



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VÍCTOR ALZAMORA CASTRO

“ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA
RESPUESTA A HELADAS EN PAPAS
NATIVAS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MEY-LING RITA ESPINOZA KOU

LIMA – PERÚ

2017

ASESOR DE TESIS

MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez

Coordinador General de Proyectos

Unidad de Genómica de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo

Profesor Auxiliar

Facultad de Medicina

Universidad Peruana Cayetano Heredia

*A mi amado hijo, Joshua, por ser esa gran luz guía que ha iluminado toda mi
existencia en todos los sentidos.*

Agradecimientos

Al MSc. Edgar Neyra, asesor de la tesis, por sus sugerencias durante el desarrollo de la investigación. Al Dr. Carlos Merino por su gran aporte en la orientación de la tesis.

A Diana Martinez por haberme guiado y co-asesorado en esta nueva experiencia de formación en mis estudios de posgrado y por haberme introducido en este cultivo tan maravilloso, la papa.

A Emi Murata, por su paciencia y gran guía en todo el proceso del desarrollo de la tesis.

A la Dra. Noemí Zúñiga por permitirnos usar las instalaciones del INIA en Huancayo y realizar los ensayos de la investigación.

A todos los investigadores de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por haberme facilitado el desarrollo de la tesis en todos los sentidos. A todos los integrantes de este maravilloso grupo de investigación, gracias por su calidez como personas y por hacer de lo rutinario momentos excepcionales.

A los doctores que conformaron mi jurado de tesis, Ph.D. Daniel Clark, Mirko Zimic y Jorge Rodríguez por sus valiosos aportes a la tesis. Pero, en especial al Ph.D. Daniel Clark por sus valiosas sugerencias y comentarios que me permitieron afinar el trabajo de investigación.

A mis queridos padres Tito y Rita por todo su amor y apoyo incondicional durante toda mi formación profesional y durante toda mi vida. A mi pequeño rey Joshua y a mi esposo Eduardo, gracias por su existencia, por todo su apoyo, paciencia y amor, y por cada momento memorable que hemos pasado y seguimos pasando juntos.

A mis compañeras, Inés y Daniela, gracias por las conversaciones, intercambios de ideas y por los divertidos momentos que hemos pasado juntas aunque sean pocos.

A todos ellos, reitero mis más sinceros agradecimientos, **MUCHAS GRACIAS.**

Fuentes de Financiamiento

El presente proyecto de investigación fue financiado con fondos provenientes del CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú) por el financiamiento de los estudios de la maestría en Bioquímica y Biología Molecular, a través de concurso público y como parte del programa de subvención de becas de postgrado.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	7
3.1.	Solanum tuberosum.....	7
3.1.1.	Taxonomía.....	7
3.1.2.	Descripción	8
3.2.	Efecto de bajas temperaturas en papas	8
3.3.	Características para la tolerancia a heladas	9
3.4.	Expresión génica durante heladas	10
3.5.	Secuenciamiento de ARN.....	12
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	14
V.	OBJETIVOS	16
5.1.	Objetivo General	16
5.2.	Objetivo Específico	16
VI.	METODOLOGÍA	17
6.1.	Población	17

6.2.	Procedimientos y Técnicas	17
6.2.1.	Evaluación de la fluorescencia.....	18
6.2.2.	Inducción del estrés por heladas	19
6.2.3.	Análisis de la expresión génica.....	20
VII.	RESULTADOS.....	28
7.1.	Evaluación de la fluorescencia.....	28
7.2.	Extracción de ARN	30
7.3.	Análisis bioinformático	34
7.3.1.	Control de calidad	34
7.3.2.	Alineamiento de las secuencias al genoma de referencia	36
7.3.3.	Ensamblaje de transcritos.....	38
7.3.4.	Expresión diferencial	40
VIII.	DISCUSIÓN	61
IX.	CONCLUSIONES	81
X.	RECOMENDACIONES	83
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
XII.	ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiempos de evaluación del estrés por heladas.	19
Figura 2. Curva de fluorescencia y curva de temperatura de la planta susceptible.	29
Figura 3. Curva de fluorescencia y curva de temperatura de la planta tolerante.	29
Figura 4. Evaluación visual de las plantas de papa después de la inducción del estrés por heladas.	30
Figura 5. Corrida electroforética del ARN extraído de las muestras tolerantes a condiciones de helada.	32
Figura 6. Corrida electroforética del ARN extraído de las muestras susceptibles a condiciones de helada.	32
Figura 7. Corrida electroforética de los productos luego de la amplificación con el gen rRNA en las muestras de las plantas tolerantes.	33
Figura 8. Corrida electroforética de los productos luego de la amplificación con el gen rRNA en las muestras de las plantas susceptibles.	34
Figura 9. Valores Phred de calidad para cada una de las bases de las lecturas.	36
Figura 10. Número de genes diferencialmente expresados, respecto de T0, durante los tiempos de estrés (T1, T2 y T3) en las especies de papas nativas tolerante y susceptible a heladas.	41

- Figura 11.** Número de genes inducidos, reprimidos o que no variaron su expresión en las especies de papas nativas tolerante y susceptible bajo condiciones de estrés por heladas. 43
- Figura 12.** Diagrama de Edwards de los genes diferencialmente expresados durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. 46
- Figura 13.** Diagrama de Edwards de los genes inducidos durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. 48
- Figura 14.** Diagrama de Edwards de los genes reprimidos durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. 49
- Figura 15.** Heatmap de la superposición topológica de genes en las hojas de papa nativa tolerante a heladas.. 54
- Figura 16.** Heatmap de la superposición topológica de genes en las hojas de papa nativa susceptible a heladas. 55
- Figura 17.** Análisis de agrupamiento de los perfiles de expresión génica (módulos) en respuesta a heladas en la especie de papas nativa tolerante. 56
- Figura 18.** Análisis de agrupamiento de los perfiles de expresión génica (módulos) en respuesta a heladas en la especie de papas nativa susceptible. 57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las especies tolerante y susceptible a heladas empleadas en esta investigación.	17
Tabla 2. Códigos de las muestras tolerantes y susceptibles.	21
Tabla 3. Cuantificación (ng/ μ L) y calidad del ARN extraído de las hojas.	31
Tabla 4. Lista de bibliotecas y número total de lecturas generadas de la especie tolerante y susceptible a heladas.	35
Tabla 5. Distribución de los diferentes tipos de lecturas según el mapeo al genoma de referencia.	37
Tabla 6. Número de transcritos identificados en las 24 bibliotecas.	38
Tabla 7. Genes exclusivamente expresados en la planta tolerante durante la respuesta temprana.	50
Tabla 8. Genes del módulo R-M7 de la especie tolerante a heladas.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico.
LAE	Embriogénesis abundante tardía.
COR	Genes regulados por bajas temperaturas.
AFP	Proteínas anti-congelamiento.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.

RESUMEN

Las heladas constituyen un fenómeno recurrente que afectan la producción y el rendimiento de los cultivos como la papa. En el Perú existen algunas especies de papas nativas tolerantes a heladas que constituyen un importante reservorio genético para el fitomejoramiento de este tubérculo. En esta investigación se caracterizó el transcriptoma de la papa en respuesta a heladas utilizando la técnica RNAseq. Se trabajó con una especie de papa nativa tolerante (*Solanum goniocalyx*) y una susceptible (*S. stenotomum*). Se generaron 24 bibliotecas con 31 millones de lecturas por biblioteca. Se observó que aproximadamente 80% de lecturas eran de mapeo único, 9% de mapeo múltiple y 12% no mapean al genoma de referencia. Comparando los niveles de expresión, se notó que la especie tolerante expresaba diferencialmente entre 354 y 629 genes, mientras que la susceptible, entre 1,590 y 3,164. Adicionalmente, se notó que, en la especie tolerante 110 genes son específicamente inducidos durante la respuesta temprana al estrés. Finalmente, se logró correlacionar los perfiles de expresión diferencial entre los genes, obteniéndose 7 módulos (por especie). Esta investigación permitió generar información importante para estudios posteriores en fitomejoramiento de papas de importancia alimenticia y económica que se encuentren perjudicadas por las recurrentes bajas temperaturas.

Palabras clave: RNAseq, heladas, papas nativas, transcriptoma.

ABSTRACT

Freezing temperatures are considered a frequent phenomenon that affect the yield and production of different crops, such as potato. In Peru, some native potato species are frost-tolerant. These native species constitute an important genetic source for phytoimprovement of this tuber. In this research, we characterized the transcriptome of potato in response to freezing stress using RNAseq. We analyzed a frost-tolerant potato species (*Solanum goniocalyx*) and a susceptible species (*S. stenotomum*). We generated 24 libraries with 31 million of reads per library. We were able to observe that approximately 80% were single mapping reads, 9% were multi mapping reads, and 12% were unmapped reads. When comparing the levels of expression, we noticed that frost-tolerant species differentially expressed between 354 and 629 genes. On the other hand, susceptible species differentially expressed between 1,590 and 3,164 genes. Furthermore, we noticed that 110 genes were specifically induced in the frost-tolerant potato during the early response to freezing stress. Finally, we correlated the differential expression profiles among genes, and obtained 7 modules (per species). This research allowed us to generate important information for later investigations in potato phytoimprovement of nutritional value and economic importance that can be injured by freezing temperatures.

Keywords: RNAseq, frost, native potato species, transcriptome.

I. INTRODUCCIÓN

La helada es uno de los principales riesgos climáticos para la agricultura en los Andes (Frère *et al.*, 1975). Este fenómeno atmosférico se presenta cuando la temperatura del aire en las cercanías del suelo desciende por debajo de los 0°C. Los daños pueden manifestarse desde afecciones muy severas hasta la pérdida total de la producción (Torres & Cubas, 2007). Este fenómeno también puede afectar a las especies de cultivos tolerantes a bajas temperaturas (Burton, 1966). Se considera que una papa es tolerante a heladas, si la planta puede sobrevivir a temperaturas bajo -4°C (Li, 1985).

Los aspectos moleculares y los genes involucrados en la respuesta de la planta ante estrés han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Thomashow, 1998; Miura & Furumoto, 2013). Estudios sobre las respuestas de la papa a diferentes condiciones de estrés han permitido identificar un gran número de genes cuya expresión está regulada por estímulos externos. Los genes inducidos por estrés pueden dividirse en dos clases: funcionales y regulatorios. Los genes funcionales son aquellos que codifican proteínas o enzimas de rutas metabólicas, de reparación, o de restablecimiento de una nueva homeostasis compatible con las condiciones externas. Los genes regulatorios involucran genes de percepción y/o transducción de la señal de estrés, como quinasas, fosfatasas o factores de transcripción (Leone *et al.*, 1999; Miura & Furamoto, 2013).

El estrés causado por heladas afecta los procesos metabólicos, las reacciones enzimáticas, las tasas de difusión de sustrato y las propiedades de transporte de

membrana (Hannah *et al.*, 2005). La tolerancia a heladas requiere de la regulación coordinada de varios genes (Leone *et al.*, 1999). En general, estos genes son conocidos como *regulados por frío* (*COR*) (Ouellet & Charron, 2013) y codifican proteínas como LAE o Embriogénesis abundante tardía (*Late Abundant Embryogenesis*, por sus siglas en inglés) y deshidrinas (Dure, 1993), desaturasas para estabilizar las membranas biológicas (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996), y proteínas anticongelantes o AFPs (*Anti-Freezing Proteins*, por sus siglas en inglés), que restringen la formación de cristales de hielo (Griffith & Yaish, 2004).

La expresión de los genes *COR* (*Cold Resistant*, por sus siglas en inglés) es activada por la disminución en la fluidez de la membrana (aumentan su rigidez), producto del descenso en la temperatura del ambiente. Según Murata y Los (1997), la membrana plasmática es el principal sensor de los cambios en la temperatura debido al cambio en su estado físico. En condiciones de bajas temperaturas, el aumento en la rigidez de la membrana conlleva a un notorio incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico (Knight *et al.*, 1991). El incremento significativo de Ca^{2+} regula la expresión de los genes *COR*. Esto se puede verificar utilizando una sustancia que induce la rigidez de la membrana plasmática como el dimetil sulfóxido (DMSO) (Orvar *et al.*, 2000). Este DMSO genera una reducción en la fluidez de la membrana plasmática que puede inducir la expresión de los genes *COR*. Por otro lado, la aplicación de una sustancia que induce la fluidez de la membrana (alcohol bencílico), en bajas temperaturas, previene la inducción de dichos genes (Sangwan *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios de expresión génica de papa en respuesta a heladas emplean la técnica de microarreglos (microarrays) (Rensink *et al.*, 2005). Esta técnica ha permitido evidenciar que aproximadamente 2 000 genes se expresan en respuesta a esta condición de estrés, de los cuales varios son compartidos con la respuesta a salinidad y a altas temperaturas (Rensink *et al.*, 2005). Sin embargo, la técnica de microarreglos está restringida a genes conocidos y posee un rango limitado de cuantificación.

Los avances en la tecnología del secuenciamiento han mejorado los métodos para el estudio de los transcriptomas mediante el secuenciamiento de mRNA (ARN mensajero) en diversos sistemas biológicos (van Verk *et al.*, 2014). La técnica de secuenciamiento ARN, a diferencia de los microarreglos, permite realizar estudios de análisis transcriptómicos, incluso de genes no identificados aún; además, ofrece un amplio rango de cuantificación y tiene altos niveles de reproducibilidad. Estas ventajas convierten a esta técnica en un método de importante utilidad en estudios de expresión de todo el genoma en diversos sistemas biológicos, inclusive de especies cuyos genomas no hayan sido secuenciados aún (Van Verk *et al.*, 2014).

En esta investigación se pretende caracterizar el transcriptoma de la papa en respuesta a heladas utilizando la técnica de secuenciamiento ARN para comparar los transcriptomas de las especies tolerante y susceptible de papas nativas. Con estos resultados estableceremos qué genes se expresan diferencialmente en plantas susceptibles y tolerantes, frente a una helada.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las heladas representan un problema de gran importancia y con gran impacto sobre la agricultura en los Andes. Las regiones más afectadas se ubican entre los 2,500 msnm y los 3,500 msnm (Frère *et al.*, 1975). Las heladas más dañinas son aquellas que se presentan durante los meses de enero y febrero por el alto riesgo de la pérdida total de la producción y, por lo tanto, la reducción de la diversidad genética de estos tubérculos que aún se conservan en dichas zonas (ITDG, 2000).

La papa, así como otros cultivos, puede sufrir daños causados por la exposición a diferentes factores abióticos, como temperaturas bajas (por debajo de los 4°C) que pueden afectar el crecimiento de la planta así como sus niveles de producción (Evers *et al.*, 2012). Los agricultores han buscado reducir los daños en este cultivo a través de métodos de irrigación y corrección de suelos; sin embargo, estos métodos pueden resultar económicamente desventajosos ya que se necesitan realizar instalaciones de irrigación y emplear grandes cantidades de productos químicos en toda el área del cultivo. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos cultivares tolerantes es, por muchas razones, una de las mejores aproximaciones para mejorar el rendimiento de estos cultivos en respuesta a condiciones de estrés (Leone *et al.*, 1999). El mejoramiento genético vegetal o fitomejoramiento tradicional ha sido aplicado en forma empírica a través de cruces de plantas para obtener ejemplares más tolerantes y productivos (Gilleta, 2000). Sin embargo, el proceso es lento y oneroso ya que involucra

cruzamientos dirigidos entre especies cultivadas y silvestres durante varias generaciones. Si bien los programas convencionales de cultivo han incrementado el rendimiento de las cosechas en ambientes con condiciones extremas, existe un gran potencial de este incremento a través de manipulación de genes involucrados en la tolerancia al estrés que generen más y mejores especies en corto tiempo (Castañón, 2001).

En la Sierra del Perú existen más de 2,500 especies de papas nativas conservadas por agricultores andinos y se ha evidenciado la existencia de valiosas fuentes de tolerancia a heladas en algunas especies de estos tubérculos (Ochoa, 2001). Según Hawkes (1990), la diversidad genética de las papas nativas permite su adaptación en los diferentes agro-ecosistemas de los cuales han sido colectadas y/o domesticadas. Por lo tanto, estos tubérculos constituyen un reservorio genético de programas en mejoramiento vegetal. Y con la intención de mantener la diversidad genética e incrementar la producción mundial de papa, se hace necesario el mejoramiento de la adaptación de estos tubérculos al estrés por temperatura (Leone *et al.*, 1999).

La RNAseq es una técnica que usa la estrategia de secuenciamiento masivo lo cual permite conocer el conjunto total de genes transcritos en una célula, y su nivel de expresión, bajo ciertas condiciones en un tiempo dado. A esto se le conoce como perfil transcriptómico (Tang *et al.*, 2009). En la actualidad se tienen diversas publicaciones de estrés abiótico en planta en donde se han empleado esta metodología. Particularmente, los resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana* y *Camelia sinensis* (Wang *et al.*, 2013) en relación al estrés al frío, han revelado la

importancia de varios genes que participan en diferentes mecanismos moleculares, como señales de traducción del Ca⁺ (CDPKs, CBL, calmodulin), así como proteínas quinasas, factores de transcripción, genes que regulan los niveles de ácido graso insaturado involucrados en la regulación de la fluidez de la membrana plasmática, entre otros. Debido a que cada año reduce su costo, esta técnica se ha convertido en un método asequible, además de haber mejorado la eficiencia y la velocidad de descubrimiento de genes.

Para lograr el fitomejoramiento de la papa en respuesta a heladas, se necesita tener información sobre el contenido genético que permite que ciertas especies de papa respondan de manera favorable ante este estrés. Para lo cual resulta de vital importancia responder a las preguntas: *¿Cuál es el perfil de expresión genética en papas nativas tolerantes a heladas en comparación con las susceptibles?*, y *¿qué genes promueven los diferentes mecanismos de tolerancia en respuesta a heladas en papas nativas?*

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Solanum tuberosum*

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo originario del Altiplano Peruano-Boliviano cuyo consumo data desde hace aproximadamente 8,000 años, es uno de los tres cultivos alimenticios de mayor importancia a nivel mundial debido a su gran valor nutricional, adaptabilidad a diferentes climas y sistemas de cultivo (Devaux *et al.*, 2010). En el Perú existen más de 2,500 especies de papas nativas, de las cuales algunas se caracterizan por tolerar diferentes tipos de estrés abiótico como sequía, salinidad o bajas temperaturas, constituyendo un reservorio genético de programas en mejoramiento vegetal (Ochoa, 2001).

3.1.1. Taxonomía

Según Spooner (2011):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Sección: Petota

Especies: *Solanum tuberosum* L.

3.1.2. Descripción

La papa es una planta herbácea anual que puede crecer hasta los 60 cm de alto y producen tubérculos como órganos de almacenamiento. Sus flores pueden poseer pétalos blancos, rosados, rojos, azules o morados con estambres amarillos (Winch, 2006). Después de la etapa de floración, las plantas de la papa producen pequeños frutos verdes con aproximadamente 300 semillas cada uno. Todas las partes de la planta, con excepción de los tubérculos, poseen el compuesto tóxico *solanina* que los hace no aptos para el consumo. Esta planta posee dos tipos de semillas, las *semillas botánicas* y las *semillas tubérculos*. Todas las nuevas especies nacen a partir de las *semillas botánicas* mientras que las clonas de una misma planta nacen a partir de las *semillas tubérculos* (Amador *et al.*, 2001).

3.2. Efecto de bajas temperaturas en papas

La helada es un fenómeno atmosférico que se presenta cuando la temperatura del aire en las cercanías del suelo, desciende por debajo de los cero grados (0°C). Biológicamente hablando, la helada significa la formación de cristales de hielo sobre las superficies como consecuencia de la congelación del rocío o por un cambio de fase de vapor de agua a hielo. El estrés a las heladas incluye temperaturas frías (<20°C) hasta temperaturas congelantes (<0°C) que afectan de forma adversa el crecimiento y desarrollo de las plantas, y disminuye la productividad agrícola.

Dependiendo de la intensidad de la helada, los cultivos de papa pueden sufrir pérdidas totales de la cosecha o pérdidas parciales que evidencian daños en el follaje comprometiendo el rendimiento final del cultivo. El daño por bajas temperaturas en hojas de papa se caracteriza por la pérdida de turgencia y la adquisición de un color oscuro en los tejidos a causa de la infiltración del agua en el espacio intercelular. La infiltración y el flujo de especies reactivas de oxígeno tras el estrés por congelamiento se atribuyen a daños en la membrana celular.

3.3. Características para la tolerancia a heladas

La tolerancia a las heladas está asociada con características morfológicas como menor tamaño de células estomáticas, paredes celulares gruesas, menor área de estomas, hábito arrosado de la planta, dos o más capas de empalizada en el tejido parenquimatoso de las hojas, factores fisicoquímicos como el contenido de lípidos en las células, capacidad de transformación de almidones hacia azúcares, capacidad de formar hielo extracelular, la producción de hormonas como el ácido absísico (ABA), presencia de pigmentos protectores, habilidad para soportar deshidratación celular y mantener la cohesión bajo la presión de congelación (Estrada, 2000).

A nivel celular, la tolerancia a heladas está relacionada con mecanismos que permiten estabilizar las membranas biológicas, induciendo cambios en la composición lipídica de la membrana de las células de plantas. El grado de insaturación de los ácidos grasos en la membrana incrementa en respuesta a bajas temperatura, esto genera una

disminución en la temperatura de fusión (T_m) en la cual ocurre la transición de fase gel a fase líquida cristalina (Harwood, 1994). Todos estos cambios suceden particularmente en respuesta a variaciones en la temperatura ambiental.

3.4. Expresión génica durante heladas

La tolerancia a condiciones de estrés abiótico, como heladas, es un rasgo complejo que requiere una regulación coordinada de varios genes que actúan sinérgicamente o aditivamente (Leone *et al.*, 1999). Los genes que son inducidos por bajas temperaturas son conocidos, en general, como genes regulados por frío (*COR*) (Ouellet & Charron, 2013). Según Fursova y colaboradores (2009), la expresión de estos genes es inducida por la unión del factor de transcripción *ICE1* (Inducer of *CBF* Expression, por sus siglas en inglés, o inductor de la expresión de *CBF*) al promotor de *CBF3/DREB1A* (factor de transcripción tipo AP2 que regula la expresión de los genes *COR*) (Chinnusamy *et al.*, 2007). Muchos de estos genes codifican polipéptidos con probables roles protectores (Ingram & Bartels, 1996), como las proteínas desaturasas (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996), las proteínas LAE y las deshidrinas, las cuales se acumulan en respuesta a sequía, salinidad y bajas temperaturas (Dure, 1993).

La identificación de los genes que codifican desaturasas ha permitido entender el proceso de estabilización de las membranas celulares durante el estrés por heladas. Estos genes han sido estudiados como mecanismo de tolerancia a heladas (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996). Por ejemplo, la especie *Solanum commersonii* resiste

temperaturas desde -3°C hasta los -10°C, mientras que *S. tuberosum* evidencia severos daños a 0°C (Chen & Li, 1980). Esta diferencia en la respuesta al frío se puede deber a las diferencias en el contenido de ácido linoleico (18:2) entre ambas especies. *Solanum commersonii* aumenta dicho contenido de 32% a 39.6% del peso total de los ácidos grasos, en respuesta a bajas temperaturas; mientras que *S. tuberosum* sufre una ligera disminución de 36.5% a 35.5% (Palta *et al.*, 1993). Según Grillo y colaboradores (1998), a bajas temperaturas la transcripción del gen *des12*, responsable de convertir el ácido oleico (18:1) en ácido linoleico (18:2) está incrementado en *Solanum commersonii* pero no en *S. tuberosum*.

Por otro lado, la identificación del gen *Nt-SYR1* (en el tabaco) que codifica una syntaxina implicada con la modulación de un canal iónico potasio/cloro en respuesta a ABA en las células guarda permitió tener mayor conocimiento de la vía de señalización dependiente de ABA (Leyman *et al.*, 1999). Esta hormona regula la expresión de muchos genes inducidos por frío (*COR*) (Bohnert *et al.*, 1995). El incremento en los niveles de transcripción de los genes *ATMEKK11* (MAP quinasa quinasa quinasa), *ATMPK3* (MAP quinasa) y *ATPK19* (S6 quinasa ribosomal) en respuesta a estrés por bajas temperaturas y alta salinidad ha demostrado que la participación de quinasas y fosfatasas en esta vía posee un rol importante (Mizoguchi *et al.*, 1997).

Otra ruta de señalización en respuesta a bajas temperaturas es a través de las proteínas anticongelantes (AFPs). Estas proteínas tienen gran afinidad por el hielo y poseen dos propiedades: interfieren con la cristalización del hielo y generan histéresis termal

(tendencia de un organismo a conservar sus propiedades a bajas temperaturas generando una depresión en el punto de congelamiento del agua, al unirse las AFPs a la superficie de los cristales de hielo en formación. Las AFPs se acumulan en grandes concentraciones en el espacio apoplástico (espacio extracelular) donde restringen la formación de cristales de hielo más grandes mediante el revestimiento de los mismos, de esta forma las células de las plantas pueden sobrevivir las condiciones congelantes (Griffith & Yaish, 2004).

3.5. Secuenciamiento de ARN

RNAseq es una técnica molecular que emplea tecnologías de secuenciamiento profundo. En general, un tipo de ARN (como aquella con un fragmento poli A en un extremo) es convertido en una biblioteca de fragmentos de cDNA (ADN complementario) a los cuales se les ha adherido adaptadores en uno o ambos extremos. Cada molécula amplificada es luego secuenciada con alto rendimiento (*high-throughput*) para obtener secuencias cortas desde un extremo (secuenciamiento *single-end*) o desde ambos extremos (secuenciamiento *pair-end*). Las lecturas tienen entre 30-400bp dependiendo de la tecnología de secuenciamiento del ADN empleado. Durante el análisis posterior al secuenciamiento, las lecturas son alineadas a un genoma de referencia o a transcritos de referencia para estudiar tanto la estructura transcripcional como el nivel de expresión de cada gen mediante la cuantificación de los genes transcritos (Wang *et al.*, 2009).

Existen investigaciones realizadas en papas bajo estrés biótico o abiótico empleando la técnica de RNAseq como herramienta de análisis (Massa *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Aksoy *et al.*, 2015; Torres, 2014). Uno de los trabajos a resaltar es el de Torres (2014), el cual se realizó en la Unidad de Genómica de la UPCH (Universidad Peruana Cayetano Heredia). Esta investigación se basó en el estudio del transcriptoma de la papa (*Solanum tuberosum* grupo Phureja) bajo estrés por sequía, lográndose identificar genes candidatos de resistencia a sequías.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La papa es uno de los tres cultivos alimenticios de mayor importancia a nivel mundial junto con el trigo y el arroz (FAOSTAT, 2008). Este tubérculo es una valiosa herramienta en la lucha contra el hambre y la pobreza con importancia en la agricultura, economía y seguridad alimentaria del mundo (Devaux *et al.*, 2010). En el Perú, la papa representa uno de los diez alimentos de mayor producción debido a su gran valor nutricional, adaptabilidad a diferentes climas y sistemas de cultivo, por estos motivos son considerados como elementos centrales de la economía familiar y nacional (MINAG, 2007).

En las zonas agroecológicas de puna se presentan, actualmente, eventos climáticos que ponen en riesgo la producción agrícola de papa. Las heladas, las sequías y las granizadas son algunas de las principales anomalías que se han manifestado de manera recurrente durante los últimos años que afectan la producción de los cultivos, disminuyendo su rendimiento y generando diferencias genéticas importantes entre las regiones (Rosenzweig & Liverman, 1992). En los Andes, las pérdidas causan una reducción estimada de la producción anual de 30% en promedio (Estrada, 2000).

Algunas estimaciones sobre los efectos del cambio climático a nivel mundial en los cultivos de papa durante los próximos 50 años, proyectan que el rendimiento del cultivo se vea reducido entre 18% y 32% si las especies no tienen una adaptación adecuada a heladas; sin embargo, estas pérdidas pueden ser menores al 9% si las especies de papa fueran adaptadas a heladas (Hijmans, 2003).

Por lo tanto, surge la necesidad de repotenciar la biodiversidad y priorizar las reservas naturales de papa que tiene nuestro país para afrontar los efectos del cambio climático y reducir su impacto sobre la agricultura, economía y diversidad genética de este tubérculo en el Perú.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar el transcriptoma de hojas de papas nativas en respuesta a heladas, comparando una especie tolerante y una susceptible.

5.2. Objetivo Específico

- Cuantificar y comparar la expresión génica de hojas de especies de papa nativa tolerante y susceptible a heladas.
- Identificar los genes que se expresan diferencialmente entre especies de papa nativa susceptible y tolerante a heladas.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Población

Se cultivaron las especies de papas nativas tolerante y susceptible, a condiciones de heladas, provenientes de las cosechas en los invernaderos de la estación experimental Santa Ana (INIA) localizada en la provincia de Huancayo, en la sierra central del Perú (12°00' LS, 75°13' LO) a 3,260 msnm, con temperaturas entre -4°C y 18°C.

Se trabajó con una especie de papa nativa tolerante y otra susceptible a heladas (Tabla 1) de aproximadamente 10 semanas de crecimiento en condiciones de invernadero.

Tabla 1. Descripción de las especies tolerante y susceptible a heladas empleadas en esta investigación.

	Tolerante	Susceptible
Nombre común	Sumac Soncco	Cceccorani
Género	Solanum	Solanum
Especie	<i>S. goniocalyx</i>	<i>S. stenotomum</i>
País de origen	Perú	Perú
Altura	3300-4000 msnm	3300-4000 msnm

6.2. Procedimientos y Técnicas

Las especies de papas previamente seleccionadas como tolerante y susceptible se cultivaron en tierra vegetal con un perfil nutritivo similar a la tierra de origen, exponiéndolas a temperaturas 18/15°C día/noche y 18 horas de fotoperiodicidad durante 10 semanas en un invernadero, según condiciones descritas previamente por

Seppänen y Coleman (2003).

6.2.1. Evaluación de la fluorescencia

El principio de esta técnica se fundamenta en la capacidad que tiene la planta para disipar el exceso de energía absorbida por las hojas durante la fotosíntesis. La energía puede ser disipada en tres formas: como calor, emisiones de fluorescencia y en las rutas fotoquímicas (Losciale *et al.*, 2011; Greaves & Wilson, 1987; Krause & Weis, 1991). El diseño experimental se realizó según Sundbom y colaboradores (1982), quienes señalan que el patrón de variación de la fluorescencia puede ser usado como indicador en la identificación y evaluación de la tolerancia al congelamiento ya que la fluorescencia será emitida únicamente cuando el traspaso de electrones a la plastoquinona se vea afectado y, por lo tanto, exista daño a nivel fotosintético.

Se consideró las temperaturas de estrés de acuerdo a la evaluación del daño fotosintético. Éste se midió a través de la emisión de fluorescencia utilizando un fluorómetro CI-340 Handheld Photosynthesis System (CID Bio-Science, Inc.). A partir de la curva de fluorescencia de la planta tolerante se eligieron las temperaturas de estrés.

Esta evaluación se realizó en una cámara climática con luz (KBW-400, Binder®). Antes de iniciar las mediciones se realizó un período de calibración del equipo a 4°C durante 30 minutos (en oscuridad), transcurrido ese tiempo, se inició las mediciones

de fluorescencia desde 4°C hasta -4°C en un intervalo de 3 horas. La luz se recibió a través de un foco led de 1 W con rango de flux entre 400-700 nm.

6.2.2. Inducción del estrés por heladas

Como resultado de la evaluación de la fluorescencia, en el diseño experimental se consideró la toma de muestras de 4 tiempos diferentes. El tiempo control (T0) fue la temperatura ambiente en la que se desarrollaron las plántulas de ambas especies (15°C). Para la inducción del estrés, se disminuyó la temperatura hasta 0°C, temperatura a la cual se expusieron las plantas durante 1 h y se tomaron las muestras (T1). En el tiempo de inducción del estrés tardío (T2), se disminuyó la temperatura hasta alcanzar -4°C que se mantuvo por 1 h. El tiempo de recuperación (T3), se evaluó incrementando la temperatura hasta 4°C en 1 h. Estos tratamientos se realizaron tanto en la papa nativa tolerante como en las susceptible (Seppänen & Coleman, 2003) (Figura 1).

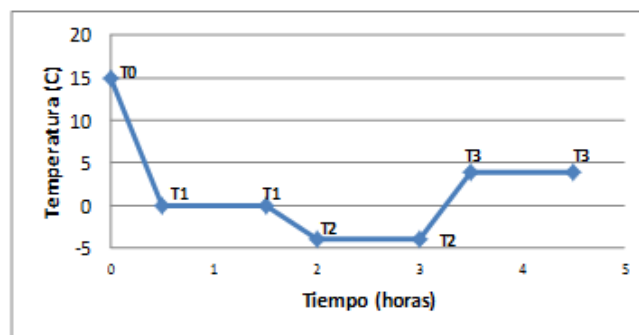


Figura 1. Tiempos de evaluación del estrés por heladas. Variación de la temperatura (eje Y) en el tiempo (eje X). T0 (15°C), tiempo control-sin inducción al estrés. T1 (0°C), inducción temprano del estrés. T2 (-4°C), inducción tardía del estrés. T3 (4°C), tiempo de recuperación.

6.2.3. Análisis de la expresión génica

6.2.3.1. Toma de muestra y extracción de ARN

Se seleccionó al azar tres individuos susceptibles y tres tolerantes, de cada especie se colectaron tres hojas (una hoja por planta -réplicas biológicas) por cada tiempo de evaluación (Tabla 2). En total se trabajó con 24 muestras. Las hojas fueron tomadas de la parte media de la planta de alrededor 10 semanas de edad. Todas las muestras colectadas se conservaron en nitrógeno líquido para su procesamiento en el laboratorio de la Unidad de Investigación Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El ARN fue aislado de 1 - 2 g de hojas por cada planta. El método de extracción de ARN se realizó empleando el reactivo TRIzol® Reagent. Luego se hidrolizó con DNasas utilizando el kit *DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambio®, DNA-free™) con la finalidad de eliminar cualquier presencia de ADN.

La calidad del material extraído fue evaluada en geles de agarosa al 1%. Se analizó mediante electroforesis a 100V por 45 minutos. Adicionalmente se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf®). Para estimar la pureza del ARN obtenido se calcularon las relaciones A260/A230 y A260/A280. La relación A260/A230 revela la presencia de contaminantes orgánicos. Valores entre 2.0 y 2.5 indican una alta pureza del ARN extraído. La relación A260/A280 se utiliza para estimar la presencia de proteínas. Valores entre 1.9 y 2.0 indican una alta pureza del ARN extraído. También

se utilizó la técnica de PCR con cebadores para amplificar el gen rRNA (M-18S rRNA-F/ M-18S rRNA-R) de plantas para descartar contaminación con DNA.

Tabla 2. Códigos de las muestras tolerantes y susceptibles.

Especie	Tratamiento (T)	Repetición (R)	Código
Tolerante	Control	1	T0R1
		2	T0R2
		3	T0R3
	Inducción temprana	1	T1R1
		2	T1R2
		3	T1R3
	Inducción tardía	1	T2R1
		2	T2R2
		3	T2R3
	Recuperación	1	T3R1
		2	T3R2
		3	T3R3
Susceptible	Control	1	T0S1
		2	T0S2
		3	T0S3
	Inducción temprana	1	T1S1
		2	T1S2
		3	T1S3
	Inducción tardía	1	T2S1
		2	T2S2
		3	T2S3
	Recuperación	1	T3S1
		2	T3S2
		3	T3S3

6.2.3.2. Secuenciamiento de ARN

Las muestras de ARN de alta calidad fueron secuenciadas en un secuenciador NextSeq500 generando lecturas cortas desde un extremo (*single-ends*) de 75 bp (pares de bases) con una cobertura de 30 millones de lecturas por muestra. Se generaron 24 bibliotecas provenientes de las 24 muestras. Este proceso se realizó en la UCLA Clinical Microarray Core de la UCLA (Universidad de California, Los Angeles).

6.2.3.3. Análisis bioinformático

El análisis se realizó en un servidor instalado en el área de Hardware, Redes y Sistemas de UPCH, en el cual se encuentra instalado el sistema operativo LINUX, en la distribución UBUNTU versión 14.04.

a. Control de calidad

Se empleó el programa FastQC versión 0.11.2, el cual permite evaluar la distribución de los valores de calidad asociados a los nucleótidos en un formato resumido y graficado de la data. Esto es posible porque la data que se obtiene luego del secuenciamiento presenta el formato FastQ (‘Q’ de *quality*), donde cada base está asociada a un valor de calidad de secuenciamiento llamado *Phred score*, que está relacionado logarítmicamente con la probabilidad de que una base sea errónea. El rango de calidad por base se encuentra entre 0 y 30, donde a mayor valor será menor la probabilidad de error. En la consola Linux se empleó el siguiente comando:

```
>fastq_quality_filter -q 25 -p 50 -i [input.fastq] -o [output_fastqc]
```

b. Recorte y optimización de las lecturas

Antes de realizar el análisis de la data secuenciada, se empleará la aplicación FastQClipper del programa FastX. La aplicación FastQClipper permite eliminar los adaptadores o linkers de cada set de lecturas secuenciados.

```
>fastx_clipper -a [secuencia del adaptador] -l 50 -i [input] -o [output]
```

c. Alineamiento de secuencias con el genoma de referencia

Se utilizó el programa TopHat 2.0.4 (Trapnell *et al.*, 2009) el cual alinea las lecturas del secuenciamiento con el genoma de referencia a través del programa Bowtie versión 2.2.3.0 (Langmead *et al.*, 2009). Bowtie es un alineador ultra rápido y con un alto rendimiento para lecturas cortas. Puede alinear secuencias de pequeño tamaño con un genoma de referencia a una velocidad de 25 millones de lecturas de 35bp por hora. De esta manera, el programa TopHat2 puede analizar los resultados del mapeo por Bowtie para identificar los sitios de empalme entre exones. TopHat2 proporciona valores de RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads, por sus siglas en inglés, o lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas) con un 95% de intervalo de confianza como forma de normalización de los datos (Mortazavi *et al.*, 2008).

Primero se construyeron los archivos de acceso para Bowtie usando el genoma de referencia de la papa (<http://www.potatogenome.net/>) y comando:

```
>bowtie-build reference.fa bt2_PotatoGenome
```

Esto generó 6 archivos:

```
bt2_PotatoGenome.1.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.2.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.3.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.4.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.rev.1.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.rev.2.bt2
```

Luego se corrió el programa TopHat2 usando el comando:

```
>tophat2 -p 7 -i 10 -I 15000 --read-realign-edit-dist 0 --microexon-search --  
min-segment-intron 10 --max-segment-intron 15000 --transcriptome-  
index=../../Genome/index/PotatoTranscriptome/PGSC_DM_V403_genes_mod  
-o output_thout bt2_PotatoGenome Input-clipped.fa
```

Se consideraron los tamaños mínimo y máximo de los intrones de 10 y 15,000 pares de bases, respectivamente. El output de este programa fue una lista de alineamientos de cada lectura en un archivo `accepted_hits.bam` (o `.sam`).

d. Ensamblaje de transcritos y cuantificación de su expresión

Se empleó el programa Cufflinks versión 2.2.1 (Trapnell *et al.*, 2012) para ensamblar los transcritos, determinar su abundancia y verificar la expresión diferencial en las muestras secuenciadas. Este programa ensambla las lecturas alineadas en un set

parsimonioso de transcritos. Así, Cufflinks puede estimar la abundancia relativa de los transcritos en base al número de lecturas que soportan cada una. Cufflinks proporciona valores de FPKM con un 95% de intervalo de confianza como forma de normalización de los datos (Mortazavi *et al.*, 2008).

Se utilizó el comando:

```
>cufflinks -p 7 -u -b [fasta de referencia con corrección de sesgo] -g  
[anotación de transcritos de referencia] -o output_clout input  
(accepted_hits.bam)
```

Cuffdiff versión 2.2.1 es una herramienta incluida en el programa cufflinks y sirve para encontrar cambios en la expresión (\log_2) a nivel de transcritos (antes, durante y después de la inducción del estrés) entre las muestras. Además, permite rastrear variaciones en la abundancia relativa entre transcritos para determinar qué genes son inducidos o reprimidos en respuesta a heladas de las especies tolerante y susceptible.

Se empleó el comando:

```
>cuffdiff -p 7 -o [archivo de salida] -u -b [genoma de referencia] -L T0R,  
T”n”R [anotaciones del transcriptoma] [archivos bam/sam de cada repetición,  
para el control, separados por comas] [archivos bam/sam de cada repetición,  
para el tratamiento, separados por comas]
```

*Para la especie susceptible, se cambiaron las etiquetas en la opción “-L” a “T0S, T”n”S”.

* “n” = 1, 2 y 3; donde 1: respuesta temprana, 2: respuesta tardía, 3: tiempo de recuperación.

Este programa generó los archivos de salida:

- *transcripts.gtf*: archivo con las secuencias ensambladas.
- *isoforms.fpkm_tracking*: archivo con los valores del nivel de expresión de las secuencias en fpkm.
- *genes.fpkm_tracking*: archivo con los valores del nivel de expresión de los genes en fpkm.

e. Redes de co-expresión génica (Gene co-expression network analysis)

Para identificar los módulos de co-expresión de genes se utilizó el paquete WGCNA (Weighted Correlation Network Analysis) del programa R. Antes de correr el paquete WGCNA, se preparó la data realizando los siguientes pasos:

- Se construyeron las matrices de expresión de genes utilizando el programa Cuffdiff para generar perfiles de expresión de los genes a lo largo de los tratamientos.
- Luego, las matrices de expresión se transformaron a su logaritmo (base 2) utilizando un script “log_transform_GSE_matrix” del lenguaje Perl.
- Se filtraron los datos aplicando el coeficiente de variación usando un script de Perl “coefficient_of_variation_filtering_sample” para reducir el número de genes. La finalidad de este filtro es eliminar genes que sean constitutivamente

expresados, que no tengan expresión o que esta varíe de manera no significativa durante los tiempos de estrés por heladas.

- Se armó el clustering jerárquico de cada matriz y se generaron dendogramas representando la relación de similitud en los perfiles de expresión entre los genes analizados.
- Se extrajeron los módulos usando el método Dynamic Tree Cut del paquete WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008). Los parámetros β y tree-cut empleados fueron $22 - 0.7$ para las hojas de la especie tolerante, y $30 - 0.9$ para la especie susceptible. Los demás parámetros fueron usados en su valor por defecto.
- Los valores de expresión de los genes de todos los módulos se transformaron con un “z-score” empleando el script de Perl “generate_z_scores_wrapper.p”.
- Finalmente, se calcularon los eigengenes usando la función moduleEigengenes del paquete WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008), y se generaron los Heatmap.

VII. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la fluorescencia

En la curva de fluorescencia de la planta susceptible (Figura 2) se puede evidenciar a la temperatura 0°C (T1) como punto de inicio del daño a nivel del fotosistema II pues se observó un incremento en la fluorescencia a medida que la temperatura baja hasta los -2°C (~T2). La fluorescencia se mantuvo alrededor de 1,300 unidades desde el inicio del estrés hasta los 0°C. Durante la inducción tardía (T2) al estrés, se observó un aumento progresivo desde las 1 300 unidades hasta más de las 2,500 unidades.

La curva de fluorescencia de la planta tolerante (Figura 3) permite evidenciar que durante el proceso de descenso de la temperatura de 4°C hasta -2°C no se evidenció daño en el fotosistema II. La fluorescencia se mantuvo constante alrededor de 1,000 unidades desde el inicio hasta el final de la inducción del estrés; a 0°C se observó un ligero incremento en la fluorescencia, el cual no superó las 1,000 unidades.

En la evaluación visual de las plantas durante la exposición a las condiciones de estrés por heladas (Figura 4), se observó que la planta tolerante, a diferencia de la susceptible, resultó menos afectada ya que mantuvo su turgencia. Esta observación corresponde con los datos obtenidos de las curvas de fluorescencia.

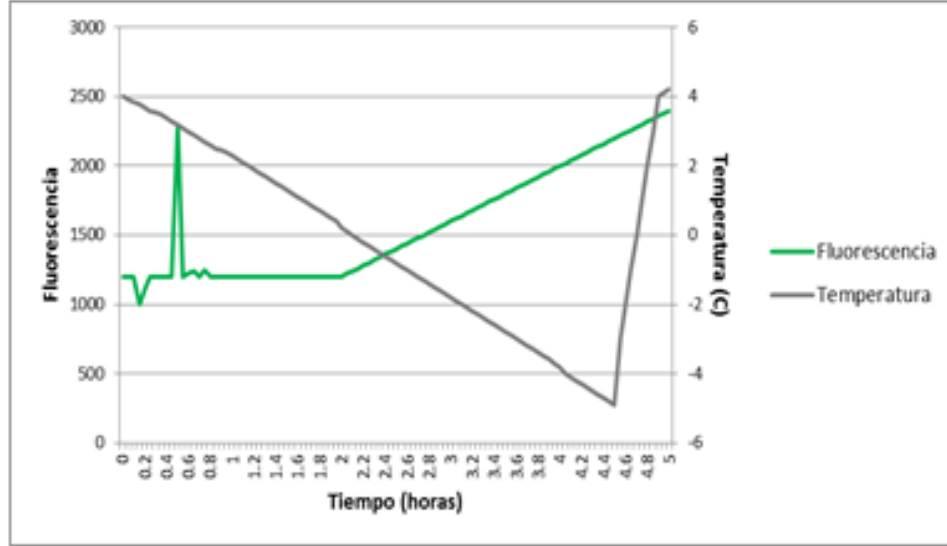


Figura 2. Curva de fluorescencia y curva de temperatura de la planta susceptible, sometida a condiciones de estrés por heladas, donde (eje X: Tiempo (horas); eje Y1: Fluorescencia; eje Y2: Temperatura (°C)). El pico inicial en la curva de fluorescencia representa el encendido de la luz.

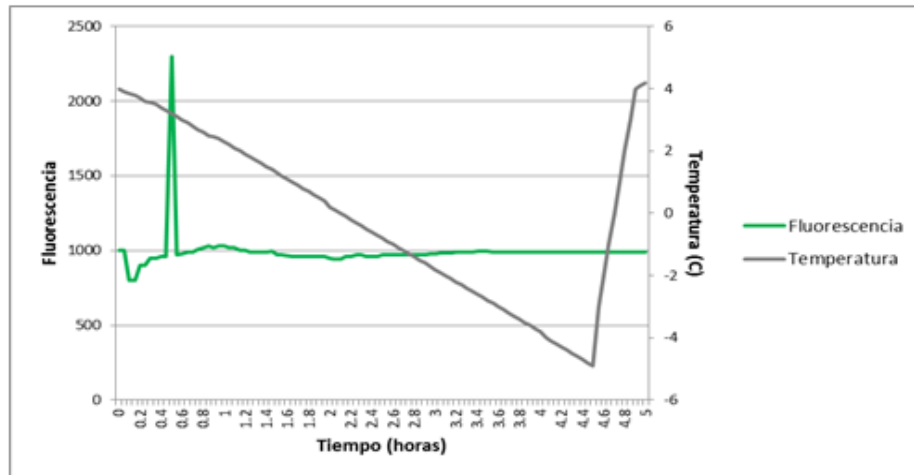


Figura 3. Curva de fluorescencia y curva de temperatura de la planta tolerante, sometida a condiciones de estrés por heladas, donde (eje X: Tiempo (horas); eje Y1: Fluorescencia; eje Y2: Temperatura (°C)). El pico inicial en la curva de fluorescencia representa el encendido de la luz.



Figura 4. Evaluación visual de las plantas de papa después de la inducción del estrés por heladas. 0°C durante 1 hora (estrés temprano), -4°C durante 1 hora (estrés tardío) y 4°C por 1 hora (recuperación). Izq.: especie tolerante. Der.: especie susceptible.

7.2. Extracción de ARN

Se obtuvo ARN de alta pureza con índices de A260/A280 entre 1.9 y 2, y A260/A230 entre 2.0 y 2.5 (Tabla 3). La calidad del ARN fue adecuada ya que se logró observar la presencia de las bandas de los rRNA 28S, 18S y 5S (Figura 5 y Figura 6), no muestra degradación del ARN total extraído y tampoco muestra presencia de ADN genómico. Finalmente, para descartar cualquier posibilidad de contaminación con ADN, se amplificó el gen rRNA universal para plantas (Figura 7 y Figura 8), donde se puede notar únicamente la aparición de la banda de 800 bp (gen rRNA) en el control positivo.

Tabla 3. Cuantificación (ng/ μ L) y calidad del ARN extraído de las hojas. Se midieron los índices de absorbancia A260/280 y A260/230 utilizando un equipo Eppendorf®.

Muestra	ng/μL	A260/A280	A260/A230
T0R1	419.7	2.080	2.11
T0R2	916.2	1.940	2.29
T0R3	672.3	2.010	2.00
T1R1	585.7	2.07	2.40
T1R2	749.1	2.050	2.05
T1R3	584.2	2.050	2.01
T2R1	314.6	1.94	2.11
T2R2	833.7	2.06	2.33
T2R3	772.5	2.04	2.23
T3R1	492.8	1.88	2.05
T3R2	587.8	1.92	2.14
T3R3	629.8	2.02	2.32
T0S1	980.2	2.04	2.10
T0S2	860.7	2.05	2.47
T0S3	612.6	2.04	2.38
T1S1	495.5	1.96	2.16
T1S2	890.3	2.03	2.27
T1S3	342.7	1.98	2.47
T2S1	589.5	2.03	2.30
T2S2	744.2	2.03	2.29
T2S3	536.8	2.03	2.20
T3S1	199.8	1.94	2.42
T3S2	693.3	1.92	2.18
T3S3	666.9	2.04	2.22

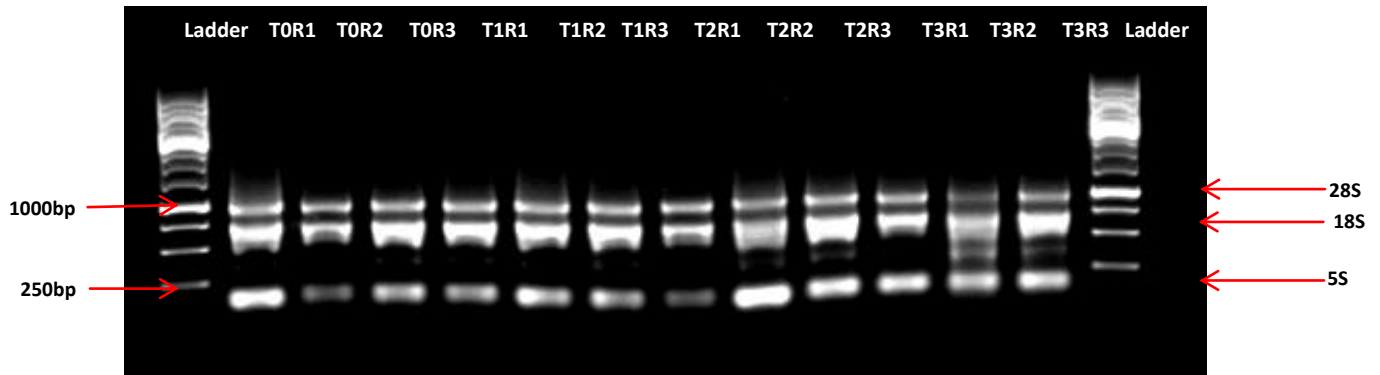


Figura 5. Corrida electroforética del ARN extraído de las muestras tolerantes a condiciones de helada. De Izq. a Der. Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb, T0R1: tiempo control repetición 1-tolerante, T0R2: tiempo control repetición 2-tolerante, T0R3: tiempo control repetición 3-tolerante, T1R1: respuesta temprana repetición 1-tolerante, T1R2: respuesta temprana repetición 2-tolerante, T1R3: respuesta temprana repetición 3-tolerante, T2R1: respuesta tardía repetición 1-tolerante, T2R2: respuesta tardía repetición 2-tolerante, T2R3: respuesta tardía repetición 3-tolerante, T3R1: recuperación repetición 1-tolerante, T3R2: recuperación repetición 2-tolerante, T3R3: recuperación repetición 3-tolerante, y Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb. Obsérvese que no hay presencia de degradación de ARN.

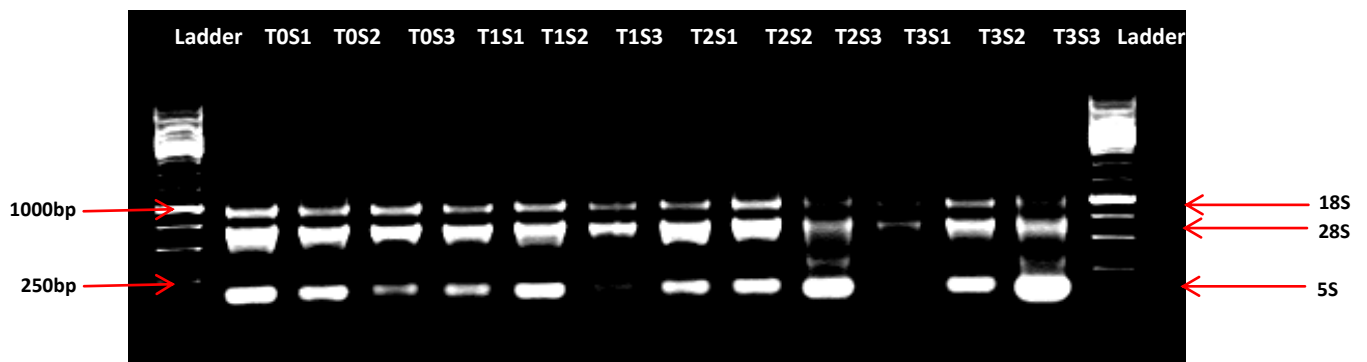


Figura 6. Corrida electroforética del ARN extraído de las muestras susceptibles a condiciones de helada. De Izq. a Der. Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb, T0S1: tiempo control repetición 1-susceptible, T0S2: tiempo control repetición 2-susceptible, T0S3: tiempo control repetición 3-susceptible, T1S1: respuesta temprana repetición 1-susceptible, T1S2: respuesta temprana repetición 2-susceptible, T1S3: respuesta temprana repetición 3-susceptible, T2S1: respuesta tardía repetición

1-susceptible, T2S2: respuesta tardía repetición 2-susceptible, T2S3: respuesta tardía repetición 3-susceptible, T3S1: recuperación repetición 1-susceptible, T3S2: recuperación repetición 2-susceptible, T3S3: recuperación repetición 3-susceptible, y Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb. Obsérvese que no hay presencia de degradación de ARN.



Figura 7. Corrida electroforética de los productos luego de la amplificación con el gen rRNA en las muestras de las plantas tolerantes. De Izq. a Der. Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb, c+: control positivo, T0R1: tiempo control repetición 1-tolerante, T0R2: tiempo control repetición 2-tolerante, T0R3: tiempo control repetición 3-tolerante, T1R1: respuesta temprana repetición 1-tolerante, T1R2: respuesta temprana repetición 2-tolerante, T1R3: respuesta temprana repetición 3-tolerante, T2R1: respuesta tardía repetición 1-tolerante, T2R2: respuesta tardía repetición 2-tolerante, T2R3: respuesta tardía repetición 3-tolerante, T3R1: recuperación repetición 1-tolerante, T3R2: recuperación repetición 2-tolerante, T3R3: recuperación repetición 3-tolerante, y Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb. Obsérvese que no hay presencia de ADN.



Figura 8. Corrida electroforética de los productos luego de la amplificación con el gen rRNA en las muestras de las plantas susceptibles. De Izq. a Der. Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb, T0S1: tiempo control repetición 1-susceptible, T0S2: tiempo control repetición 2-susceptible, T0S3: tiempo control repetición 3-susceptible, T1S1: respuesta temprana repetición 1-susceptible, T1S2: respuesta temprana repetición 2-susceptible, T1S3: respuesta temprana repetición 3-susceptible, T2S1: respuesta tardía repetición 1-susceptible, T2S2: respuesta tardía repetición 2-susceptible, T2S3: respuesta tardía repetición 3-susceptible, T3S1: recuperación repetición 1-susceptible, T3S2: recuperación repetición 2-susceptible, T3S3: recuperación repetición 3-susceptible, c-: control negativo, y Ladder: marcador de peso molecular 250bp-10kb. Obsérvese que no hay presencia de ADN.

7.3. Análisis bioinformático

7.3.1. Control de calidad

Se determinó el número total de lecturas de cada una de las 24 bibliotecas utilizando el programa FastQC (Tabla 4). Al analizar el reporte de este programa, se pudo observar que más de 560 millones de lecturas fueron secuenciadas y, en promedio se secuenciaron más de 31 millones de lecturas por biblioteca.

Tabla 4. Lista de bibliotecas y número total de lecturas generadas de la especie tolerante y susceptible a heladas.

Especie	Muestra	Nombre de la Biblioteca	Total de Lecturas	
Tolerante	T0R1	T0R1.fastq	33,317,984	
	T0R2	T0R2.fastq	30,484,028	
	T0R3	T0R3.fastq	34,002,887	
	T1R1	T1R1.fastq	30,701,296	
	T1R2	T1R2.fastq	34,178,176	
	T1R3	T1R3.fastq	33,152,380	
	T2R1	T2R1.fastq	31,828,104	
	T2R2	T2R2.fastq	30,856,187	
	T2R3	T2R3.fastq	26,853,979	
	T3R1	T3R1.fastq	31,098,204	
	T3R2	T3R2.fastq	25,241,132	
	T3R3	T3R3.fastq	32,932,553	
	Susceptible	T0S1	T0S1.fastq	28,311,328
		T0S2	T0S2.fastq	28,301,751
		T0S3	T0S3.fastq	32,370,728
T1S1		T1S1.fastq	30,012,206	
T1S2		T1S2.fastq	31,110,886	
T1S3		T1S3.fastq	30,173,306	
T2S1		T2S1.fastq	29,904,885	
T2S2		T2S2.fastq	33,123,948	
T2S3		T2S3.fastq	32,053,851	
T3S1		T3S1.fastq	31,563,554	
T3S2		T3S2.fastq	30,910,225	
T3S3		T3S3.fastq	28,075,011	

En el programa FastQC, se calcularon los valores de las calidades de cada base en cada lectura o *Phred Scores*, los cuales se encuentran sobre 30 (Figura 9 y Anexo 3). Esto quiere decir que aproximadamente 1 de cada 1,000 bases tiene la probabilidad de haber sido secuenciada de forma errónea, o existe una precisión de base correcta de 99.9%, según la información del secuenciamiento en Illumina Hi-Seq™ 2000 y NextSeq500.

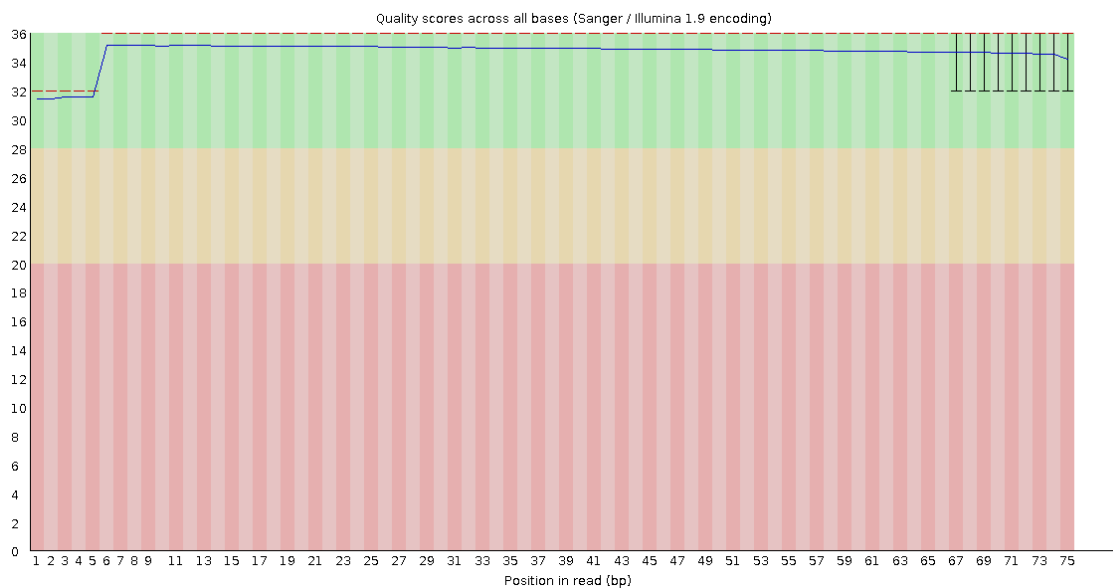


Figura 9. Valores Phred de calidad para cada una de las bases de las lecturas.

7.3.2. Alineamiento de las secuencias al genoma de referencia

Después de correr el programa TopHat2 y en base al alineamiento al genoma de referencia, se observaron tres tipos de lecturas (Tabla 5): lecturas de mapeo único (lecturas que mapean a un único sitio en el genoma de referencia) cuyo porcentaje promedio fue 80%, lecturas múltiples (lecturas que mapean a más de un sitio en el

genoma de referencia) cuyo porcentaje promedio fue 9%, y lecturas no mapeadas al genoma de referencia cuyo porcentaje promedio fue 12%.

Tabla 5. Distribución de los diferentes tipos de lecturas según el mapeo al genoma de referencia.

Muestra	Total de Lecturas	Lecturas únicas	%	Lecturas Múltiples	%	Lecturas No Mapeadas	%
T0R1	33,317,984	27,363,895	81.2	2,691,011	9.0	3,263,078	9.8
T0R2	30,484,028	25,137,805	81.6	1,885,321	7.0	3,460,902	11.4
T0R3	34,002,887	27,979,023	81.4	2,591,535	8.5	3,432,329	10.1
T1R1	30,701,296	25,062,031	80.7	2,751,913	9.9	2,887,352	9.4
T1R2	34,178,176	27,289,084	78.7	3,144,119	10.3	3,744,973	11
T1R3	33,152,380	26,097,122	77.5	2,425,560	8.5	4,629,698	14
T2R1	31,828,104	23,778,209	73.1	5,051,325	17.5	2,998,570	9.4
T2R2	30,856,187	24,720,641	79.1	2,154,470	8.0	3,981,076	12.9
T2R3	26,853,979	21,179,289	77.7	2,069,980	8.9	3,604,710	13.4
T3R1	31,098,204	25,660,937	81.8	1,794,430	6.5	3,642,837	11.7
T3R2	25,241,132	17,847,633	68.7	1,763,464	9	5,630,035	22.3
T3R3	32,932,553	27,385,547	82.4	2,409,224	8.1	3,137,782	9.5
T0S1	28,311,328	23,454,936	82.1	1,798,591	7.1	3,057,801	10.8
T0S2	28,301,751	23,114,334	80.8	1,986,508	7.9	3,200,909	11.3
T0S3	32,370,728	26,277,902	80.2	2,728,029	9.4	3,364,797	10.4
T1S1	30,012,206	24,838,445	82.0	1,815,055	6.8	3,358,706	11.2
T1S2	31,110,886	25,815,494	82.3	1,982,868	7.1	2,312,524	10.6
T1S3	30,173,306	25,180,907	82.7	1,798,413	6.7	3,193,986	10.6
T2S1	29,904,885	24,539,584	81.2	1,870,458	7.1	3,494,843	11.7
T2S2	33,123,948	27,310,925	81.6	2,185,436	7.4	3,627,587	11

T2S3	32,053,851	26,028,117	80.3	2,203,911	7.8	3,821,823	11.9
T3S1	31,563,554	25,138,797	78.5	2,564,053	9.3	3,860,704	12.2
T3S2	30,910,225	25,092,081	80.3	2,255,039	8.2	3,563,105	11.5
T3S3	28,075,011	21,618,260	75.5	2,560,028	10.6	3,896,723	13.9

7.3.3. Ensamblaje de transcritos

El programa Cufflinks permitió el ensamblaje de los transcritos (secuencia de ARN) y el cálculo de su abundancia utilizando el factor de normalización FPKM. Para que un transcrito sea considerado expresado, el nivel de expresión (FPKM) debe ser mayor que 0.001, y el límite inferior de un intervalo de confianza al 95% de la abundancia debe ser mayor que 0.

Se encontró que hubo en promedio 31,065 transcritos por biblioteca, donde la biblioteca TOR1 (repetición 1 de la muestra de hojas para la especie tolerante durante el tiempo control) presentó el valor mínimo de transcritos con 28,180, y la biblioteca T3S3 (repetición 3 de la muestra de hojas para la especie susceptible durante el tiempo de recuperación) presentó el valor máximo de 35,673 transcritos (Tabla 6).

Tabla 6. Número de transcritos identificados en las 24 bibliotecas.

Muestra	Transcritos identificados
TOR1	28,180
TOR2	29,464
TOR3	29,988

T1R1	30,017
T1R2	29,161
T1R3	29,318
T2R1	34,160
T2R2	29,761
T2R3	30,418
T3R1	29,395
T3R2	33,602
T3R3	30,174
T0S1	31,323
T0S2	29,456
T0S3	31,275
T1S1	30,914
T1S2	30,606
T1S3	31,285
T2S1	34,393
T2S2	31,347
T2S3	32,150
T3S1	31,175
T3S2	32,315
T3S3	35,673

7.3.4. Expresión diferencial

Empleado el programa Cuffdiff, se compararon y analizaron los perfiles de expresión de los genes entre las especies tolerante y susceptible para los diferentes tiempos de estrés por heladas a los cuales se sometieron a las muestras.

7.3.4.1. Expresión génica durante el estrés

En comparación con el Tiempo control (T0), se observó que los niveles de expresión diferenciada entre los tiempos de estrés variaron desde 354 hasta 3,164, para la especie tolerante y susceptible, respectivamente (Figura 10).

El nivel de expresión diferenciada, en la especie susceptible, aumentó en el tiempo de estrés temprano (T1), disminuyó durante el estrés tardío (T2), y finalmente aumentó en el tiempo de recuperación (T3). En la especie tolerante se observó un aumento progresivo en la expresión diferenciada, la cual es mayor en el tiempo de recuperación (T3), que es mayor que en el estrés tardío (T2), y ésta, a su vez, es mayor que el estrés temprano (T1).

En el estrés tardío (T2), se notó un aumento en el número de genes diferencialmente expresados de 354 (T1) a 575 (T2) para la especie tolerante a heladas, mientras que en la especie susceptible se observó una disminución de 2,216 (T1) a 1,590 (T2) genes. Durante el tiempo de recuperación, en ambas especies se notó un incremento en el número de genes diferencialmente expresados de 575 (T2) a 629 (T3) en la planta tolerante, y de 1,590 (T2) a 3,164 (T3) en la planta susceptible.

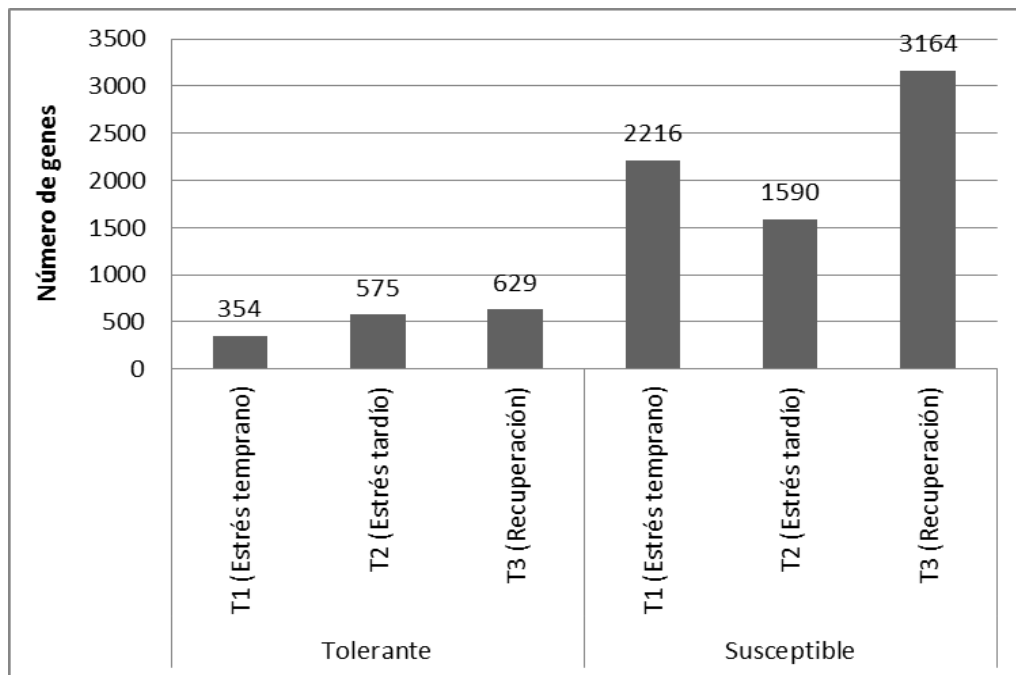


Figura 10. Número de genes diferencialmente expresados, respecto de T0, durante los tiempos de estrés (T1, T2 y T3) en las especies de papas nativas tolerante y susceptible a heladas.

Entre los genes diferencialmente expresados (genes con \log_2 diferente a 0), en la especie tolerante, durante el estrés por heladas en el estrés temprano (T1R) se encontraron aquellos que codifican al factor de transcripción con dominio AP2/ERF, al factor 2 de unión a CRT, a la proteína CBF con dominio AP2, a DREB1, a la LEA 5, a la proteína chalcona sintasa, a la proteína 6B inducida por auxinas, entre otras.

En la especie susceptible, se apreció un mayor número de genes diferencialmente expresados durante el tiempo de recuperación (T3S); entre los genes se encontraron aquellos que codifican proteínas Avr9/Cf-9 de rápida aparición, al factor de

transcripción HBP 1b (C1), a la proteína con dominio NAC, a la lectina 1, a la proteína dedos de zinc, a la proteína DC2.15 rica en prolina, entre otros (Anexo 4).

7.3.4.2. Genes inducidos y reprimidos

Se comparó gráficamente el número de genes inducidos (genes con log2 mayor a 0), reprimidos (genes con log2 menor a 0) y genes que no variaron su expresión, durante los diferentes tiempos de estrés por heladas en las especies de papas nativas tolerante y susceptible al estrés (Figura 11).

En la figura 11 se observa que para la especie tolerante a condiciones de helada existe una tendencia a incrementar el número de genes inducidos durante el estrés, donde 310 genes fueron inducidos durante la respuesta temprana, 412 genes durante la respuesta tardía, y 479 genes durante el tiempo de recuperación, siendo el tiempo de recuperación el que presentó más expresión génica. Por otro lado, durante la respuesta temprana al estrés 44 genes fueron reprimidos, en la respuesta tardía 163 genes reprimidos, y 150 durante el tiempo de recuperación, siendo la inducción tardía el tiempo en el que se observó el mayor número de genes reprimidos. El número de genes que no variaron su expresión durante los tres tiempos de estrés se mantuvo en 19,786, en promedio.

A diferencia de la especie tolerante, en la susceptible se observó una disminución en la activación de genes de la respuesta temprana a la respuesta tardía de 759 a 742, seguido por un incremento en la inducción de genes de 1,321, durante el tiempo de recuperación. La misma tendencia se observa en la represión génica, de 1,457, 848 y

1,843 genes, T1, T2 y T3, respectivamente. Así mismo, cabe resaltar que existe una mayor represión de genes en esta especie en comparación con la especie tolerante. El número de genes que no variaron su expresión durante los tres tiempos de estrés se mantuvo en 18,227, en promedio.

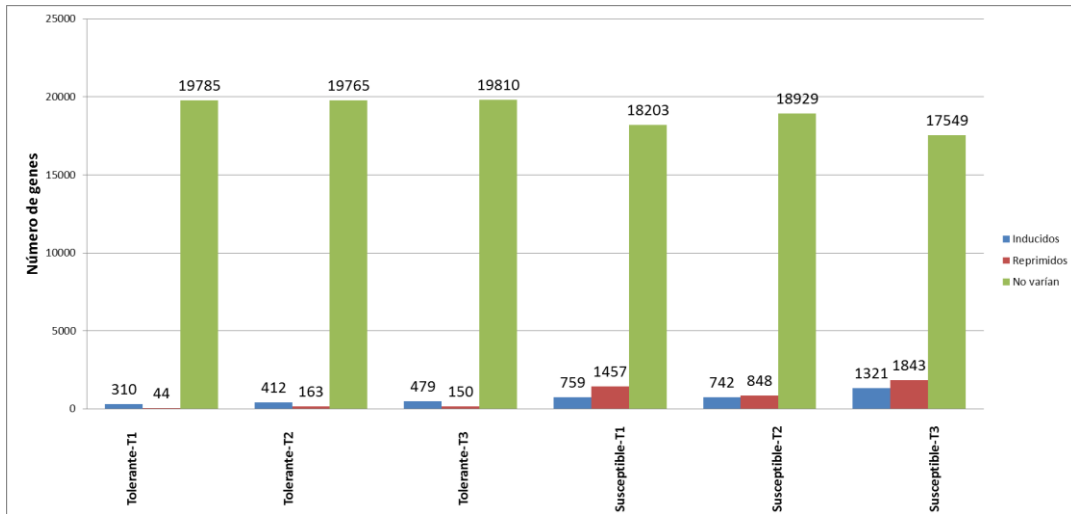


Figura 11. Número de genes inducidos, reprimidos o que no variaron su expresión en las especies de papas nativas tolerante y susceptible bajo condiciones de estrés por heladas.

Entre los genes inducidos en plantas tolerantes durante el tiempo de recuperación se encuentra el factor de transcripción con el dominio AP2/ERF, el factor 2 de unión a CRT, factor 3 de unión a CRT, factor de transcripción HBP-1b, factor asociado a CCR4, DREB1, proteína dedo de zinc tipo C2H2, proteína CBF con dominio AP2, proteínas de respuesta a sales, proteínas dedos de zinc, receptor 1 de membrana, la proteína ZPT2-13, endotransglucosilasas de xiloglicano, proteínas phi-1, proteínas U-box, entre otros (Anexo 5).

Entre los genes reprimidos en el tiempo de recuperación se encuentran las proteínas de unión a la clorofila a/b, las proteínas inducidas por auxinas (SAUR), la enzima aciltransferasa, la enzima glicosiltransferasa, la celulosa sintasa, al inhibidor de la pectinesterasa, la citocromo P450, la patatin grupo O, entre otros (Anexo 6).

7.3.4.3. Expresión génica entre las especies tolerante y susceptible a heladas

Al analizar los perfiles de expresión génica entre ambas especies de papas nativas, se notó que la planta susceptible posee mayor número de genes diferencialmente expresados durante las condiciones del estrés (T1, T2 y T3) en comparación con la planta tolerante.

Durante la respuesta temprana a heladas, la especie tolerante expresó diferencialmente 133 genes únicos y la especie susceptible expresó quince veces más esta cantidad (1,995 genes) (Figura 12). Entre los genes inducidos específicamente en la especie tolerante se encuentra al factor de unión CRT 2, a la proteína CBF condominio AP2, a DREB1, a la proteína LAE, a la proteína dedos de zinc tipo C2H2, al factor asociado a CCR4 y a la proteína SDi inducida en sequía (Anexo 7). En la respuesta tardía, la especie tolerante expresó 245 genes únicos y la susceptible, 1,260; además, ambas especies expresaron diferencialmente 330 genes. Durante el tiempo de recuperación, la planta susceptible expresó catorce veces más (2,722 genes) el número de genes únicos diferencialmente expresados en comparación con la especie tolerante (187 genes), ambas especies compartieron la expresión diferencial de 442 genes. Además, se puede apreciar que las respuestas de las dos especies

durante los tres tratamientos comparten 185 genes diferencialmente expresados, los cuales están relacionados con procesos de metabolismo primario como la subunidad 1 de la citocromo oxidasa c, proteína con dominio NAC, a las proteínas cloroplásticas 3C de unión a la clorofila II a-b, a la proteína lipooxigenasa asociada a varios aspectos fisiológicos de la planta como el crecimiento, desarrollo, y respuesta a estrés, entre otros.

Las respuestas de la especie tolerante durante los tres tratamientos (R-T1, R-T2 y R-T3) comparten 262 genes diferencialmente expresados, entre estos genes se encuentran los asociados con la respuesta de tolerancia a bajas temperaturas, genes de procesos metabólicos primarios y los relacionados con el metabolismo secundario. En la especie susceptible, los tres tratamientos (S-T1, S-T2 y S-T3) comparten con R-T1, 310, 246 y 269 genes diferencialmente expresados, respectivamente. Entre estos genes se encuentran los genes asociados al metabolismo primario en las plantas y genes relacionados con el metabolismo secundario (Figura 12). En general, se observó un menor número de genes inducidos y reprimidos en la especie tolerante en comparación con la especie susceptible (Figura 13 y Figura 14).

Al analizar los genes inducidos durante el estrés por heladas, se puede notar que en la respuesta temprana, la especie tolerante induce específicamente 110 genes y la susceptible, 559. Durante la respuesta tardía, la planta tolerante indujo exclusivamente 161 genes y la susceptible, 488. Para la recuperación, 155 genes son inducidos en la planta tolerante y 1,010, en la planta susceptible

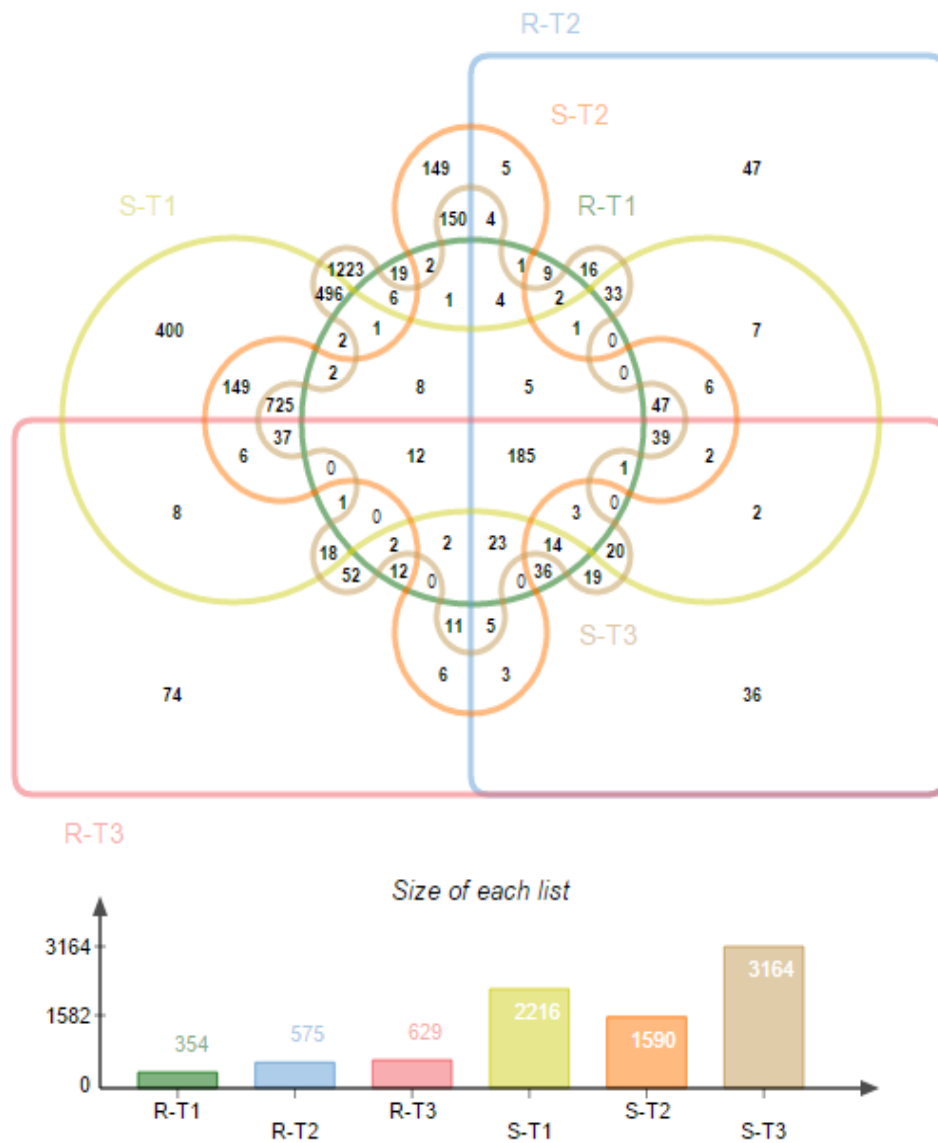


Figura 12. Diagrama de Edwards de los genes diferencialmente expresados durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. Arriba: número de genes diferencialmente expresados en T1, T2 y T3, (únicos y compartidos) entre las especies de papa nativa tolerante (R) y susceptible (S) a estrés por heladas durante la respuesta temprana al estrés (T1), respuesta tardía al estrés (T2) y durante el tiempo de recuperación (T3). Abajo: tamaño de cada grupo estudiado (R-T1, R-T2, R-T3, S-T1, S-T2 y S-T3).

Se puede apreciar que las respuestas de las dos especies durante los tres tratamientos comparten 181 genes inducidos, los cuales están relacionados con procesos de metabolismo primario. Las respuestas de la especie tolerante durante los tres tratamientos (R-T1, R-T2 y R-T3) comparten 253 genes inducidos, entre estos genes se encuentran los asociados con la respuesta de tolerancia a bajas temperaturas y genes de procesos metabólicos primarios. En la especie susceptible, los tres tratamientos (S-T1, S-T2 y S-T3) comparten con R-T1, 200, 225 y 246 genes inducidos, respectivamente. Entre estos genes se encuentran los genes asociados al metabolismo primario en las plantas (Figura 13). Los genes reprimidos en condiciones de heladas durante la respuesta temprana son 28 en la especie tolerante y 1,441, en la susceptible. En el estrés tardío, 93 genes son reprimidos en la planta tolerante y 778, en la susceptible. Finalmente, durante el tiempo de recuperación, 36 y 1,729 genes son reprimidos en las especies tolerante y susceptible, respectivamente.

Se puede apreciar que las respuestas de las dos especies durante los tres tratamientos comparten 4 genes reprimidos, los cuales están relacionados con procesos de metabolismo secundario. Las respuestas de la especie tolerante durante los tres tratamientos (R-T1, R-T2 y R-T3) comparten 9 genes reprimidos, entre estos genes se encuentran los asociados con el silenciamiento de la respuesta de tolerancia a bajas temperaturas y genes de procesos metabólicos secundarios. En la especie susceptible, los tres tratamientos (S-T1, S-T2 y S-T3) comparten con R-T1, 16, 18 y 21 genes reprimidos, respectivamente. Entre estos genes se encuentran los genes asociados al metabolismo secundario en las plantas (Figura 14).

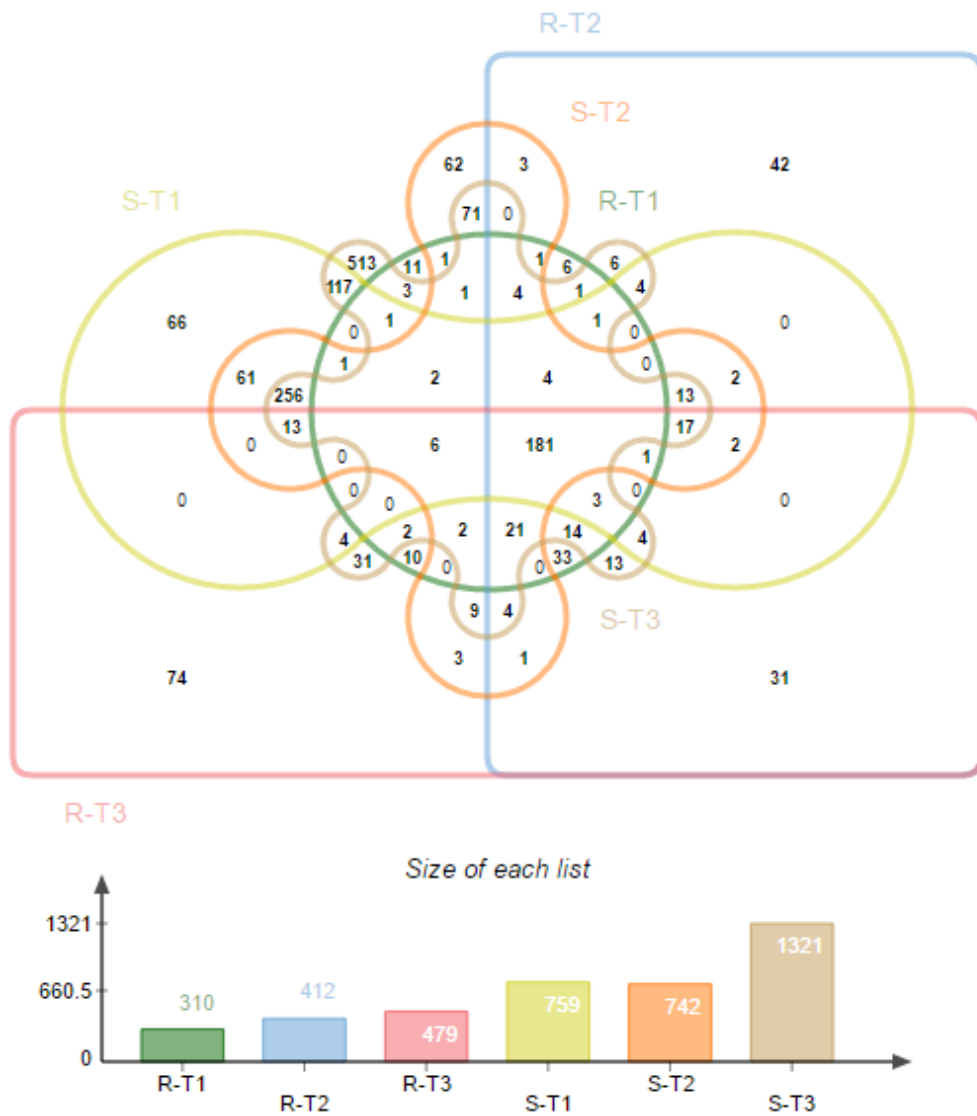


Figura 13. Diagrama de Edwards de los genes inducidos durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. Arriba: número de genes inducidos (únicos y compartidos) entre las especies de papa nativa tolerante (R) y susceptible (S) a estrés por heladas durante la respuesta temprana al estrés (T1), respuesta tardía al estrés (T2) y durante el tiempo de recuperación (T3). Abajo: tamaño de cada grupo estudiado (R-T1, R-T2, R-T3, S-T1, S-T2 y S-T3).

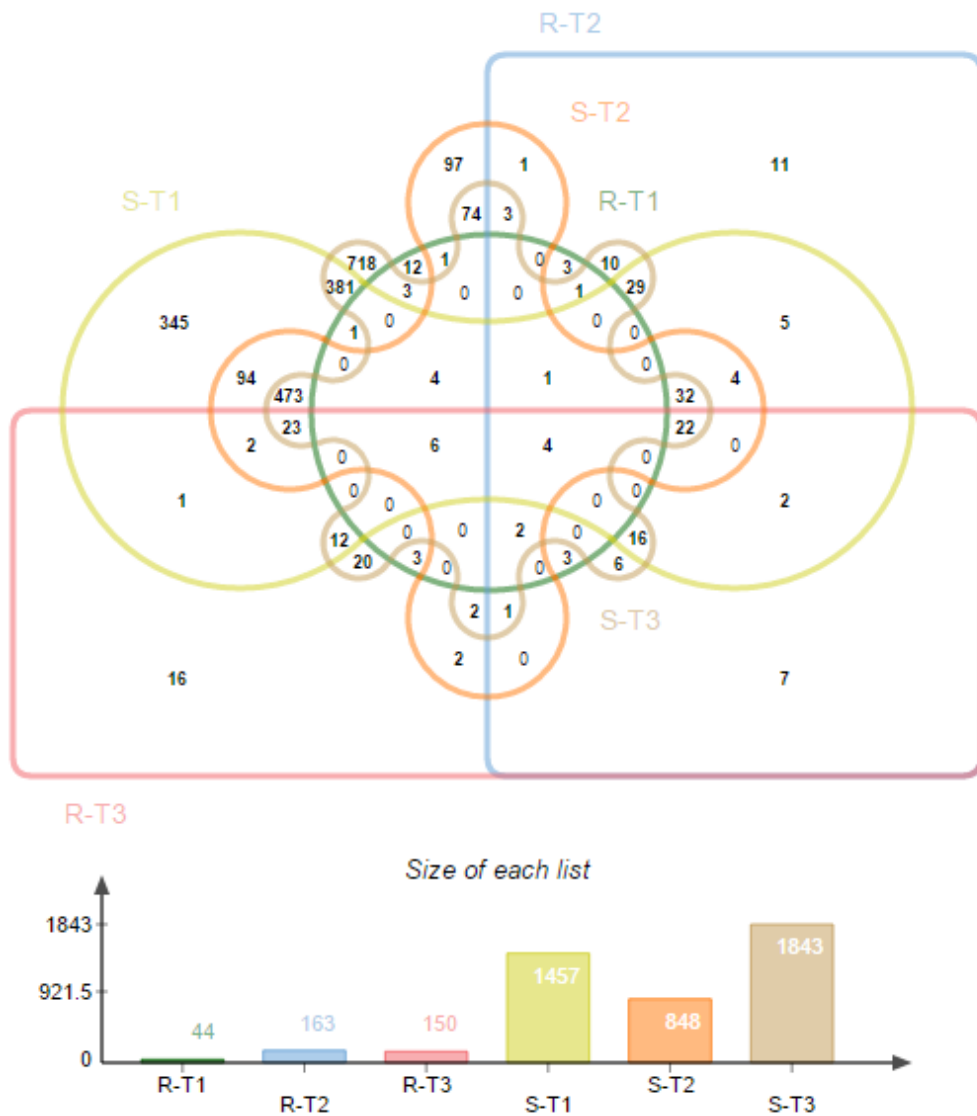


Figura 14. Diagrama de Edwards de los genes reprimidos durante T1, T2 y T3 en las papas nativas tolerantes y susceptibles a heladas. Arriba: número de genes reprimidos (únicos y compartidos) entre las especies de papa nativa tolerante (R) y susceptible (S) a estrés por heladas durante la respuesta temprana al estrés (T1), respuesta tardía al estrés (T2) y durante el tiempo de recuperación (T3). Abajo: tamaño de cada grupo estudiado (R-T1, R-T2, R-T3, S-T1, S-T2 y S-T3).

Luego de analizar la expresión génica entre ambas especies, se pudo observar genes exclusivamente expresados (genes con log2 diferente a 0), en la especie tolerante, durante el estrés por heladas en el estrés temprano (T1R), entre estos genes se encontraron aquellos que codifican al factor de transcripción con dominio AP2/ERF, al factor 2 de unión a CRT, a la proteína CBF con dominio AP2, a DREB1, a la LEA 5, a los factores de transcripción WRKY, a la proteína chalcona sintasa, a la proteína 6B inducida por auxinas, a la ZPT2-13, a las proteínas U-box, a la HBP-1b (C1), entre otras. (Tabla 7).

Tabla 7. Genes exclusivamente expresados en la planta tolerante durante la respuesta temprana. PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster, TOR: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, T1R: nivel de expresión (fpkm) en la respuesta temprana al estrés.

PGS_id	UNIREF	TOR (fpkm)	T1R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG400002899	AP2/ERF domain-containing transcription factor	0.250792	26.157	6.70456
PGSC0003DMG400015534	ZPT2-13	0.488712	50.2236	6.68324
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2	0.220466	17.6256	6.32097
PGSC0003DMG400014310	AP2 domain CBF protein	0.71972	38.5091	5.74162
PGSC0003DMG400009116	Membrane receptor 1	0.17524	6.15928	5.13535
PGSC0003DMG400030826	Phi-1 protein	1.49456	42.0934	4.8158
PGSC0003DMG400002383	C2H2-type zinc finger protein	1.17367	32.9993	4.81334
PGSC0003DMG400005899	CCR4-associated factor	9.76588	239.117	4.61382
PGSC0003DMG400012962	Transcription factor HBP-1b(C1)	0.902381	20.392	4.49813
PGSC0003DMG400021325	U-box protein	1.97472	42.6865	4.43406
PGSC0003DMG400011633	WRKY-type transcription factor	9.08711	155.907	4.10072
PGSC0003DMG400012525	DREB1	0.459812	7.06096	3.94075
PGSC0003DMG400035643	Drought-induced protein SDi	58.6748	616.647	3.39363
PGSC0003DMG400017936	Late embryogenesis abundant protein 5	60.8705	606.441	3.31655
PGSC0003DMG400019408	WRKY transcription factor	0.599141	4.80091	3.00234
PGSC0003DMG400012318	WRKY transcription factor	0.907003	6.88941	2.9252

PGS_id	UNIREF	TOR (fpkm)	T1R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG400005835	WRKY transcription factor-30	10.3129	65.2329	2.66114
PGSC0003DMG400028520	WRKY transcription factor 1	69.0387	412.845	2.58012
PGSC0003DMG400009530	WRKY transcription factor 3	29.3919	168.594	2.52006
PGSC0003DMG400022063	WRKY1a transcription factor	8.18442	44.6051	2.44626
PGSC0003DMG400031140	WRKY transcription factor	81.5562	390.893	2.26091
PGSC0003DMG400000211	WRKY transcription factor	60.5674	266.604	2.13808
PGSC0003DMG400016769	Double WRKY type transfactor	103.64	431.662	2.05832
PGSC0003DMG401031196	WRKY transcription factor 16	68.5601	270.446	1.9799
PGSC0003DMG400008337	MYB21	9.75602	31.6846	1.69942
PGSC0003DMG400015015	WRKY transcription factor	33.8468	78.9981	1.2228
PGSC0003DMG400008188	WRKY transcription factor	42.1288	95.2245	1.17653
PGSC0003DMG400013319	Auxin-induced SAUR	2.76695	0.290932	-3.24954
PGSC0003DMG400000546	UP-9A	12.1992	1.55056	-2.97592
PGSC0003DMG400020939	Sesquiterpene synthase 2	2.78761	0.620525	-2.16747
PGSC0003DMG400017255	ATBET12	30.6906	7.61446	-2.01098
PGSC0003DMG402012192	Zinc finger protein	31.0481	8.93017	-1.79775
PGSC0003DMG400011282	Tryptophan synthase beta chain	9.72115	2.80001	-1.79569
PGSC0003DMG400008632	Chalcone synthase J	6.29125	1.84209	-1.77201
PGSC0003DMG400029856	N-acylneuraminate-9-phosphatase	19.7362	5.86992	-1.74944
PGSC0003DMG400021499	Ctp synthase	10.1785	3.16361	-1.68588

7.3.4.4. Redes de co-expresión génica

Para realizar el análisis de co-expresión génica, se filtraron los datos según el coeficiente de variación (CV) el cual sirve para medir la consistencia de un gen a lo largo de los experimentos. Este CV se calcula como la desviación estándar dividida entre la media, donde valores altos del CV reflejan una inconsistencia entre las muestras dentro de un grupo. Se consideró un CV de 0.5 para la especie tolerante, y un CV de 0.6 para la especie susceptible; los valores mayores a los CV señalados serán eliminados. Con esto, se logró reducir la cantidad de genes, con expresión significativa, a 1,998 genes en la especie tolerante y 2,721 genes en la especie

susceptible a lo largo del proceso que lleva a las plantas desde condiciones normales (T0) al estrés por heladas (T1 y T2) y luego a su recuperación (T3).

Con los datos filtrados, se procedió a construir los módulos (grupos de genes densamente interconectados). Para esto se utilizó la medida de superposición topológica a través del agrupamiento según su jerarquía, el cual usa el principio de disimilitud, como medida de superposición topológica, para reflejar el nivel de similitud entre los perfiles de expresión génica. Las ramas del dendrograma, formado por agrupamiento según la jerarquía, corresponden a los módulos. Estos módulos pueden ser identificados utilizando el método de corte del dendrograma Dynamic Tree Cut, y se representan gráficamente a través de los heatmaps (TOM plots) (Figura 15 y Figura 16). Estos plots representan qué grupos de genes poseen un perfil de expresión coherente y similar durante todo el ensayo, agrupándolos en módulos (Figura 17 y Figura 18). El análisis de los módulos posee importancia informativa ya que la fuerte correlación entre los genes contenidos en cada módulo podría brindar información sobre su relevancia biológica en procesos biológicos o rutas metabólicas.

En total se observaron 7 módulos en ambas especies. Los módulos identificados a lo largo de los diferentes tratamientos (T0, T1, T2 y T3) contenían entre 95 y 435 genes, como mínimo y máximo, respectivamente. En promedio se hallaron 175 genes por módulo. En las hojas de la planta tolerante se encontraron siete módulos con 140, 167, 108, 126, 158, 316 y 216 genes expresados (Figura 17). En la especie susceptible se observaron siete módulos con 117, 435, 185, 99, 104, 176 y 95 genes (Figura 18).

La especie tolerante a heladas presentó 140 genes expresados en el módulo R-M1, este módulo estuvo compuesto por proteínas que permiten la formación o que forman parte de la membrana plasmática y del citoesqueleto como la celulosa sintasa tipo A1, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, alfa tubulina, proteína de unión a la actina, proteína de unión a lípidos, entre otras.

El módulo R-M2, conformado por 167 genes, estuvo compuesto por proteínas como la aldosa 1-epimerasa, lanatosida 15'-O-acetilesterasa, subunidad pequeña 7S de la globulina, citocromo P450, glicosil hidrolasa, receptores quinasa, proteína activadora de Ras-GTPasa, fimbrina, proteína rica en glicina, 3-cetoacil-CoA sintasa, entre otras.

Tanto el módulo R-M3 constituido por 108 genes como el módulo R-M4 conformado por 126 genes, codifican proteínas para el metabolismo de carbohidratos y lípidos, como UDP-glucosa glucosiltransferasas, β -glicosidasa, fosfoglicerato mutasa, triacilglicerol lipasa, α -L-fucosidasa 2, entre otras.

El módulo R-M5, constituido por 158 genes codifica, principalmente, proteínas con función transferasa en diferentes vías metabólicas como la ceramida glicosiltransferasa, β -1,3-glucuroniltransferasa, benzoato carboxil metiltransferasa, antocianidina ramnosil transferasa, O-metiltransferasa, N-acetiltransferasa, entre otros.

El módulo R-M6, con 216 genes, codifica principalmente proteínas como treonina dehidratasa, transportador de azúcares, proteína retrotransposon, monooxigenasa, manosidasas, proteínas del fotosistema II, proteínas cotransportadoras auxina: hidrógeno, troponina reductasas, serina carboxipetidasas, entre otras.

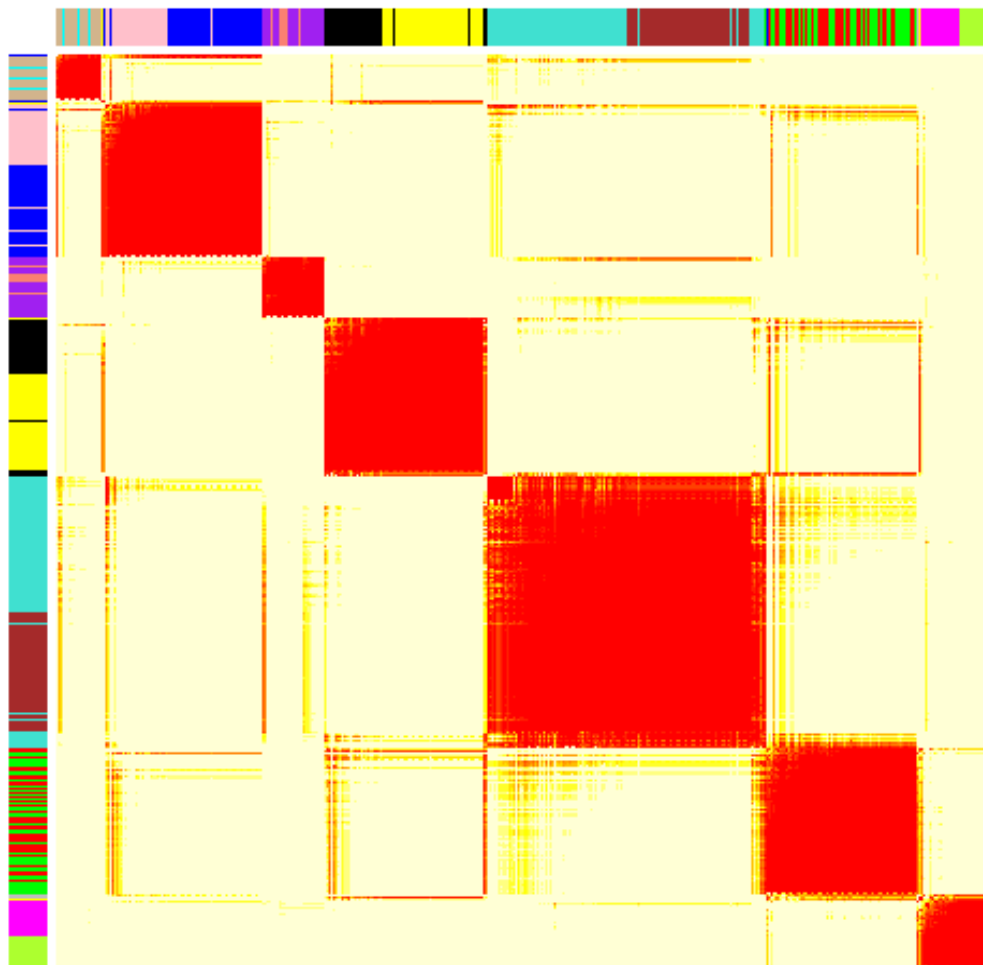


Figura 15. Heatmap de la superposición topológica de genes en las hojas de papa nativa tolerante a heladas. En el heatmap, cada columna y fila corresponde a un gen. Los colores claros (amarillo) denotan una baja superposición topológica, y colores oscuros (rojos) denotan una alta superposición topológica. Los cuadrados rojos a lo largo de la diagonal corresponden a los módulos. La fila y columna de colores muestra los módulos asignados y determinados por Dynamic Tree Cut.

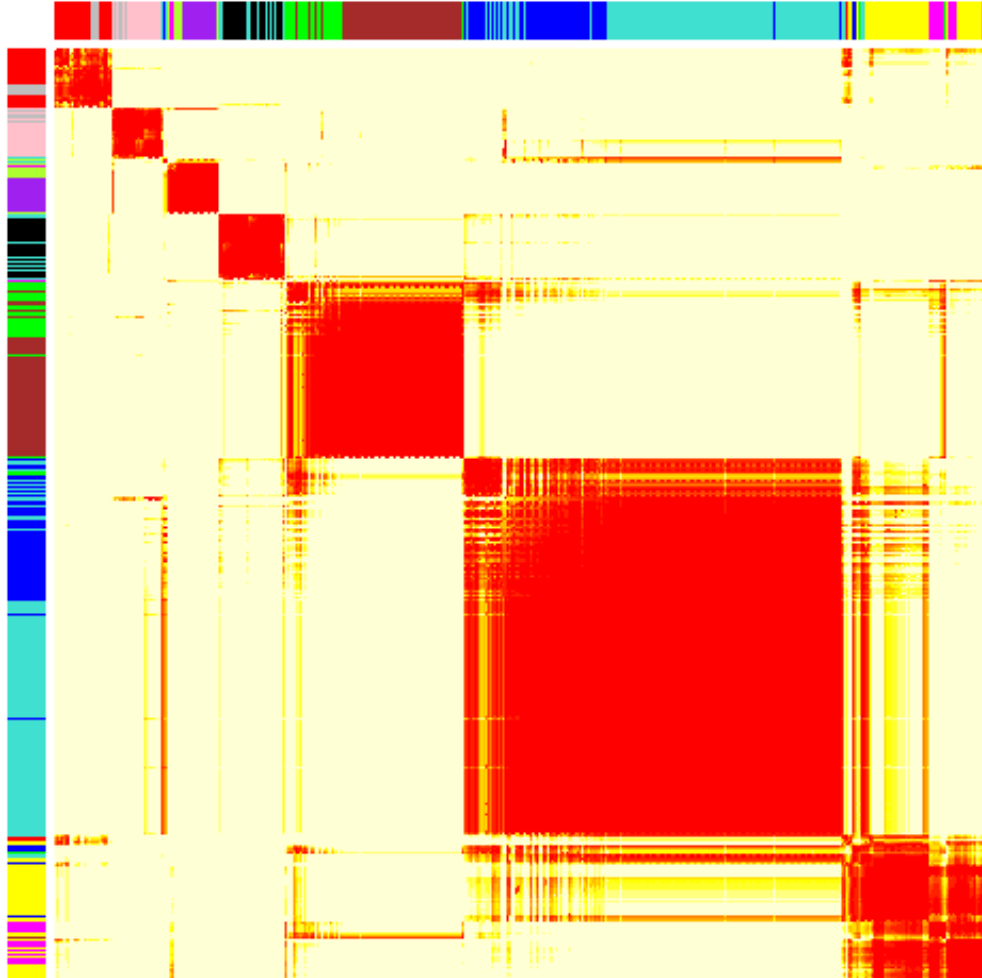


Figura 16. Heatmap de la superposición topológica de genes en las hojas de papa nativa susceptible a heladas. En el heatmap, cada columna y fila corresponde a un gen. Los colores claros (amarillo) denotan una baja superposición topológica, y colores oscuros (rojos) denotan una alta superposición topológica. Los cuadrados rojos a lo largo de la diagonal corresponden a los módulos. La fila y columna de colores muestra los módulos asignados y determinados por Dynamic Tree Cut.

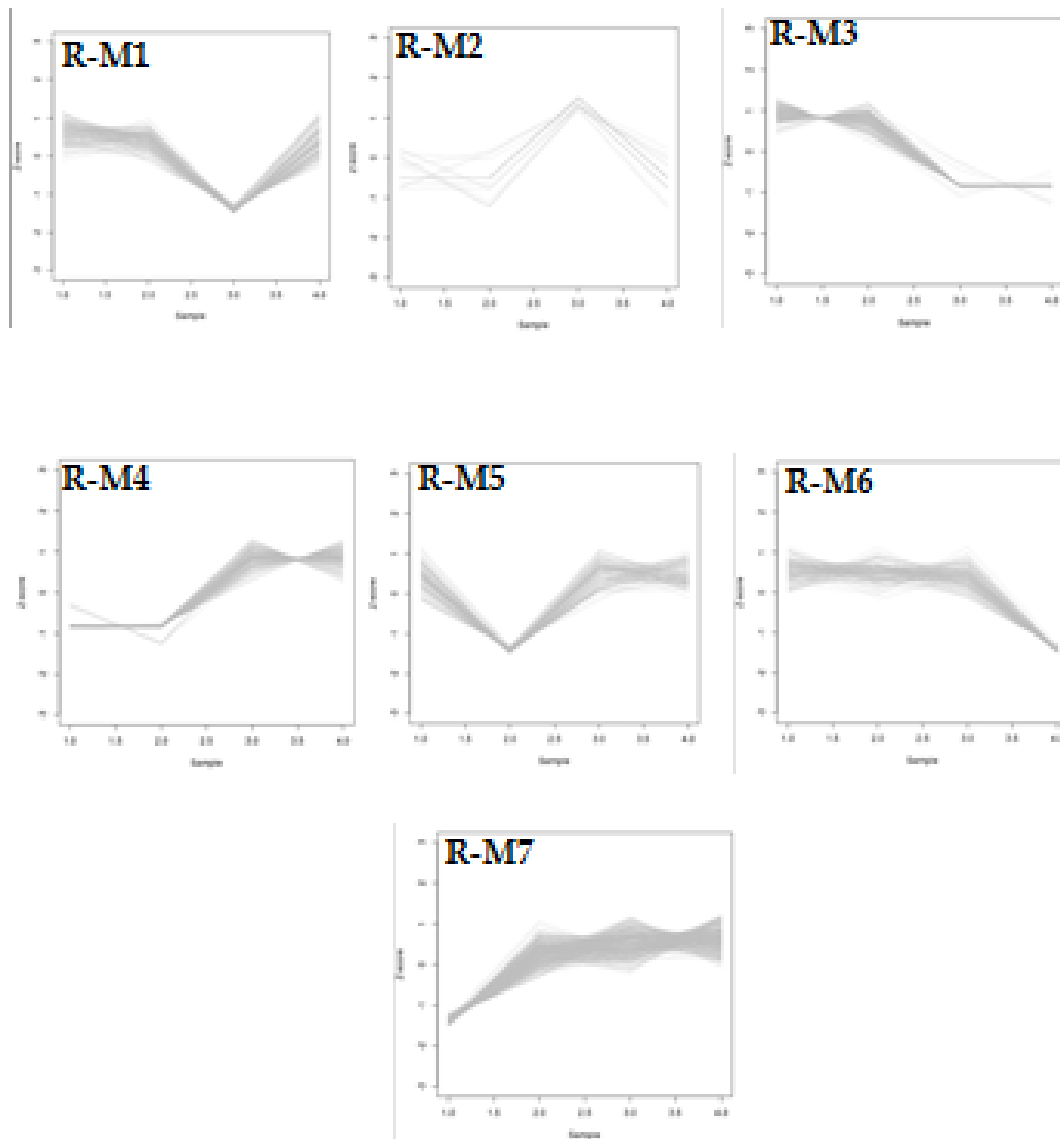


Figura 17. Análisis de agrupamiento de los perfiles de expresión génica (módulos) en respuesta a heladas en la especie de papas nativa tolerante. El eje X muestra los tratamientos T0, T1, T2 y T3 (sample=1, 2, 3 y 4) de izquierda a derecha, respectivamente; el eje Y muestra la fuerza de expresión en z-score, que resulta de la transformación de los valores medios de FPKM de cada réplica. R-M1-7: Módulos del 1-7 en la especie tolerante.

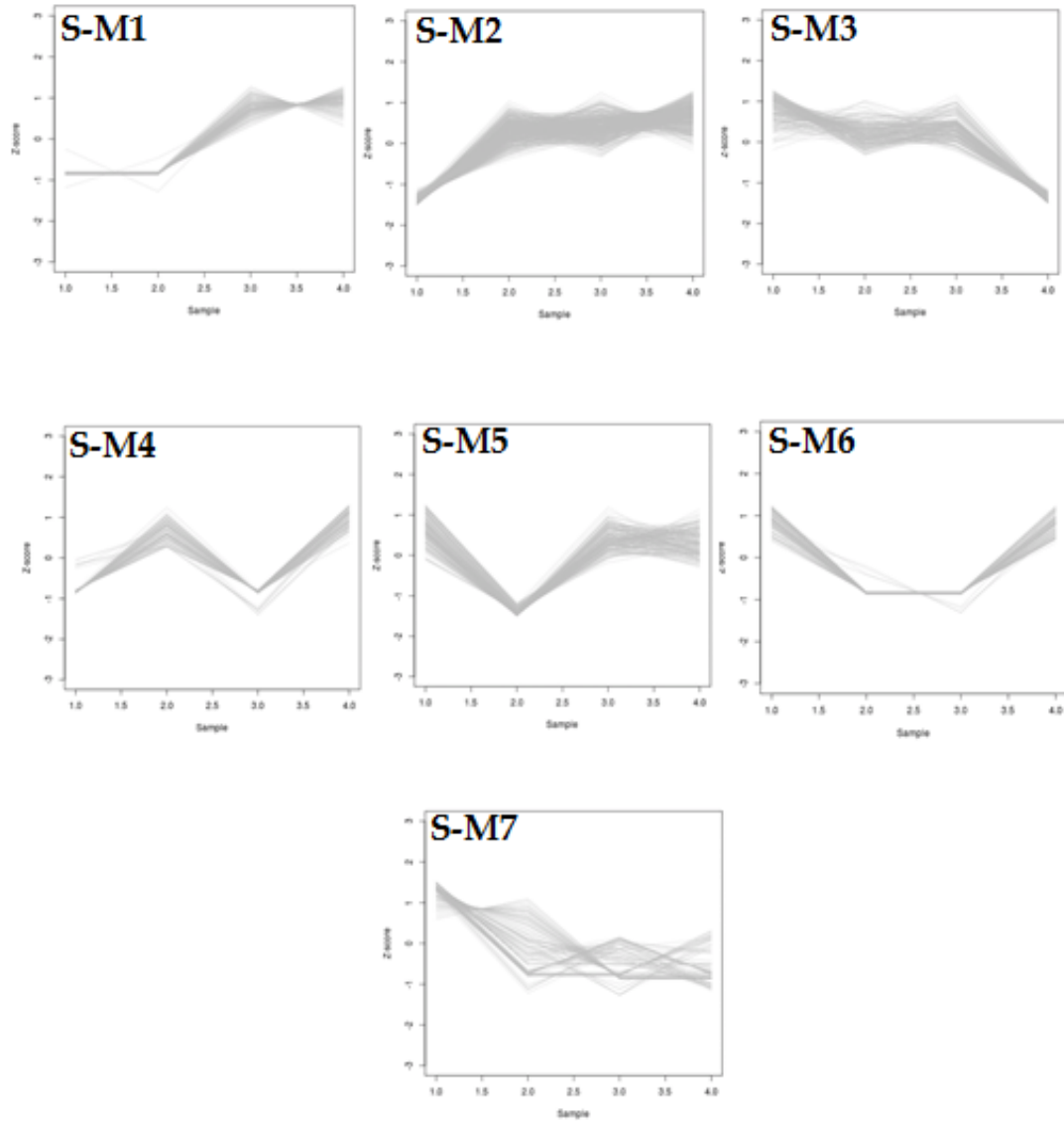


Figura 18. Análisis de agrupamiento de los perfiles de expresión génica (módulos) en respuesta a heladas en la especie de papas nativa susceptible. El eje X muestra los tratamientos T0, T1, T2 y T3 (sample=1, 2, 3 y 4) de izquierda a derecha, respectivamente; el eje Y muestra la fuerza de expresión en z-score, que resulta de la transformación de los valores medios de FPKM de cada réplica. S-M1-7: Módulos del 1-7 en la especie susceptible.

Finalmente, el módulo R-M7 presentó la mayor cantidad de genes (316), los cuales son inducidos durante la respuesta temprana en el estrés por heladas (T1R), y dicha inducción se mantiene durante los tiempos T2 y T3 de estrés por heladas (Figura 17, R-M7). Entre estos genes se encuentran los factores de transcripción con dominio AP2/ ERF, reguladores de silenciamiento de genes, proteínas rápidas Avr9/cf-9, DREB1, factor 2 de unión a CRT, proteína CBF con dominio AP2, factor 1 semejante a AP2 de respuesta a lesiones, entre otras (Tabla 8).

Tabla 8. Genes del módulo R-M7 de la especie tolerante a heladas. PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster.

PGS_id	UNIREF
PGSC0003DMG400002899	AP2/ERF domain-containing transcription factor
PGSC0003DMG400002993	Regulator of gene silencing
PGSC0003DMG400004037	ATP binding protein
PGSC0003DMG400006309	DC1 domain containing protein
PGSC0003DMG400008711	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 76
PGSC0003DMG400012525	DREB1
PGSC0003DMG400012962	Transcription factor HBP-1b(C1)
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2
PGSC0003DMG400014310	AP2 domain CBF protein
PGSC0003DMG400025797	Wound-responsive AP2 like factor 1
PGSC0003DMG402025869	C2 domain-containing protein

En el módulo S-M1, se observa a genes del metabolismo secundario, como aquellos relacionados con la formación de las flores, la formación de gametos, la maduración de los frutos, entre otros. Durante T0 y T1 estos genes se encuentran ligeramente reprimidos ($z\text{-score} < 0$), sin embargo, en T2 y T3 estos genes se ven drásticamente inducidos.

El módulo S-M2 estaba principalmente conformado por genes de respuesta a patógenos, a estrés biótico o abiótico, a sequía, entre otros. Durante T0, estos genes se encuentran ligeramente reprimidos ($z\text{-score}<0$), sin embargo, en T1, T2 y T3, se puede apreciar una drástica inducción de dichos genes.

En el módulo S-M3, se observa a genes relacionados con el control de las células guarda, proteínas de membrana, proteínas del proceso fotosintético, entre otras. Durante T0, T1 y T3, estos genes se encuentran ligeramente inducidos ($z\text{-score}>0$), sin embargo en T2 estos genes se ven drásticamente reprimidos ($z\text{-score}<0$).

En el módulo S-M4, se observa a genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos, proteínas de transporte a través de la membrana, entre otras. Durante T0, se puede observar una ligera represión ($z\text{-score}<0$), en T1 se aprecia que estos genes son inducidos ($z\text{-score}>0$), en T2, nuevamente estos genes son reprimidos ($z\text{-score}<0$), y en T3 vuelven a ser inducidos ($z\text{-score}>0$).

El módulo S-M5 estuvo principalmente conformado por genes de crecimiento de hojas, desarrollo de flores, de formación del endospermo en las semillas, entre otros. Durante T0, estos genes se encuentran ligeramente inducidos ($z\text{-score}>0$), en T1 se observa una drástica represión ($z\text{-score}<0$), en T2 y T3 se evidencia una ligera inducción de dichos genes ($z\text{-score}>0$).

En el módulo S-M6, se observa a genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y de transporte a través de la membrana. Durante T0, se puede observar una ligera inducción ($z\text{-score}>0$), en T1 y T2 se aprecia que estos genes son reprimidos ($z\text{-score}<0$), y en T3 vuelven a ser inducidos ($z\text{-score}>0$).

Finalmente, el módulo S-M7 está conformado por genes relacionados al control de la apertura de los estomas, a proteínas de respuesta en presencia de auxinas y proteínas de la fotosíntesis. Durante T0, estos genes de encuentran bastante inducidos ($z\text{-score}>0$), en T1, T2 y T3 se observa una drástica represión ($z\text{-score}<0$).

VIII. DISCUSIÓN

La técnica de medición de la fluorescencia emitida por la clorofila se empleó debido a que es un método no invasivo y aplicable a gran escala en muy poco tiempo y con mediciones precisas en campo como en laboratorio (Rapacz *et al.*, 2015). Los métodos clásicos empleados en las investigaciones de tolerancia/susceptibilidad a bajas temperaturas se basan en mediciones de la temperatura en la cual la planta sufre un daño irreversible (Novillo *et. al*, 2004). Otros métodos se enfocan en el daño que sufre la membrana plasmática lo cual conllevaba a una pérdida de electrolitos de los tejidos de las plantas (Steponkus *et al.*, 1990). Sin embargo, estos métodos eran invasivos, además de no ser tan precisos. Así, la técnica de medición de la fluorescencia emitida por la clorofila se ha convertido en una técnica muy poderosa y ampliamente usada en estudios de fisiología vegetal y ecofisiología (Maxwell & Johnson, 2000).

Esta técnica viene siendo ampliamente usada desde los años ochenta hasta la actualidad para estudiar el impacto de las temperaturas congelantes sobre especies de importancia agrícola. En *Arabidopsis thaliana* como en otras plantas, el parámetro de fluorescencia de la clorofila, que es ampliamente usado para medir la eficiencia del máximo cuántico del fotosistema II, está fuertemente relacionado con la tolerancia a bajas temperaturas (Artus *et al.*, 1996; Rizza *et al.*, 2001; Baker & Rosenqvist, 2004). En esta investigación (Figura 2 y Figura 3) se pudo observar que, ciertamente, existe una fuerte relación entre la tolerancia/susceptibilidad a bajas temperaturas y la fluorescencia emitida por la clorofila en las hojas de papas nativas.

La curva de fluorescencia de la especie tolerante no presentó variación durante el estrés por heladas (T1: respuesta temprana y T2: respuesta tardía), si bien cerca de 0°C (punto de congelamiento) se observó una leve elevación de la curva; sin embargo, después de unos minutos la curva se volvió a nivelar y se mantuvo constante, incluso durante el tiempo de recuperación (T3) (Figura 3). Esta curva indica que la planta se encuentra en un estado de alivio y la disipación de su energía almacenada en exceso se realiza en equilibrio entre calor, fluorescencia y fotoquímica. En cuanto a la especie susceptible, se observó una curva ascendente luego del punto de congelamiento (0°C) durante todo el estrés por heladas, incluyendo el tiempo de recuperación (Figura 2). Esta curva permite observar el daño (estado de estrés) que sufrió la planta durante el estrés por heladas.

Según Li (1985), una papa es tolerante a heladas si la planta puede sobrevivir a temperaturas igual o bajo -4°C; por lo tanto, se consideró a -4°C como la temperatura para la inducción tardía (T2) del estrés. Esta decisión se apoyó además en los hallazgos de Greaves y Wilson (1987), según los cuales a temperaturas menores a -4°C las especies susceptibles presentan un aumento significativo de la emisión de fluorescencia, mientras que las especies tolerantes no sufren mayores cambios. Otro motivo por el cual se escogió esta temperatura, fueron los resultados de los ensayos realizados en la estación de Santa Ana del INIA (Huancayo), en los cuales se sometió un grupo de plantas de especies tolerantes a temperaturas entre -4°C y -5°C durante un par de horas y se expuso a otro grupo de plantas tolerantes a temperaturas entre -

6°C y -8°C. El resultado después de una semana fue la sobrevivencia del primer grupo y la muerte del segundo (Anexo 8).

El tiempo de recuperación T3 (4°C) fue considerado debido a que en el INIA de Huancayo se ha determinado que una planta está fuera de estrés entre los 4°C y 5°C. Cada tiempo de estrés por heladas (T1, T2 o T3) fue comparado con su respectivo control (T0R o T0S) con la finalidad de detectar los cambios en la expresión génica.

Se secuenció 560 millones de lecturas que en promedio representaron más de 31 millones de lecturas por biblioteca (24 bibliotecas). El número de lecturas por biblioteca osciló entre 25 y 34 millones (Tabla 4). La uniformidad en la construcción de las bibliotecas generadas en un estudio resulta importante al momento de realizar comparaciones entre estas y se ve reflejada en la menor variación del número de lecturas (Head *et al.*, 2014). Además, durante el control de calidad (análisis con FastQC), se pudo observar que las calidades de cada base en cada lectura estuvieron entre los 22-30 (Illumina Hi-Seq™ 2000), lo cual indica que las lecturas poseen un alto grado de pureza y con lo cual se procedió a los posteriores análisis bioinformáticos.

De la Tabla 5, se puede observar que en promedio 79.64% de las secuencias cortas desde un extremo (*single-end*) pudieron mapearse en el genoma de referencia. Según Trapnell y colaboradores (2012) al menos el 70% de las lecturas del secuenciamiento de ARN deben alinearse al genoma de referencia; porcentajes más bajos de

alineamiento pueden indicar una pobre calidad de las lecturas o la presencia de algún contaminante. Además, la baja variación encontrada en el número de secuencias mapeadas por biblioteca indica un desempeño similar en la construcción y secuenciación de las bibliotecas de este estudio. Los alineamientos múltiples se encuentran entre 6.5% y 17.5%; según Pei y colaboradores (2012) la presencia de alineamientos múltiples es normal debido a la presencia de pseudogenes y duplicaciones genéticas válidas en el genoma.

Un factor importante a considerar durante el análisis de los datos del secuenciamiento del ARN es el porcentaje de cobertura del secuenciamiento (genes identificados), ya que según Mortazavi y colaboradores (2008), mayor será el número de genes identificados o cuantificados cuanto mayor sea el número de lecturas generadas. En esta investigación, la cobertura en la biblioteca T3R2, con menor número de lecturas (25,241,132 lecturas) presentó 33,602 transcritos, mientras que la biblioteca T1R2, con mayor número de lecturas (34,178,176 lecturas) presentó 29,161 transcritos, es decir que en la biblioteca con menor número de lecturas (T3R2) se cuantificó mayor cantidad de transcritos y en la biblioteca con mayor número de lecturas (T1R2) se cuantificó menor cantidad de transcritos. Posiblemente, esta discrepancia con lo señalado por Mortazavi y colaboradores (2008) se debió a que en la presente investigación, el genoma de referencia (*Solanum tuberosum* grupo Phureja DM1-3 516 R44) y el de la planta investigada (*Solanum goniocalyx*) pertenecen a especies distintas. Así, la biblioteca T1R2 (especie tolerante en inducción temprana al estrés por heladas), en la que se espera se revelen algunos genes responsables de la

tolerancia a las heladas, podría no haber tenido una correspondencia completa en el genoma de referencia por ser éste el de una especie susceptible (*Solanum tuberosum* L.). Por otro lado, es posible que la biblioteca T3R2 posea un bajo número de lecturas, además de un alto porcentaje de lecturas no mapeadas debido a la calidad inicial del ARN; la Figura 5 permite apreciar una ligera degradación. Si bien se mandó a secuenciar 100 ng de ARN de esta muestra, esta concentración debió haber disminuido considerablemente durante el proceso de purificación del ARN previo al secuenciamiento masivo. Para prevenir algún sesgo por factores externos a la respuesta de la planta, es que se consideró un mínimo de tres réplicas biológicas por cada tiempo. Así, los transcritos que soporta cada biblioteca después del control de calidad, fueron normalizados y juntados, con la finalidad de no perder significancia biológica de la data obtenida.

Un problema común durante el análisis de los alineamientos resultantes es que los fragmentos pueden mapearse ambiguamente a múltiples secuencias objetivo. Esta ambigüedad dificulta medir la abundancia de los transcritos, especialmente de aquellos con pocas regiones únicas. Mortazavi y colaboradores (2008) asignaron proporcionalmente los fragmentos ambiguos con sus orígenes potenciales basados en la abundancia de genes inicial, la que se calcula por conteo de fragmentos únicos. Uno de los primeros pasos es alinear las lecturas a un conjunto de secuencias objetivo. De esta forma se identifican las posiciones dentro de las secuencias objetivo a partir de las cuales se haya podido originar cada fragmento (Langmead *et al.*, 2009). Un programa para el análisis de las lecturas, siguiendo lo señalado por

Mortazavi y colaboradores (2008), es Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010), el cual agrupa los fragmentos y secuencias diana basados en su posición genómica. Así, Cuffdiff estima los niveles de expresión de genes y de transcritos, estima la varianza de los niveles de expresión, y estima las covarianzas entre isoformas del mismo gen en réplicas experimentales. Esto permite a Cuffdiff estimar con exactitud la expresión genética y desarrollar análisis diferenciales de genes sin presentar las limitaciones inherentes a los datos iniciales, como los splicing alternativos y regiones repetitivas que pueden introducir incertidumbre en las estimaciones de los niveles de expresión (Trapnell *et al.*, 2012). De esta forma, Cufflinks determina la asignación de máxima similitud de los fragmentos para cada locus genómico empleando el algoritmo EM (maximización de expectativas). Tiempo después, Roberts y colaboradores (2013) implementaron la EM a los fragmentos asignados utilizando un análisis que puede abarcar los billones de fragmentos secuenciados, y asigna exactamente la máxima similitud a los fragmentos ambiguos.

Tanto en la especie de papa nativa tolerante a las heladas como la susceptible, el mayor número de genes diferencialmente expresados fue observado durante el tiempo de recuperación (T3R y T3S) (629 genes y 3 164, respectivamente) (Figura 10). Este incremento parece ser una tendencia que no depende de la susceptibilidad o resistencia de la planta. Al parecer, durante el tiempo de recuperación (T3), aún se expresan genes de respuesta a bajas temperaturas, se activan rutas de silenciamiento de algunos genes y se activa la expresión de genes relacionados con las rutas del metabolismo normal de la planta. Cabe señalar que es posible que en la planta

susceptible, el mayor número de genes diferencialmente expresados se pueda explicar en parte por las reparaciones que ocurren debido al daño más severo sufrido durante el estrés por heladas. Como lo señaló Li (1985), todas las papas sometidas a estrés abiótico por temperaturas congelantes sufren daño severo en la forma de deshidratación, daños en la membrana plasmática y daño metabólico, y deben activar rutas metabólicas para reestablecer las condiciones normales y reparar el daño que han sufrido.

En la especie tolerante, los genes inducidos en la T1R fueron el factor de transcripción con dominio AP2/ERF (PGSC0003DMG400002899), el factor 2 de unión a CRT (PGSC0003DMG400014309), el factor de transcripción tipo WRKY (PGSC0003DMG400011633), la proteína ZPT2-13 (PGSC0003DMG400015534), el receptor de membrana 1 (PGSC0003DMG400009116), entre otros (Tabla 7). Miura y Furumoto (2013) señalan que los genes inducidos en las plantas tolerantes a heladas son, en su gran mayoría, factores de transcripción que activarán a los genes *COR*. La expresión de estos genes es inducida por frío y es dependiente de CBF/DREB (Gilmour *et al.*, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2007). La ruta de señalización para activar a los genes de resistencia a bajas temperaturas involucra la participación de ICE (factor de transcripción tipo MYC), el cual se une al elemento *cis* en la región promotora de CBF/DREB (factor de transcripción tipo AP2), el que a su vez regula la expresión de los genes *COR* (Chinnusamy *et al.*, 2007; Fursova *et al.*, 2009; Miura & Furumoto, 2013). Si bien a partir de nuestro análisis no se ha hecho visible un aumento de la expresión del gen que codifica ICE, sí se ha detectado un aumento

significativo en el caso de DREB1 y otros factores de transcripción que pertenecen al regulón CBF como AP2/ERF y la proteína dedo de zinc tipo C2H2 (Miura & Furumoto, 2013). A ellos se suman el factor 2 de unión a CRT (PGSC0003DMG400014309) y el factor asociado a CCR4 (PGSC0003DMG400005899) (Tabla 7).

En la especie susceptible, entre los genes inducidos en la T3S se encontraron a los que codifican al factor de transcripción HBP 1b (C1) que activa rutas inducidas por la presencia de auxina y ácido salicílico; a la proteína con dominio NAC cuya función está relacionada con procesos de crecimiento como el desarrollo de los meristemos apicales; a las proteínas cloroplásticas 3C de unión a la clorofila II a-b; a la proteína aciltransferasa con 5 anillos de antocianina involucrada en la síntesis de antocianinas; a la enzima sintasa de linalool la cual codifica partes de la floración; a la proteína lipooxigenasa asociada a varios aspectos fisiológicos de la planta como el crecimiento, desarrollo, y respuesta a estrés; a la proteína multicistatina, importante para la defensa de la planta ante cualquier estrés; a la proteinasa aspártica oryasina-1, involucrada en la utilización de las proteínas almacenadas en las vacuolas; a la proteína homeobox LET6, relacionada con eventos formativos en la morfogénesis de los óvulos y el embrión; entre otros (Anexo 4).

El mayor número de genes inducidos (479 genes) en la especie tolerante a heladas se registró durante el tiempo de recuperación (T3R) (Figura 11), lo cual podría estar

asociado con el rápido restablecimiento luego del estrés. Entre los genes inducidos se encontraron proteínas relacionadas con la activación y regulación de los genes *COR* (Miura & Furumoto, 2013; Fowler & Thomashow, 2002) como al factor de transcripción con el dominio AP2/ERF (PGSC0003DMG400002899), a DREB1 (PGSC0003DMG400012525), a la proteína dedo de zinc tipo C2H2 (PGSC0003DMG400002383), a la CBF con dominio AP2 (PGSC0003DMG400014310), entre otras. También se observó la presencia de las proteínas U-box (PGSC0003DMG400021325) las cuales se relacionan con la respuesta a factores abióticos (Yan *et al.*, 2003), y al desarrollo de la planta (Kim *et al.*, 2003); algunas proteínas de choque térmico (HSP), que incrementan la tolerancia a bajas temperaturas (Timperio *et al.*, 2008); proteínas tipo taumatinas, las cuales inhiben la recristalización del hielo intercelular en el espacio apoplástico, previenen la formación de hielo y promueven la deshidratación celular por congelamiento extracelular (Janska *et al.*, 2010); el receptor de membrana 1; la proteína ZPT2-13, la cual está asociada con la respuesta al estrés abiótico (Burra *et al.*, 2014). Asimismo, se observó la presencia de genes relacionados con procesos de metabolismo primario como las proteínas cloroplásticas de unión a la clorofila II a-b, la proteína lipooxigenasa, la proteína con dominio NAC, la citocromo oxidasa (Anexo 5).

La presencia de los genes relacionados con la respuesta al estrés por heladas se podría explicar debido a que T3R es considerada una temperatura baja (4°C) (Roche *et al.*, 2008; Fowler & Tomashow, 2002). Durante la exposición a bajas temperaturas, la

rigidez de la membrana plasmática aumenta (INABA *et al.*, 2003). Esto fue observado por el espectro de la polarización generalizada por excitación (GPex) a 4°C, cuyos resultados sugieren la predominancia de una organización parecida a un estado gel ordenado, como respuesta a condiciones de bajas temperaturas (Roche *et al.*, 2008; Lodish *et al.*, 2000). Este incremento en su rigidez es una consecuencia de las bajas temperaturas en el medio, lo cual generará la inducción de los genes *COR* (Knight *et al.*, 1991; Orvar *et al.*, 2000). Por lo tanto, la planta tolerante a las heladas percibe las bajas temperaturas y responde favorablemente sin evidenciarse daños en la planta (Figura 3). Para la especie tolerante estudiada *S. goniocalyx*, la mínima temperatura en la cual responde al estrés por bajas temperaturas sin evidenciar daños fisiológicos es -4°C como se observó durante los ensayos realizados en las instalaciones del INIA de Huancayo (Anexo 8).

El mayor número de genes reprimidos en la especie tolerante se observó durante la respuesta tardía al estrés (T2R) (Figura 11), como las proteínas de unión a la clorofila a/b (PGSC0003DMG400013413, PGSC0003DMG400008300) importantes para recuperar el movimiento estomático en presencia de ABA (Xu *et al.*, 2012); las proteínas SAUR (PGSC0003DMG400001668) que relacionan a la membrana plasmática con la hormona auxina (Spartz *et al.*, 2014); la sintasa (PGSC0003DMG400011752), que modifica la celulosa de la pared celular; al inhibidor de la pectinesterasa (PGSC0003DMG400028678) la cual inhibe la modificación de la pared celular (Giovane *et al.*, 2004); la citocromo P-450 (PGSC0003DMG400011750) que codifica una hidroxilasa involucrada en reacciones

catabólicas en *Arabidopsis* y regula los niveles de ABA en la planta (Kushiro *et al.*, 2004); entre otros (Anexo 6). Se esperaba que estos genes se encuentren reprimidos ya que se encuentran relacionados con procesos metabólicos que no aportan en la tolerancia a heladas.

La comparación de los genes diferencialmente expresados entre las especies nos permitió identificar aquellos genes que únicamente cambian su expresión en la especie tolerante y que podrían estar involucrados en la capacidad de tolerancia a las bajas temperaturas. Se pudo apreciar que existen notables diferencias en la expresión de genes durante los tres tiempos de inducción al estrés por heladas (T1, T2 y T3) entre las dos especies estudiadas (Figura 12). Por ejemplo, en la especie tolerante se observó principalmente la inducción de los factores de transcripción y proteínas reguladoras de los genes *COR*, mientras que los genes asociados al metabolismo secundario fueron reprimidos; por otro lado, en la especie susceptible se notó la inducción de genes relacionados con procesos metabólicos primarios y secundarios como glicosidasas, triacilglicerol lipasas, manoxidasas, carboxipetidasas, entre otras, mientras que genes que codifican proteínas de membrana y pared celular, y de diferentes rutas metabólicas como la β -expansina, Ca^{2+} antiportador/intercambiador de cationes, plastocianina, proteínas de unión a la clorofila II, proteína cloroplástica de intercambio de oxígeno, entre otras fueron reprimidos durante la inducción del estrés por heladas.

La especie susceptible presentó más expresión/represión de genes (Figura 13 y Figura 14). Esta diferencia pudo deberse a que se trabajó con la especie *Solanum tuberosum* grupo Phureja como genoma de referencia y esta especie es susceptible a bajas temperaturas; lo más recomendable sería trabajar con alguna especie tolerante a heladas como *Solanum commersonii* (el borrador de su genoma acaba de ser publicado) (Aversano *et al.*, 2015). Mientras que en la especie susceptible se observó un alineamiento al genoma de referencia del 80.63%, en la especie tolerante se observó un porcentaje de alineamiento del 78.65%.

Entre los genes que podrían otorgar la tolerancia a las heladas a *S. goniocalyx*, se encontraron a genes que codifican componentes localizados en la membrana plasmática como la fosfolipasa C y las proteínas de respuesta osmótica. Cuando se expone una planta a heladas, la señal de las bajas temperaturas debe ser percibida y transmitida al núcleo. Así, los componentes localizados en la membrana deben detectar y amplificar la señal. La fosfolipasa C es una enzima involucrada en la señalización mediada por lípidos (Ruelland *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* bajo estrés por heladas, se ha reportado que la ruta de la fosfolipasa C se activa y sirve como señal que desencadena la respuesta a bajas temperaturas (Vergnolle *et al.*, 2005). En *Oryza sativa*, un estudio del perfil transcriptómico a través de los microarreglos, mostró que la fosfolipasa C fue inducida en respuesta a bajas temperaturas (Ruelland *et al.*, 2002). Por otro lado, las proteínas de respuesta osmótica están relacionadas con el proceso de traducción en respuesta a bajas temperaturas; esto es importante para la amplificación de la señal de estrés por bajas temperaturas (Arisz *et al.*, 2013). Guo y

colaboradores (2002), mostraron que individuos mutantes para las proteínas de respuesta osmótica eran susceptibles a las heladas. Por lo tanto, la regulación positiva de componentes de la membrana celular, ocurre en etapas tempranas durante el estrés porque sirven como transductores de la señal (Winfield *et al.*, 2010).

La β -glucosidasa es una enzima asociada a la membrana y permite la conversión de la celobiosa a glucosa durante la hidrólisis de la celulosa (Knight & Knight, 2012). A pesar de ser una enzima poco estudiada en estrés abiótico, Thorlby y colaboradores (2004) señalaron que líneas transgénicas de *Arabidopsis*, sensibles a bajas temperaturas, presentaron tolerancia a heladas cuando la enzima β -glucosidasa fue inducida.

A su vez, se encontraron a factores de transcripción de la familia MYB y WRKY. Ambos genes están involucrados en diferentes tipos de estrés abiótico. MYB es una familia grande de factores de transcripción en plantas. Existen más de 198 genes MYB en *Arabidopsis* y más de 183 en *Oryza sativa* (Yanhui *et al.*, 2006). Dependiendo del número de repeticiones imperfectas de SANT (cuyas siglas derivan de SWI3, ADA2, N-CoR, y TFIIB) (50-53 aminoácidos) en los dominios de unión al ADN, las proteínas MYB se pueden clasificar en tres subfamilias: el grupo relacionado con MYB (un solo dominio SANT), el grupo tipo R2R3 (dos dominios SANT) y el grupo R1R2R3 MYB (tres dominios SANT) (Du *et al.*, 2009; Yanhui *et al.*, 2006). Se ha reportado que la mayoría de los genes MYB involucrados en las respuestas a diversos tipos de estrés abiótico pertenecen al grupo tipo R2R3. Entre

ellos se puede señalar a *OsMYB2* (LOC_Os03g20090), que posee rol regulatorio durante el estrés por bajas temperaturas en *Oryza sativa* (Yang *et al.*, 2012). Además, también se ha reportado la presencia de *MYBS3* (grupo relacionado con MYB de un solo dominio SANT) en arroz, la cual está involucrada en la respuesta al estrés abiótico y resulta importante en la respuesta a heladas (Su *et al.*, 2010).

En esta investigación, se observó la expresión de la proteína MYB21 (PGSC0003DMG400008337) (ST4.03ch03:37072194-37074087) perteneciente a la familia MYB (Tabla 7). MYB21 es homóloga a la MYB63, la cual es importante durante la biogénesis de la pared celular secundaria (Kwenda *et al.*, 2016). Según Tenhaken (2014), los cambios composicionales de la pared celular en la membrana han sido asociados con genotipos de *Mischantus* que toleren temperaturas congelantes. En las plantas que hayan sido aclimatadas al frío se observa un notorio incremento en la cantidad de glucanos asociados a la pared. Domon y colaboradores (2013), observaron un incremento en la cinamil alcohol deshidrogenasa luego del proceso de aclimatación, lo cual sugiere que un incremento en la lignificación estaría asociado con la respuesta al tratamiento de bajas temperaturas.

Las proteínas WRKY también poseen roles importantes durante estrés abiótico y biótico. Estas proteínas están bien clasificadas en *Arabidopsis*, y se dividen en tres grupos dependiendo del número de dominios WRKY que posean (Eulgem *et al.*, 2000). Las proteínas WRKY del grupo I poseen dos dominios distintos WRKY, mientras que las proteínas de los grupos II, III y IV WRKY poseen únicamente un

dominio WRKY (Chen *et al.*, 2012). En *Oryza sativa*, los genes *OsWRKY71* (LOC_Os02g08440) y *OsWRKY74* (LOC_Os09g16510) están involucrados en la respuesta al estrés por bajas temperaturas, donde el nivel de expresión se observó incrementado en las plantas que toleraban bajas temperaturas (Kim *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2016). En *Arabidopsis thaliana*, se identificaron a los genes *AtWRKY25* (At2g30250), *AtWRKY33* (At2g38470), *AtWRKY34* (At3g04670) y *GmWRKY21* (DQ322691), los cuales se han evidenciado estar relacionados con la respuesta a bajas temperaturas (Jiang *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2008). En el trigo, la mayoría de los genes WRKY (8 de 15) fueron transcritos en respuesta al frío, calor, NaCl y a tratamientos con polietilenglicol (Wu *et al.*, 2008). En arroz, 12 genes WRKY fueron inducidos en respuesta a bajas temperaturas, sequía y salinidad (Ramamoorthy *et al.*, 2008).

En esta investigación se observó la presencia de factores de transcripción WRKY durante la inducción temprana al estrés (T1R) en las plantas tolerantes, entre ellos al factor de transcripción tipo-WRKY (PGSC0003DMG400011633) (Tabla 7) ortólogo a *AtWRKY33*, donde la proteína WRKY33 posee un rol importante en la activación de genes de defensa (Kwenda *et al.*, 2016). También, se notó la presencia del doble transfactor tipo WRKY (PGSC0003DMG400016769) (ST4.03ch06:45149199-45151981), homólogo a WRKY33 importante durante la regulación de la respuesta de defensa (Kwenda *et al.*, 2016). Por otro lado, hubieron varios factores de transcripción WRKY (WRKY TF) como el factor de transcripción WRKY (PGSC0003DMG400019408- ST4.03ch10:6282128-6284276;

PGSC0003DMG400012318- ST4.03ch08:55273300-55275486;
 PGSC0003DMG400031140- ST4.03ch04:61579492-61582536;
 PGSC0003DMG400000211- ST4.03ch01:73219901-73222113;
 PGSC0003DMG400015015- ST4.03ch07:46043496-46046483;
 PGSC0003DMG400008188- ST4.03ch08:34572457-34573154), el WRKY TF30
 (PGSC0003DMG400005835- ST4.03ch08:5067453-5069479), el WRKY TF1
 (PGSC0003DMG400028520- ST4.03ch06:50108071-50110187), el WRKY TF3
 (PGSC0003DMG400009530- ST4.03ch08:2364263-2365922), el WRKY TF1a
 (PGSC0003DMG400022063- ST4.03ch02:17248581-17250757) y el WRKY TF16
 (PGSC0003DMG401031196- ST4.03ch04:54616204-54620206) (Tabla7). Estos
 WRKY TF han sido reportados en *Solanum tuberosum* y cuyas funciones se cree que
 están relacionadas con la unión a alguna secuencia de ADN específica y con la
 regulación de otros factores de transcripción, según EMBL-EBI (en:
<http://www.ebi.ac.uk/>). Nuestros datos muestran que WRKY está fuertemente
 inducido durante el estrés por heladas, lo cual podría significar la importancia de
 estos genes durante la respuesta a estrés por bajas temperatura en la especie *Solanum
 goniocalyx*.

También se detectó la regulación positiva de la calmodulina, lo cual indicaría que la
 señalización mediada por calcio está asociada con la tolerancia a heladas. Según Zeng
 y colaboradores (2015), las proteínas calmodulina y las parecidas a la calmodulina
 actúan como sensores intracelulares en estrés por frío, sequía y salinidad. La fuerte

inducción de estos genes indica que la señalización por calcio tiene un rol importante durante la transducción de la señal de heladas.

Además, se encontraron al factor de unión CRT 2 y 3, a la proteína CBF con dominio AP2, proteína con dominio DC1, a la proteína LAE, la proteína dedos de zinc tipo C2H2, al factor asociado a CCR4. Estas proteínas fueron observadas en *Oryza sativa* y *Nicotiana tobacco* tolerantes a heladas (Fowler & Thomashow, 2002; Miura & Furumoto, 2013).

En el análisis de genes diferencialmente expresados (o *DEGs*, por sus siglas en inglés), no solo se observaron genes candidatos reportados en otras especies de plantas, sino que, además, se observó la presencia de genes con funciones desconocidas (*genes with unknown functions*), fuertemente inducidos durante el estrés por heladas (T1R y T2R). Estos genes son: PGSC0003DMG402030595 (ST4.03ch02:41686395-41687344), PGSC0003DMG400006905 (ST4.03ch02:26174609-26176393), PGSC0003DMG400012655 (ST4.03ch02:41058548-41060099), PGSC0003DMG400028485 (ST4.03ch02:31571144-31571758), PGSC0003DMG400027566 (ST4.03ch04:62368866-62369383), PGSC0003DMG400006904 (ST4.03ch02:26171903-26172840) (Anexo 9). Cuando se buscaron estos genes en Uniprot, se observó que PGSC0003DMG400012655 estaba asociado con funciones de membrana. Por otro lado, las proteínas PGSC0003DMG402030595, PGSC0003DMG400006905, PGSC0003DMG400012655 y

PGSC0003DMG400028485 están agrupadas en el módulo R-M7 con proteínas asociadas a membrana (ver más abajo). Estas proteínas serían potenciales candidatos para estudios futuros con miras a generar variedades de papas de importancia económica tolerantes a heladas.

El análisis de redes de co-expresión génica (WGCNA) correlaciona los niveles de expresión de genes para construir las redes y definir módulos de genes altamente interconectados (Langfelder & Horvath, 2008). Los genes que se encuentren agrupados (correlacionados) dentro de los módulos podrían participar en procesos biológicos parecidos o en una misma ruta metabólica a pesar de que dichos genes no necesariamente estén funcionalmente relacionados. En este trabajo se encontraron 7 módulos tanto en la especie tolerante como en la especie susceptible (Figura 15, Figura 16, Figura 17 y Figura 18).

La especie tolerante a heladas presentó 1,998 genes expresados ($cv=0.5$), mientras que la especie susceptible presentó 2,721 genes ($cv=0.6$). La diferencia entre los valores de cv empleados se consideró por la calidad en la resolución del agrupamiento durante el análisis de co-expresión (Figura 15 y Figura 16). Asimismo, la especie tolerante presentó la mayor cantidad de genes (316 genes) en el módulo R-M7 (Figura 17). En el gráfico R-M7 se puede apreciar que, de acuerdo al comportamiento de los genes, estos poseen en el T0 un z -score cercano a 0, para ser inducidos ligeramente en el tiempo T1 (z -score >0). Esta ligera inducción se mantiene durante T2 y T3 (z -score >0), lo que posiblemente se deba a que la

temperatura de los tiempos T2 y T3 eran bajas y, por lo tanto, la planta seguía respondiendo al estrés por heladas.

Este módulo está conformado por los genes que se inducen significativamente durante la respuesta temprana al estrés por heladas (T1R), como el factor de transcripción con dominio AP2/ERF, a DREB1, al factor 2 de unión a CRT, a la proteína CBF y al factor 1 semejante a AP2 (Tabla 8). Al parecer estas proteínas están fuertemente relacionadas con la capacidad de resistir bajas temperaturas. También se encontraron 10 genes que codifican proteínas Avr9/cf-9 y 1 gen que codifica proteínas de choque térmico (PGSC0003DMG400021737) cuya función es proteger la membrana celular, plegar las proteínas denaturadas y prevenir la agregación de proteínas (Timperio *et al.*, 2008). Estas proteínas podrían tener un rol importante para una mejor recuperación de las plantas luego de las heladas (Miura & Furumoto, 2013). Además, dentro de este grupo se encontró a las proteínas de función desconocida PGSC0003DMG402030595, PGSC0003DMG400006905, PGSC0003DMG400012655 y PGSC0003DMG400028485 (Anexo 9).

En la especie susceptible resultó complicado explicar biológicamente los módulos obtenidos durante el análisis de co-expresión (Figura 18). La dificultad radicó en que la planta susceptible, al haber estado sometida a las condiciones de estrés por más de una hora, sufrió daño irreparable que conllevó a la muerte de esta planta tiempo después de finalizado el experimento. Al analizar el contenido genético de cada módulo no se observó congruencia biológica ya que muchos genes del metabolismo

primario se vieron por reprimidos ($z < 0$) durante el T1 (0°C) y para los tiempos T2 y T3 (-4°C y 4°C, respectivamente) se observaron o bien drásticamente reprimidos ($z < 0$) o drásticamente inducidos ($z > 0$) (Figura 18), a pesar que no contribuyen en el proceso de respuesta al estrés por heladas. El módulo S-M2 hace evidencia del daño que estaba sufriendo la planta susceptible, ya que los genes de respuesta a patógenos, a estrés biótico o abiótico, a sequía, entre otros, se encontraban ligeramente reprimidos ($z\text{-score} < 0$) durante T0, pero en T1, T2 y T3, se puede apreciar una drástica inducción de dichos genes.

La identificación de la co-expresión de los genes analizados permite tener un entendimiento general del transcriptoma de hojas como base para futuras investigaciones en la expresión génica de papa y de especies cercanas. Esto es posible porque permite visualizar el comportamiento de los grupos de genes fuertemente correlacionados durante todo el ensayo de inducción a estrés por heladas. En el caso particular de los genes con funciones desconocidas, este análisis permitió agruparlos en el módulo de los genes de respuesta a bajas temperatura a pesar de ser proteínas de transporte y constitución de la membrana plasmática. Esta información es de mucho valor para estudios posteriores en fitomejoramiento de especies de papa con valor alimenticio o económico que se encuentren perjudicadas por las recurrentes bajas temperaturas.

IX. CONCLUSIONES

- El análisis de fluorescencia en hojas permitió verificar que existe una fuerte relación entre la tolerancia/susceptibilidad a bajas temperaturas y la fluorescencia emitida por la clorofila en las hojas de papas nativas. Las hojas de la especie tolerante no presentaron variación en la curva de fluorescencia durante el estrés, sin embargo, la especie susceptible presentó una curva ascendente luego del punto de congelamiento (0°C).
- En la especie tolerante se observó la expresión diferencial de genes que codifican factores de transcripción asociados con la activación de los genes *COR* y proteínas asociadas con la regulación de la expresión de los genes *COR*. Esto es importante para poder sobrevivir durante las condiciones del estrés abiótico y poder regular la ruta de señalización de esta respuesta.
- Los genes candidatos a tolerancia a heladas abarcan desde la percepción de la señal de estrés (fosfolipasa C, proteína de respuesta osmótica, β -glucosidasa), a factores de transcripción (de la familia MYB y WRKY, de unión CRT 2 y 3) los cuales regulan la expresión de los genes *COR* (AFPs, LEA, desaturasas, entre otras).
- Con el análisis de expresión diferencial se logró identificar algunos genes no reportados anteriormente y que representan potenciales candidatos para programas de fitomejoramiento en plantas en respuesta a heladas.

- Con el análisis de co-expresión se encontraron 7 módulos en la especie tolerante y susceptible a heladas, con un promedio de 175 genes por cada módulo. El módulo con mayor número de genes (RM7: 316 genes) está fuertemente relacionado con la inducción temprana al estrés por heladas (T1R). Esta investigación representa información valiosa para entender las bases moleculares de resistencia a las heladas y con miras a mejorar los cultivos genéticamente.

X. RECOMENDACIONES

- Realizar la verificación de los cambios de expresión de los genes identificados en este estudio, con especial atención a aquellos con función desconocida (relacionados con la membrana celular), utilizando PCR en tiempo real.
- Realizar un análisis RNA-Seq *de novo* a estas especies de papa nativas, para explorar la existencia de todos los genes aún no reportados que estén confiriendo la tolerancia a heladas en estos tubérculos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aksoy, E., Demirel, U., Öztürk, Z., Caliskan, S. & Caliskan, E. (2015). Recent advances in potato genomics, transcriptomics, and transgenics under drought and heat stresses: a review. *Turkish Journal of Botany*, 39, 920-940.
2. Amador, V., Bou, J., Martínez-García, J., Monte, E., Rodríguez-Falcon, M., Russo, E. & Prat, S. (2001). Regulation of potato tuberization by daylength and giberellins. *International Journal of Developmental Biology*, 45, 37-38.
3. Arisz, S., van Wijk, R., Roels, W., Zhu, J., Haring, M., Munnik, T. (2013) Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Front Plant Sci.* 4, 1.
4. Artus, N., Uemura, M., Steponkus, P., Gilmour, S., Lin, C. & Thomashow, M. (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93; 13404-13409.
5. Aversano, R., Contaldi, F., Ercolano, M., Grosso, V., Iorizzo, M., Tatino, F., Xumerle, L., Dal Molin, A., Avanzato, C., Ferrarini, A., Delledonne, M., Sanseverino, W., Cigliano, R., Capella-Gutierrez, S., Gabaldón, T., Frusciante, L., Bradeen, J. & Carputo, D. (2015). The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. *The Plant Cell*, 27 (4), 954-968.
6. Baker, N. & Roseqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*, 55, 1607-1621.

7. Bohnert, H. J., Nelson, D. E. & Jensen, R. G. (1995). Adaptation to Environmental Stresses. *Plant Cell*, 7, 1099-1111.
8. Burra, D., Berkowitz, O., Hedley, P., Morris, J., Resjö, S., Levander, F., Liljeroth, E., Andreasson, E., & Alexandersson, E. (2014). Phosphite-induced changes of the transcriptoma and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. *BMC Plant Biol.*, 14, 254-271.
9. Burton, W. G. (1966). *The Potato: A Survey of its History and of Factors Influencing Its Yield, Nutritive Value, Quality and Storage*. Wageningen: H. Veenman & Zonen.
10. Castañón, G. (2001). La biotecnología y el mejoramiento genético vegetal. *Revista de divulgación*, 7 (14), 1-15.
11. Chen, H. & Li, P. (1980). Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology*, 65, 1146–1148.
12. Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., & Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 120-128.
13. Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.*, 12, 444–451.
14. Cramer, G., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11, 163-176.

15. Dai, X., Wang, Y., & Zhang, W. (2016). OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *J. Exp. Bot.*, 67 (3), 947-960.
16. Devaux, A., Ordinola, M., Hibon, A., & Flores, R. (2010). El sector papa en la región andina. Diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). Perú: CIP (Centro Internacional de la Papa).
17. Domon J., Baldwin L., Acket S., Caudeville E., Arnoult S., Zub H., Gillet, F., Lejeune-Hénaut, I., Brancourt-Hulmel, M., Pelloux, J., & Rayon, C. (2013). Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 85, 51–61.
18. Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X., Yang, W., Wu, Y., Huang, Y., & Tang, Y. (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Moscow)*, 74, 1–11.
19. Dure, L. (1993). A repeating II-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant Journal*, 3, 363-369.
20. Estrada, R. N. (2000). *La Biodiversidad en el Mejoramiento Genético de la papa*. En: B. Hardy & E. Martinez (Eds.) (p. 372). La Paz, Bolivia.
21. Eulgem, T., Rushton, P., Robatzek, S., & Somssich, I. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199–206.

22. Evers, D., Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J., Hoffmann, L., & Renaut, J. (2012). Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Mol .Biol.*, 78, 503-514.
23. FAOSTAT (2008). Potato world: Production and consumption. International Year of the Potato. Obtenida el 25 de noviembre del 2014, de <http://www.potato2008.org/en/world/>
24. Fowler, S. & Thomashow, M. (2002). Arabidopsis transcriptoma profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
25. Frère, M., Rijks, J., & Rea, J. (1975) *Estudio agroclimatológico de la zona andina*. (Informe técnico).Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
26. Fursova, O. V., Pogorelko, G.V.,&Tarasov, V.A. (2009). Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 429, 98–103.
27. Gilleta, F.I. (2000). Reflexiones sobre transgénicos vegetales. Seminario Internacional, 12 al 15 de setiembre. Buenos Aires, Argentina.
28. Gilmour, S., Sebolt, A., Salazar, M., Everard, J. & Thomashow, M. (2004). Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.*, 54, 767-781.

29. Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. & Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 245-252.
30. Greaves, J. A. & Wilson, J. M. (1987). Assessment of the frost sensitivity of wild and cultivated potato species by chlorophyll fluorescence analysis. *Potato Research*, 30, 381-395.
31. Griffith, M. & Yaish, M. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9(8), 399-405.
32. Grillo, S., Consiglio, F., Costa, A. & Leone, A. (1998). Expression of genes for acyl-desaturases in response to temperatura changes in potato cells. XV *EUCARPIA Genetics and breeding for crop quality and resistance*, Viterbo, Setiembre 20-25, p. 100.
33. Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M., Zhu, J. (2002) An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 7786–7791.
34. Hannah, M. A., Heyer, A. G., & Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.*, 1, e26.
35. Hawkes, J.G. (1990). *The Potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. United Kingdom (UK).
36. Harwood, J. (1994). Environmental factors which can alter lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 33, 193-202.

37. Head, S., Komori, H. & LaMere, S. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTech.*, 56, 61-77.
38. Hijmans, R. (2003). The Effect of Climate Change on Global Potato Production. *American Journal of Potato Research*, 80 (4), 271-280.
39. Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 377-403.
40. Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K., Murata, N., Ohtani, T. & Toguri, T. (1996). Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotechnology*, 14, 1003-1011.
41. ITDG. (2000). *Conservación in-situ de la biodiversidad agrícola* (Informe de investigación). Sicuani: ITDG.
42. Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S. & Ovesna, J. (2010). Cold stress and acclimation- What is important for metabolic adjustment? *Plant Biol.*, 12, 395-405.
43. Jiang, Y. & Deyholos, M. (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol.*, 69, 91-105.
44. Kim, M., Cho, H., Kim, D., Lee, J. & Pai, H. (2003). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta*, 1651, 50-59.

45. Kim, C., Xuan Vo, K., Nguyen, C., Jeong, D., Lee, S., Kumar, M., Kim, S., Park, S., Kim, J., & Jeon, J. (2016). Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, *OsWRKY71*. *Plant Biotechnology Reports*, 10 (1), 13-23.
46. Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., & Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524–526.
47. Knight, M. & Knight, H. (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytol.* 195, 737–751.
48. Krause, G. H. & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 42, 313-349.
49. Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. & Nambara, E. (2014). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.*, 23(7), 1647-1656.
50. Kwenda, S., Motlolometsi, T., Birch, P., & Moleleki, L. (2016). RNA-seq Profiling Reveals Defense Responses in a Tolerant Potato Cultivar to Stem Infection by *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1905.
51. Langfelder, P. & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 559.

52. Langmead, B., Trapnell, C, Pop, M. & Saizberg S. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, 10 (3): R25.
53. Langmead, B., Hansen, K., & Leek, J. (2010). Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna. *Genome Biol.*, 14(8), R83.
54. Leone, A., Costa, A., Consiglio, F., Massarelli, I., Dragonetti, E., De Palma, M. & Grillo, S. (1999). Tolerance to abiotic stress in potato plants: a molecular approach. *Potato Research*, 42, 333-351.
55. Leyman, B., Geelen, D., Quintero, F. & Blatt, M. (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science*, 28, 537-540.
56. Li, P. H. & Fennell, A. (1985). *Potato frost hardiness*. En: Li, P. H. (Eds), *Potato physiology* (pp. 457-479) Orlando, Florida: Academic Press Inc.
57. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 5.3, Biomembranes: Structural Organization and Basic Functions. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21583/>
58. Losciale, P., Hendrickson, L., Corelli, L. & Chow, W. (2011). Quenching partitioning through light-modulated chlorophyll fluorescence: a quantitative analysis to assess the fate of the absorbed light in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 73-79.
59. Maxwell, K. & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345), 659-668.

60. Miura, K. & Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 5312-5337.
61. Mizoguchi, T., Ichimura, K. & Shinozaki K. (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Biotechnology*, 15, 15-19.
62. Mortazavi, A., Williams, B., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5 (7), 621-628.
63. Murata, N. & Los, D. (1997) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.* 115, 875-879.
64. Novillo, F., Alonso, J., Ecker, J. & Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3985-3990.
65. Ochoa, C.M. (2001). Las Papas de Sudamérica: Bolivia. Centro Internacional de la Papa (CIP), Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA), Lima, Perú.
66. Orvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. & Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.*, 23, 785–794.
67. Ouellet, F. & Charron, J. (2013). Cold acclimation and freezing tolerance in plants. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

68. Palta, J., Whitaker, B. & Weiss, L. (1993). Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiol.*, 103, 793-803.
69. Pei, S., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L., Mu, X., Harte, R., Balasubramanian, S., Tanzer, A., Diekhans, M., Reymond, A., Hubbard, T., Harrow, J. & Gerstein, M. (2012). The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biol.*, 13 (9), R51.
70. Perú, Ministerio de Agricultura. (2007). *Situación de la Cadena Agroproductiva de Papa en Perú*.
71. Ramamoorthy, R., Jiang, S., Kumar, N., Venkatesh, P., & Ramachandran, S. (2008). A comprehensive transcriptional profiling of WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant and Cell Physiology*, 49, 865-879.
72. Rapacz, M., Sasal, M. & Wójcik-Jagla, M. (2015). Direct and indirect measurements of freezing tolerance: advantages and limitations. *Acta Physiol. Plant*, 37, 157.
73. Rensink, W., Iobst, S., Hart, A., Stegalkina, S., Liu, J., & Buell, C. (2005) Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Functional & Integrative Genomics*, 5, 201-207.
74. Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A. & Cattivelli, L. (2001). Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding*, 120, 389-396.

75. Roberts, A., Feng, H., & Pachter, L. (2013). Fragment assignment in the cloud with eXpress-D. *BC Bioinformatics*, 14, 358-366.
76. Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P, Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L, Gresti, J., Mongrand, S, Perrier-Cornet, J. & Simon-Plas, F. (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *The FASEB Journal*, 22, 3980-3991.
77. Rosenzweig, C., & Liverman, D. (1992). *Predicted Effects of Climate Change on Agriculture: A Comparison of Temperate and Tropical Regions*. En: Majumdar, S. (Eds), *Global Climate Change: Implications, Challenges and Mitigation Measures* (pp. 342-361) Philadelphia: Pennsylvania Academy of Sciences.
78. Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J., Zachowski, A. (2002) Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol.* 130, 999–1007.
79. Saibo, N., Lourenco, T. & Oliveira, M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103, 609-623.
80. Sangwan, V., Orvar, B. L., Beyerly, J., Hirt, H., & Dhindsa, R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.*, 31, 629–638.
81. Seppänen, M. & Coleman, G. (2003). Characterization of genotypic variation in stress gene expression and photosynthetic parameters in potato. *Plant, Cell & Environment*, 26 (3), 401-410.

82. Spartz, A., Ren, H., Park, M., Grandt, K., Lee, S., Murphy, A., Sussman, M., Overvoorde, P. & Gray, W. (2014). SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, 2129-2142.
83. Steponkus, P. (1990). Cold acclimation and freezing injury from a perspective of the plasma membrane. En: Katterman, F. (Eds.). Environmental injury to plants (pp. 1-16) London, Academic Press.
84. Su, C., Wang, Y., Hsieh, T., Lu, C., Tseng, T., & Yu, S. (2010). A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.*, 153, 145–158.
85. Sundbom, E., Strand, M. & Hällgren, J. (1982). Temperature-induced fluorescence changes: a screening method for frost tolerance of potato (*Solanum sp.*). *Plant Physiol.*, 70, 1299-1302.
86. Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B., Siddiqui, A., Lao, K. & Surani, M. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptomic analysis of a single cell. *Nature Methods*, 6, 377-382.
87. Tenhaken, R. (2014). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 771.
88. Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol*, 118, 1–7.
89. Thorlby, G., Fourrier, N., Warren, G. (2004) The *SENSITIVE TO FREEZING2* gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell*. 16, 2192–2203.

90. Timperio, A., Egidi, M. & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics*, 71, 391-411.
91. Torres, C., & Cubas, H. (2007). *Diagnóstico de cultivos y especies agroforestales nativas, en adaptación al cambio climático en el área del centro poblado de Huashao (Distrito de Yungay) y del caserío de Anta (Distrito de Shupluy)*. (Informe de consultoría para Soluciones Prácticas). Lima: IDTG.
92. Torres, Y. (2014). Transcriptoma de la respuesta a la sequía en *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
93. Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105–1111.
94. Trapnell, C., Williams, B., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M., Salzberg, S., Wold, B., & Pachter, L. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnol.*, 14(5), 511–515.
95. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D., Pimentel, H., Saizberg, S., Rinn, J. & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.*, 7 (3), 562-578.
96. Van Verk, M., Hickman, R., Pieterse, C., & Van Wees, S. (2013). RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends in Plant Sci.*, 18 (4), 175-179.
97. Vergnolle, C., Vaultier, M., Taconnat, L., Renou, J., Kader, J., Zachowski, A., Ruelland, E. (2005) The cold-induced early activation of phospholipase C and

- D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* 139 (3), 1217–1233,
98. Wang, X., Zhao, Q., Ma, C., Zhang, Z., Cao, H., Kong, Y., Yue, C., Hao, X., Chen, L., Ma, J., Li, X. & Yang, Y. (2013). Global transcriptoma profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BMC Genomics*, 14, 415.
99. Winch, T. (2006). Growing food: a guide to food production. *Springer Science & Business Media*. ISBN 13-978-1-4020-4975-0.
100. Winfield, M., Lu, C., Wilson, I., Coghill, J., Edwards, K. (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnol J.* 8, 749–771.
101. Wu, H., Ni, Z., Yao, Y., Guo, G., & Sun, Q. (2008). Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Prog Nat Sci.*, 18(6), 697–705.
102. Xu, Z., Lee, K., Dong, T., Jeong, J., Jin, J., Kanno, Y., Kim, D., Kim, S. & Seo, M., Bressan, R., Yun, D. & Inhwan, H. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24, 2184-2199.
103. Yan, J., Wang, J., Li, Q., Hwang, J., Patterson, C. & Zhang, H. (2003). AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 132, 861-869.

104. Yang, A., Dai, X., & Zhang, W. (2012). A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot.*, 63, 2541–2556.
105. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., XingWang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., & Li-Jia, Q. (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol. Biol.*, 60, 107–124.
106. Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L. & Poovaiah, B. (2015) Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front Plant Sci.*, 6, 600.
107. Zhang, N., Liu, B., Ma, C., Zhang, G., Chang, J., Si, H. & Wang, D. (2014). Transcriptome characterization and sequencing-based identification of drought-responsive genes in potato. *Mol. Biol. Rep.*, 41 (1), 505-517.
108. Zhou, Q., Tian, A., Zou, H., Xie, Z., Lei, G., Huang, J., Wang, C., Wang, H., Zhang, J., & Chen, S. (2008). Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J.*, 6(5), 486–503.

109. Zou, C., Jiang, W., & Yu, D. (2010). Male gametophyte-specific *WRKY34* transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.*, 61, 3901–3914.

XII. ANEXOS

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS HOJAS DE PAPA.

Lisis de las muestras (hojas)

- Triturar las hojas (1-2 g aproximadamente) con nitrógeno líquido, con ayuda del mortero, hasta que queden polvo.
- Colectar la muestra en tubos eppendorf de 2 mL y adicionar 1 mL del reactivo TriZol (100 mM Tris pH 8.5).
- Centrifugar a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Separación

- Agregar 0.2 mL de cloroformo, mezclar durante 15 minutos y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.

Precipitación del ARN

- Adicionar 500 uL de isopropanol, mezclar y dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 12,000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Lavar el precipitado adicionando 1mL de etanol 75%.

- Centrifugar a 12,000 g durante 5 minutos a 4°C.
- Secar el precipitado a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Solubilización del ARN

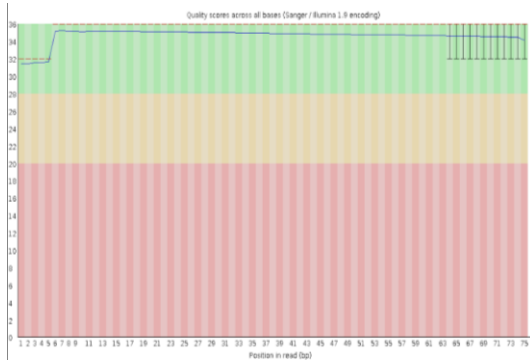
- Adicionar 40 uL de agua DEPC.

Procedimiento para eliminar ADN contaminante usando el kit DNA Free (Ambio).

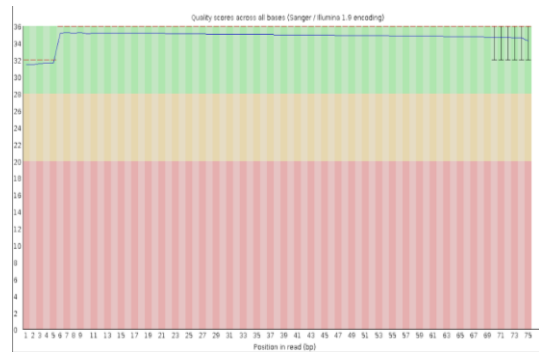
- a. Agregar 0.1 μ l del Buffer DNase 10X y 1 μ l de rDNase al ARN extraído, mezclando suavemente.
- b. Incubar a 37°C por 30 minutos.
- c. Adicionar el Reactivo de Inactivación de DNase (0.1V) y mezclar completamente.
- d. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, mezclando por momentos.
- e. Centrifugar a 10,000 g durante 1.5 minutos.
- f. Transferir el ARN tratado a un tubo Eppendorf nuevo.

GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DE CALIDAD DE TODAS LAS BIBLIOTECAS OBTENIDAS DEL FASTQC.

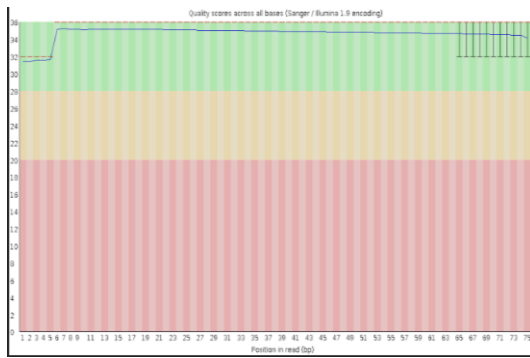
T0R1.fastqc



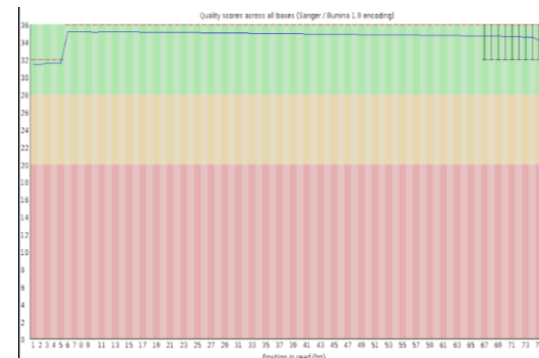
T0R2.fastqc



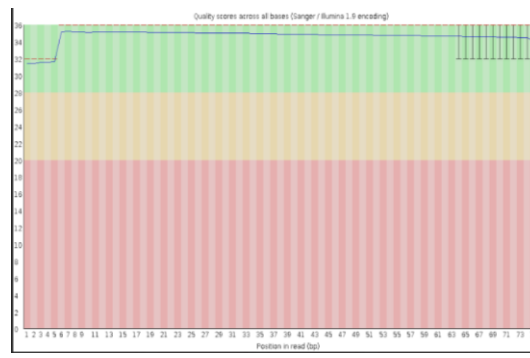
T0R3.fastqc



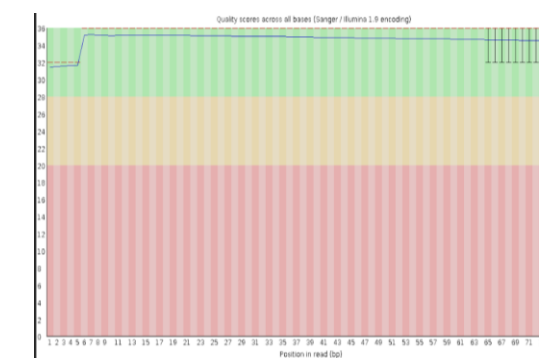
T1R1.fastqc



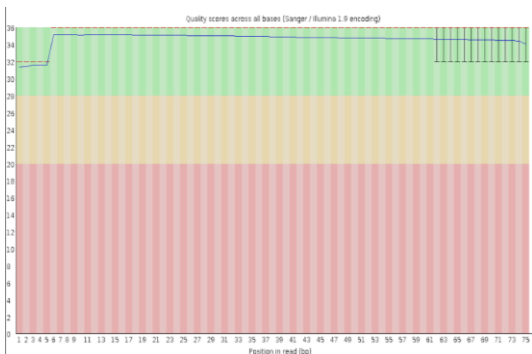
T1R2.fastqc



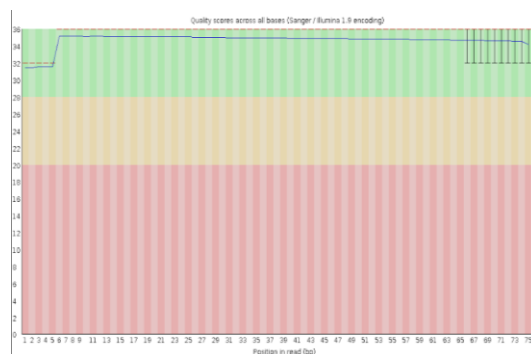
T1R3.fastqc



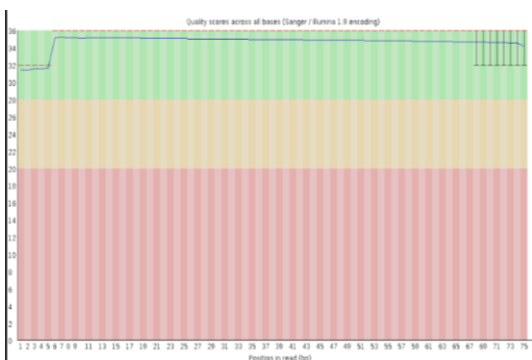
T2R1.fastqc



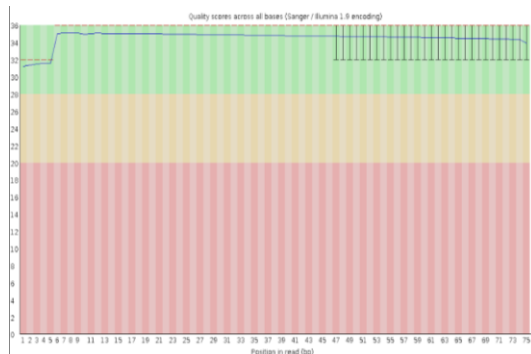
T2R2.fastqc



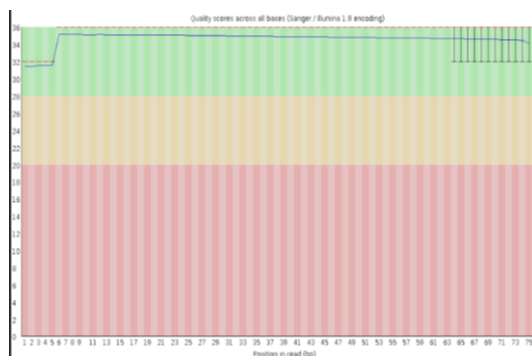
T2R3.fastqc



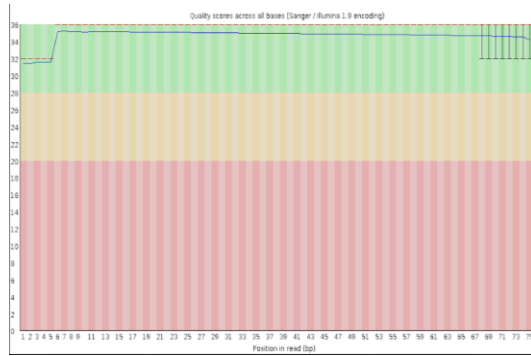
T3R1.fastqc



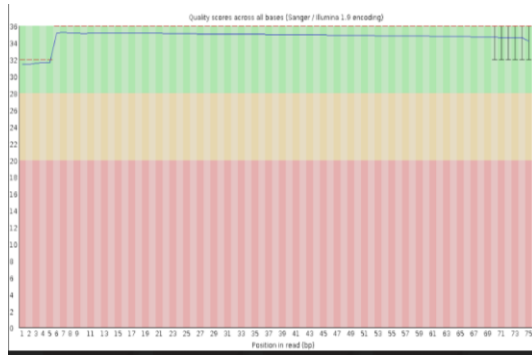
T3R2.fastqc



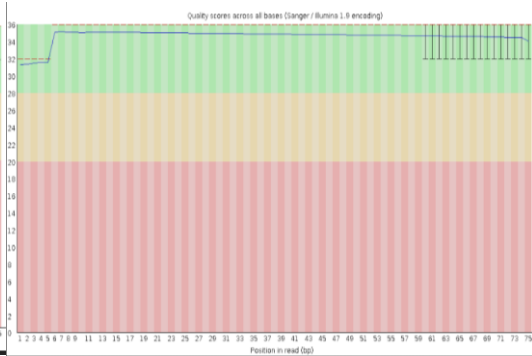
T3R3.fastqc



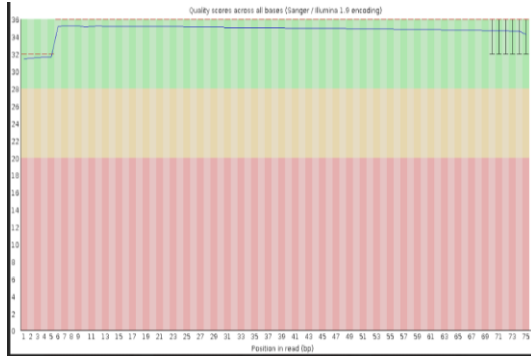
T0S1.fastqc



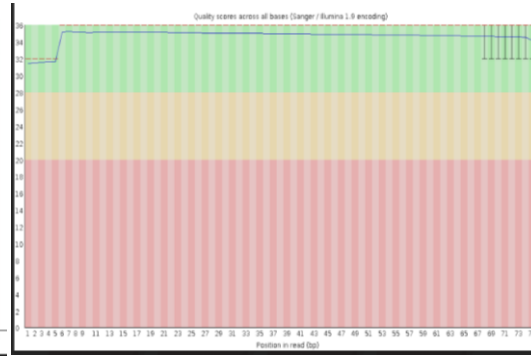
T0S2.fastqc



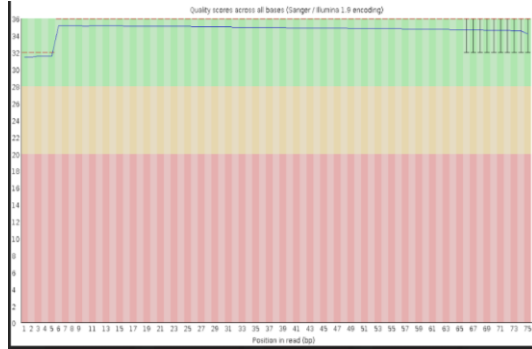
T0S3.fastqc



T1S1.fastqc



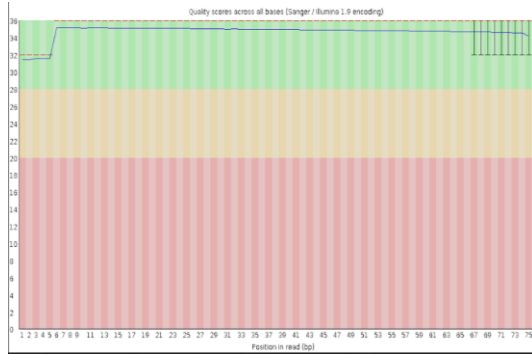
T1S2.fastqc



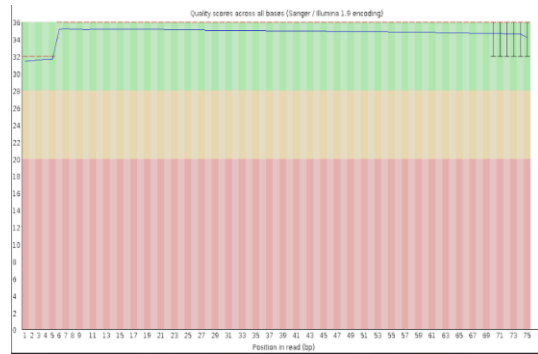
T1S3.fastqc



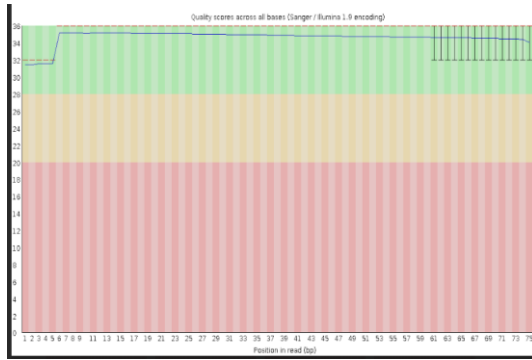
T2S1.fastqc



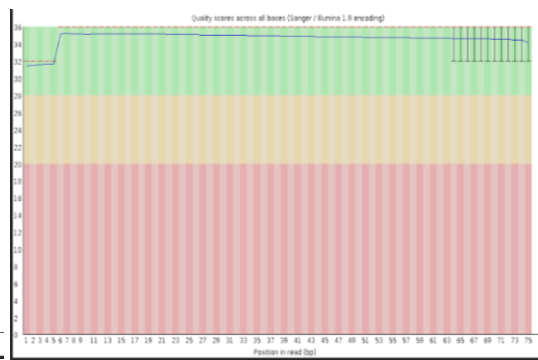
T2S2.fastqc



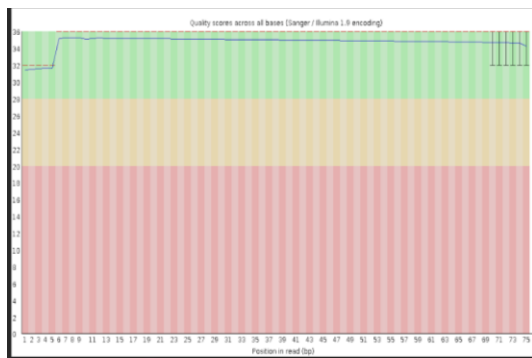
T2S3.fastqc



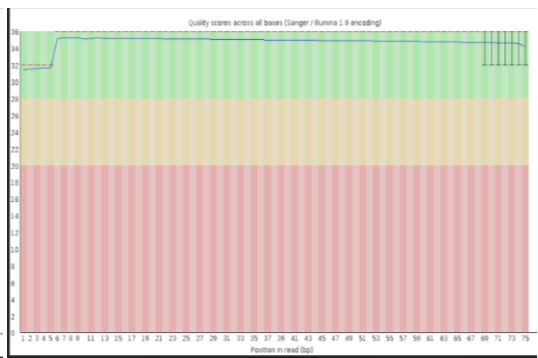
T3S1.fastqc



T3S2.fastqc



T3S3.fastqc



GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA ESPECIE SUSCEPTIBLE A HELADAS DURANTE EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN.

PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster, TOR: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, T3S: nivel de expresión (fpkm) en el tiempo de recuperación.

PGSC_id	UNIREF	T0S (fpkm)	T3S (fpkm)	log2
PGSC0003DMG40001330	Zinc finger protein	0.129711	32.6603	7.9761
PGSC0003DMG400014310	AP2 domain CBF protein	0.287506	67.3344	7.8716
PGSC0003DMG400011073	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 137	0.607904	90.8013	7.2227
PGSC0003DMG400020261	Polcalcin Jun o	0.283511	35.591	6.972
PGSC0003DMG400012962	Transcription factor HBP-1b(C1)	0.574093	67.0246	6.8673
PGSC0003DMG400021325	U-box protein	1.26916	129.964	6.6781
PGSC0003DMG400026332	NAC-domain protein	2.28939	220.434	6.5892
PGSC0003DMG400002993	Regulator of gene silencing	0.369123	35.2752	6.5784
PGSC0003DMG400010713	Salt responsive protein 2	3.43237	266.272	6.2776
PGSC0003DMG400030828	Phi-1 protein	1.76303	126.662	6.1668
PGSC0003DMG400020481	14 kDa proline-rich protein DC2.15	92.5413	0.291121	-8.31233
PGSC0003DMG400027180	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	69.4411	0.731116	-6.56955
PGSC0003DMG400030339	17.6 kD class I small heat shock protein	107.427	1.42196	-6.23932
PGSC0003DMG400028701	Zinc finger protein	71.1137	2.73859	-4.69862
PGSC0003DMG400013417	Chlorophyll a-b binding protein 3C, chloroplastic	173.647	3.90748	-5.47378
PGSC0003DMG400019517	Chitin-binding lectin 1	487.61	10.1762	-5.58245
PGSC0003DMG402019343	DNA binding protein	19.8233	0.964256	-4.36164
PGSC0003DMG400037894	Aspartic proteinase nepenthesin-1	26.3943	0.536975	-5.61923
PGSC0003DMG400006880	DRT100	159.334	9.12965	-4.12535
PGSC0003DMG400028809	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	156.371	12.4645	-3.64908

GENES INDUCIDOS EN LA PLANTA TOLERANTE A HELADAS DURANTE EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN.

PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster, TOR: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, T3R: nivel de expresión (fpkm) en el tiempo de recuperación al estrés.

PGSC_id	UNIREF	TOR (fpkm)	T3R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG400002899	AP2/ERF domain-containing transcription factor	0.250792	50.2703	7.64707
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2	0.220466	40.6475	7.52647
PGSC0003DMG400015534	ZPT2-13	0.488712	63.125	7.01308
PGSC0003DMG400014310	AP2 domain CBF protein	0.71972	59.5126	6.36961
PGSC0003DMG400020261	Polcalcin Jun o	0.624775	43.4957	6.12139
PGSC0003DMG400000332	Salt responsive protein 2	0.881659	57.0428	6.01568
PGSC0003DMG400041467	Zinc-finger protein	7.09726	362.059	5.67282
PGSC0003DMG400045603	Regulator of gene silencing	0.653961	27.516	5.39492
PGSC0003DMG400030827	Phi-1 protein	1.28708	52.0796	5.33854
PGSC0003DMG400021777	Zinc finger protein	3.35931	132.948	5.30655
PGSC0003DMG400009116	Membrane receptor 1	0.17524	6.85414	5.28957
PGSC0003DMG400017299	Xyloglucan endotransglycosylase	1.20037	46.61	5.27908
PGSC0003DMG400001396	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231	1.73921	65.7444	5.24036
PGSC0003DMG400002383	C2H2-type zinc finger protein	1.17367	40.6629	5.11462
PGSC0003DMG400014311	CRT binding factor 3	0.723966	25.0569	5.11314
PGSC0003DMG400012962	Transcription factor HBP-1b(C1)	0.902381	31.1532	5.1095
PGSC0003DMG400010713	Salt responsive protein 2	6.69401	223.689	5.06248
PGSC0003DMG400021508	C2H2-type zinc finger protein	9.63706	292.816	4.92526
PGSC0003DMG400021325	U-box protein	1.97472	59.6926	4.91783

GENES REPRIMIDOS EN LA PLANTA TOLERANTE A HELADAS DURANTE EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN.

PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster, TOR: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, T3R: nivel de expresión (fpkm) en el tiempo de recuperación al estrés.

PGSC_id	UNIREF	TOR (fpkm)	T3R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG400011740	SGA	6.4452	0.227332	-4.82536
PGSC0003DMG402003479	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	9.05421	0.334445	-4.75875
PGSC0003DMG400029085	Mta/sah nucleosidase	78.5869	3.20872	-4.61422
PGSC0003DMG400011752	Cellulose synthase	7.9683	0.368117	-4.43604
PGSC0003DMG400001614	SAUR family protein	29.8391	1.51717	-4.29775
PGSC0003DMG400029247	Patatin group O	9.21216	0.609776	-3.91719
PGSC0003DMG400001668	SAUR family protein	18.9351	1.6951	-3.48162
PGSC0003DMG400008137	Glucosyltransferase	12.5669	1.1776	-3.41571
PGSC0003DMG400011750	Cytochrome P-450	7.67445	0.768079	-3.32074
PGSC0003DMG400028678	Pectinesterase inhibitor	13.7038	1.47876	-3.21211
PGSC0003DMG400011311	Epoxide hydrolase 1	7.98961	0.887648	-3.17007
PGSC0003DMG400026004	Leucine-rich repeat receptor kinase	6.21955	0.734932	-3.08113
PGSC0003DMG400000546	UP-9 ^a	12.1992	1.44399	-3.07865
PGSC0003DMG400008300	Chlorophyll a/b binding protein	387.097	46.0922	-3.0701
PGSC0003DMG400005967	TRANSPARENT TESTA 12 protein	2.65776	0.333183	-2.99583
PGSC0003DMG400023493	Acyltransferase	2.0049	0.252685	-2.98812
PGSC0003DMG400043108	STS14 protein	23.0006	2.98342	-2.94663

**GENES INDUCIDOS DURANTE LA RESPUESTA TEMPRANA
ESPECÍFICAMENTE EN LA ESPECIE TOLERANTE A HELADAS.**

PGSC_id: códigos de los transcritos de papa, UNIREF: Uniprot reference cluster,
T0R: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, T1R: nivel de expresión (fpkm)
en la respuesta temprana al estrés.

PGS_id	UNIREF	T0R (fpkm)	T1R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG400002899	AP2/ERF domain-containing transcription factor	0.250792	26.157	6.70456
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2	0.220466	17.6256	6.32097
PGSC0003DMG400014310	AP2 domain CBF protein	0.71972	38.5091	5.74162
PGSC0003DMG400002383	C2H2-type zinc finger protein	1.17367	32.9993	4.81334
PGSC0003DMG400005899	CCR4-associated factor	9.76588	239.117	4.61382
PGSC0003DMG400012525	DREB1	0.459812	7.06096	3.94075
PGSC0003DMG400035643	Drought-induced protein SDi	58.6748	616.647	3.39363
PGSC0003DMG400017936	Late embryogenesis abundant protein 5	60.8705	606.441	3.31655

**EVALUACIÓN VISUAL DEL DAÑO EN PLANTAS TOLERANTES
SOMETIDAS A TEMPERATURAS ENTRE ENTRE -4°C Y -5°C.**

Izq. Planta tolerante después de una semana de haber sido sometida a temperaturas entre -4°C y -5°C. Der. Planta tolerante después de una semana de haber sido sometida a temperaturas entre -6°C y -8°C.



GENES CON FUNCIONES DESCONOCIDAS INDUCIDOS DURANTE T1R.

PGS_id	UNIREF	T0R (fpkm)	T1R (fpkm)	log2
PGSC0003DMG402030595	Conserved gene of unknown function	0.542989	17.4575	5.00678
PGSC0003DMG400012655	Conserved gene of unknown function	0.695615	13.9445	4.32527
PGSC0003DMG400006905	Gene of unknown function	0.662341	8.41108	3.66664
PGSC0003DMG400028485	Conserved gene of unknown function	1.66739	14.88	3.15771
PGSC0003DMG400006904	Gene of unknown function	3.21316	27.9879	3.12274
PGSC0003DMG400027566	Conserved gene of unknown function	12.1865	55.7015	2.19243