hora en buffer TBE 0.5X. M: Marcador de peso molecular (ADN del fago λ /Hind III).

Finalmente, podemos manifestar que el ADN purificado no contiene inhibidores de la ADN polimerasa taq. Lo indicado se sustenta en el hecho que se ha logrado sintetizar amplicones de diversos tamaños con el RAPD (Figura 5). Los amplicones de RAPD presentaron tamaños de más de 100pb a >1000pb. También, es notorio que existen bandas monomórficas y polimórficas, en consecuencia, el cebador empleado podría ser útil para estudios de diversidad genética de la especie mediante RAPD.

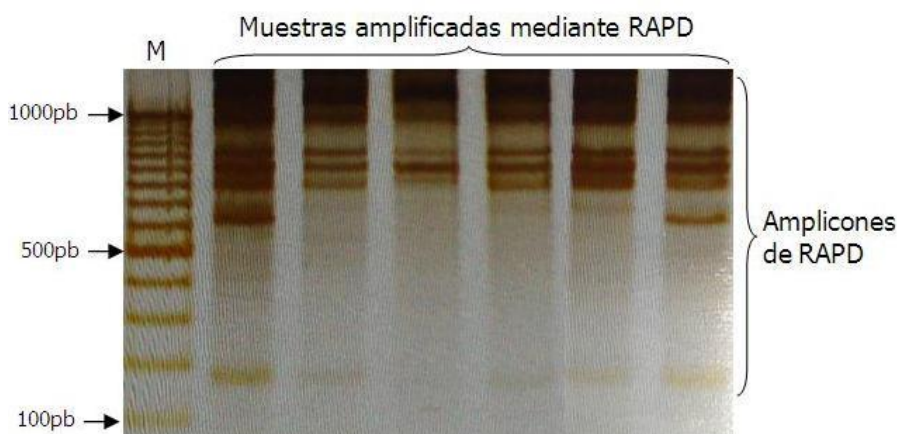


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 8% con amplicones generados mediante RAPD a partir del ADN genómico purificado de *Myrciaria dubia* "camu camu". Las bandas de ADN fueron reveladas por tinción argéntica. La electroforesis se realizó a 100V por 2 horas en buffer TBE 1X. M: Marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder).

DISCUSIÓN

Mediante el protocolo descrito se ha aislado el ADN genómico de *Myrciaria dubia* "camu camu" caracterizado por su calidad apropiada. Por análisis espectrofotométrico, el ADN purificado presentó ratios (A_{260}/A_{280}) que son considerados de alta calidad (Tabla 1). Asimismo, el espectro de absorción UV/Vis mostró la pureza del material genético obtenido (Figura 3) a pesar de no emplear nitrógeno líquido en el proceso de trituración del tejido vegetal. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores que emplean nitrógeno líquido para facilitar la trituración de sus muestras. Entre estos, el ADN aislado de *Camellia sinensis*, *Phytolaca dodecandra* y *Vicia faba* tienen ratios de calidad de 1.69 a 1.91 (Dehestani y Kazemi, 2007). Asimismo, el ADN purificado de hojas de *Litchi chinensis*, tienen un ratio de 1.9 (Puchooa, 2004). Similarmente, Nieto et al. (2005), obtienen un ratio de 1.7 para el ADN purificado de *Tectona grandis*. Ribeiro y Lovato (2007), registran ratios ≤ 1.5 y ≤ 2.0 en el ADN purificado de 23 especies del género *Dalbergia*, siendo común los ratios más bajos en el ADN obtenido de hojas secas, en comparación con el aislado de hojas frescas. Shahzadi et al. (2010), reportan ratios de 1.3 a 1.8 en el ADN purificado a partir de hojas secas y frescas respectivamente, de *Tagetes minuta*. También, Madhan et al. (2009), registran ratios de 1.5 a 1.8 en el ADN aislado de *Gmelina arborea*, pero a diferencia de nuestro protocolo, el tampón de extracción que emplearon contenía dodecilsulfato de sodio como detergente y proteinasa K para hidrolizar las proteínas contaminantes. Finalmente, Li et al. (2007), muestran ratios de 1.80 a 1.89 en el ADN purificado de hojas de *Helianthus annuus*. Cabe indicar que estos autores no emplearon nitrógeno líquido, pero sí congelaron sus muestras a -80°C antes de proceder a su trituración.

De acuerdo a Porebski (1997), los ratios de absorbancia bajos (≤ 1.5) indican que el ADN está contaminado con polifenoles y otros metabolitos secundarios. Por otra parte, los ratios altos (> 2.0) pueden indicarnos degradación del ADN, porque a mayor fragmentación del ADN más bases nitrogenadas absorben la luz ultravioleta a 260nm, incrementándose la absorción a esta longitud de onda. Además, este incremento causa una sobreestimación de la concentración de esta macromolécula.

Otras evidencias experimentales nos sugieren que el ADN genómico purificado del "camu camu", está exento de compuestos contaminantes. Así, en las etapas de precipitación y concentración por centrifugación se observó un precipitado blanquecino de ADN. Después de añadir el tampón TE el ADN se disolvió completamente y la solución fue translúcida. Algunos estudios indican que en la etapa de homogenización del proceso de extracción del ADN, los polifenoles son oxidados a quinonas altamente reactivas por acción de las polifenol oxidasas. Estas quinonas se unen covalentemente y oxidan irreversiblemente a las proteínas y ácidos nucleicos, también pueden inducir reacciones de polimerización y condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo pigmentos de color café (Mayer y Harel, 1979; Vaughn y Duke, 1984; Walker y Ferrar, 1998) haciendo que el ADN sea inadecuado para muchas aplicaciones de investigación a nivel molecular (Porebski et al., 1997; Lomis, 1974; Romano y Brasileiro, 1999).

Además, el gel de agarosa (Figura 4) revela que el ADN purificado del "camu camu" no está degradado (no tiene apariencia de un cometa), es una banda íntegra y migró completamente de los pocillos del gel. Este hecho, nos indica que el ADN no está contaminado con polisacáridos, porque cuando estos compuestos co-precipitan con el ADN, forman complejos insolubles con éste y en esa condición los geles muestran que un grupo de moléculas de ADN queda retenido en el pocillo. Finalmente, al obtener amplicones mediante RAPD del ADN genómico purificado, también se demuestra la alta calidad del material genético. Debido a que no presenta compuestos inhibidores o que inactiven a la ADN polimerasa taq. Los problemas encontrados en el aislamiento de ADN de alto peso molecular de plantas medicinales y aromáticas se deben a la degradación debido a endonucleasas, co-aislamiento de polisacáridos altamente viscosos y compuestos inhibidores como polifenoles y otros metabolitos secundarios que directa o indirectamente interfieren con las reacciones enzimáticas (John, 1992; Romano y Brasileiro, 1999).

El rendimiento del protocolo empleado fue variable entre las muestras analizadas (Tabla 1). El más alto fue hasta tres veces mayor al de menor rendimiento. Estas diferencias se pueden atribuir a

determinados factores, como la cantidad variable de células destruidas y lisadas en la etapa de trituración e incubación a 65°C. En consecuencia, este paso determinaría la cantidad de ADN liberado. Otro factor que puede ayudarnos a explicar estos resultados es el empleo de hojas tiernas pero con diferente estado de desarrollo. En principio, las hojas más tiernas son más fáciles de destruir en el proceso de triturado por presentar paredes celulares más finas y estar constituidas principalmente por celulosa. Sin embargo, las hojas más desarrolladas (adultas) son más difíciles de romper por poseer paredes celulares más gruesas y estar constituidos por otros polisacáridos además de la celulosa. Algunos reportes de purificación de ADN de otras especies de plantas (Dehestani y Kazemi, 2007; Puchooa, 2004) muestran rendimientos similares al que obtuvimos con "camu camu". Por otra parte Porebski et al. (1997), obtienen rendimientos bajos (>20 µg ADN/g hoja). En contraste, Li et al. (2007) y Madhan et al. (2009), reportan altos rendimientos de 1333 a 1500 y 5000 µg ADN/g hoja respectivamente.

CONCLUSIONES

Se ha establecido un protocolo de aislamiento de ADN genómico a partir de hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu", caracterizado por permitirnos obtener ADN de alta calidad y cantidad suficiente para análisis moleculares como el RAPD.

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". Al M.Sc. Pedro Marcelino Adrianzen Julca por el apoyo en el desarrollo de la investigación y al Dr. Jorge Luis Marapara Del Aguila por las facilidades brindadas en el Laboratorio de Biotecnología.

REFERENCIAS

- Bassam BJ, Gresshoff PM. 2007. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols* 2(11), 2649-2654.
- Bradfield RB, Roca A. 1964. Camu-Camu-a fruit high in ascorbic acid. *J Am Diet Assoc* 44, 28-30.
- 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.
- Dehestani A and Kazemi SK. 2007. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian Journal of Plant Sciences* 6(6), 977-981.
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11-15.
- Fang G, Hammar S and Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques* 13, 52-56.
- 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), 127-32.
- Jobes DV, Hurley DL and Thien LB. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 44, 349-386.
- John ME. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res* 20, 2381.

- Khanuja PS, Ajit k, Darokar S and Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 1–7.
- Li JT, Yang J, Chen DC, Zhang XL and Tang ZS. 2007. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genet Mol Res* 6(4), 1064-1071.
- Loomis MD. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* 31, 528–544.
- Madhan SR, Sugumaran G, Kalaiyarasu T. and Bubna N. 2009. A rapid method for isolation of high quality DNA from leaves of *Gmelina arborea* (Roxb) for molecular analysis. *International Journal of Biotechnology Applications* 1(2), 16-19.
- Mayer AM and Harel E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, 193-215.
- Mogg RJ and Bond JM. 2003. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. *Mol Ecol Notes* 3, 666-668.
- Nieto JE, Ramos L y Motte E. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana* 7(2), 1-6.
- Porebski S, Bailey LG and Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15, 8–15.
- Puchooa D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology* 3(4), 253-255.
- Ribeiro RA and Lovato MB. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet Mol Res* 6(1), 173-187.
- Romano E and Brasileiro ACM. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotechnol Cienc Desenvol* 2, 0-43.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scott KD and Playford J. 1996. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. *Biotechniques* 20, 974-979.
- Shahzadi I, Ahmed R, Hassan A and Shah MM. 2010. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genet Mol Res* 9(1), 386-393.
- Vaughn KC and Duke SO. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Planta* 60, 106-112.
- Walker JRL and Ferrar PH. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15, 457-498.
- 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), 9531-5.

Recibido: 05 febrero 2012 / **Aceptado:** 10 abril 2012