



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN
RESPUESTA A TEMPERATURAS DE CONGELAMIENTO EN
PAPAS NATIVAS TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES”**

Por

Emi Jimena Murata Separovich

Tesis para optar por el título de

Licenciada en Biología

Lima - Perú

2017

Agradecimientos

Gracias a Dios y a mi familia y a mis amigos por haberme dado ánimos a lo largo de la realización de ésta tesis, en especial a mi mamá, quien se quedaba a hacerme compañía durante los momentos de silencio de la madrugada en los que la escribí.

A mis amigos y colegas de la Unidad de Genómica en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo, consejos, guía y paciencia, sobre todo a Diana Martínez y Mey-Ling Espinoza, con quienes trabajé en el proyecto del que surgió mi tesis y a Roberto Lozano por introducirme en el mundo de la bioinformática y guiarme en el uso de las herramientas que necesité para este trabajo.

Gracias a la Dra. Noemí Zúñiga por apoyarnos durante el proyecto en la parte del crecimiento de las plantas y por permitirnos realizar parte del trabajo en INIA.

Gracias a mi asesor de tesis, Edgar Neyra, por su paciencia y espera.

Finalmente, agradezco al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), bajo el contrato 170-FINCyT-IB-2013, por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto a través del cual pude realizar la presente tesis y por apoyar la ciencia y tecnología en el Perú.

Resumen

La papa, *Solanum sp.*, es considerada por la FAO el cuarto cultivo de mayor importancia después del arroz, el trigo y el maíz. Este cultivo es gravemente afectado por las heladas; sin embargo, existen variedades de papas nativas en Perú capaces de tolerar sus efectos, siendo de interés para estudios de mejoramiento genético. El incrementar el conocimiento existente sobre la capacidad de tolerancia a heladas de nuestras papas nativas es un paso hacia la generación de variedades comerciales tolerantes, en beneficio de la producción de papa del Perú. Este proyecto apuntó a establecer una base para investigaciones futuras al comparar los genes regulados en una variedad de papa susceptible a heladas contra una tolerante para indagar cuáles genes podrían ser de importancia en la respuesta de la variedad tolerante. Con este objetivo en mente, se secuenció mediante RNAseq el transcriptoma de dos variedades de papa nativas de Huancayo, una susceptible y otra tolerante a heladas, tras exponerlas a 0°C, a fin de compararlos y encontrar genes candidatos de tolerancia a heladas. Entre nuestras observaciones encontramos factores de transcripción tipo *CBF*, *MYB*, *NAC* y *ZF* que podrían ser de importancia en la respuesta de nuestra papa nativa tolerante.

Palabras clave: Papas nativas, heladas, RNAseq, transcriptómica.

Abstract

Potato, *Solanum sp.*, is considered by FAO as the fourth most important crop after rice, wheat and maize. This crop is strongly affected by frosts, however, there are Peruvian native potato varieties which can withstand frost and are, therefore, of interest for crop improvement. Increasing the available knowledge on our native potatoes' capacity to tolerate frost represents a step towards producing tolerant commercial varieties, benefiting the Peruvian potato production. This study aimed to establish a baseline for future investigations by comparing the genes regulated in tolerant and susceptible potato varieties to search for those which could be important to the tolerant potato's response. With this objective in sight, the transcriptome of two native potato varieties from Huancayo, a frost sensitive one and a frost tolerant one, were sequenced by RNA-seq before and after exposure to 0°C, in order to compare them and find frost tolerance candidate genes. Among our results, we found transcription factors such as *CBF*, *MYB*, *NAC* and *ZF* that could be of importance for the response of our tolerant native potato.

Keywords: Native potatoes, frost, RNAseq, transcriptomics

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
TABLA DE CONTENIDOS	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	9
IMPORTANCIA DE LA PAPA.....	9
FACTORES DE ESTRÉS Y POSIBLES RESPUESTAS	9
EFECTOS DEL FRÍO	10
LAS HELADAS.....	10
PAPAS NATIVAS COMO RECURSO DE MEJORAMIENTO	12
II. ANTECEDENTES	13
CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LA PAPA	13
ESTRÉS ABIÓTICO Y BAJAS TEMPERATURAS.....	14
ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA.....	17
III. OBJETIVOS	20
GENERAL.....	20
ESPECÍFICOS.....	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
MATERIAL BIOLÓGICO	21
LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	22
PROCEDIMIENTO.....	23

I.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS	23
II.	EXTRACCIÓN DE RNA Y SECUENCIAMIENTO.....	24
III.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL	27
V.	RESULTADOS:.....	30
I.	EXTRACCIÓN DE RNA Y SECUENCIAMIENTO.....	30
II.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL	33
VI.	DISCUSIÓN:	44
VII.	CONCLUSIONES:	52
VIII.	ABREVIATURAS:	54
IX.	BIBLIOGRAFÍA:	55
X.	ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: VARIEDAD TOLERANTE (IZQUIERDA) Y SUSCEPTIBLE (DERECHA) DESPUÉS DE PASAR UNA HORA A 0°C Y -4°C	21
FIGURA 2: ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL. SE UTILIZARON TRES RÉPLICAS BIOLÓGICAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON LOS SIGUIENTES: TRATAMIENTO 0 O CONTROL: LUZ AMBIENTAL, TEMPERATURA AMBIENTE (~15°C), 1 HORA; TRATAMIENTO 1: OSCURIDAD*, 0°C, 1 HORA. SE EXTRAJO RNA DE MUESTRAS DE HOJA, EL CUÁL FUE UTILIZADO PARA SECUENCIAR EL TRANSCRIPTOMA. POSTERIORMENTE SE REALIZÓ EL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.	23
FIGURA 3: RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO BIOINFORMÁTICO. SE REALIZA UN CONTROL DE CALIDAD PREVIO EN EL CUÁL SE VERIFICA LA CALIDAD DE LAS SECUENCIAS, LA CALIDAD POR BASE, LA LONGITUD DE LAS LECTURAS, EL CONTENIDO DE GC, LA PRESENCIA DE ADAPTADORES, ENTRE OTROS PARÁMETROS. DEPENDIENDO DE LO ENCONTRADO, SE REALIZA UNA “LIMPIEZA” DE LA DATA CRUDA Y SE PROCEDE CON EL ANÁLISIS. PRIMERO SE UTILIZA BOWTIE2 Y TOPHAT2 PARA MAPEAR LAS LECTURAS DE CADA RÉPLICA BIOLÓGICA. POSTERIORMENTE SE UTILIZA CUFFDIFF PARA CUANTIFICAR LA EXPRESIÓN Y HALLAR LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE AMBAS CONDICIONES.....	26
FIGURA 4: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LAS MUESTRAS DE RNA. (M: MARCADOR DE 1KB) EN AMBOS GELES SE PUEDEN OBSERVAR LAS SUBUNIDADES RIBOSOMALES CERCA DE LAS BANDAS DE 500BP Y 750BP.	30
FIGURA 5: GRÁFICO DE LA CALIDAD POR BASE DE LAS LECTURAS DE LA MUESTRA TOS2. EN EL EJE X SE ENCUENTRA LA POSICIÓN EN PARES DE BASES Y EN EL EJE Y, LA CALIDAD EN PUNTAJE PHRED. EN LA BASE NÚMERO 75 SE OBSERVA EL PUNTAJE PHRED MÍNIMO EL CUAL ESTUVO ENTRE 26 Y 28.	32
FIGURA 6: DISTRIBUCIÓN DE LA LONGITUD DE LAS SECUENCIAS. EL EJE Y ES EL NÚMERO DE SECUENCIAS QUE HAY CON LA LONGITUD INDICADA EN EL EJE X. CLARAMENTE SE VE QUE LAS SECUENCIAS MENORES A 70BP SON CERCANAS A CERO Y QUE LA MAYOR PARTE MIDE 75BP.	33
FIGURA 7: NÚMERO DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE EL CONTROL (T.A.) Y EL TRATAMIENTO (1H A 0°C). EL CONJUNTO AZUL REPRESENTA LA VARIEDAD TOLERANTE MIENTRAS QUE EL CONJUNTO ROJO, LA SUSCEPTIBLE. SE DISTINGUE ENTRE GENES INDUCIDOS (↑), REPRIMIDOS (↓) Y AQUELLOS REGULADOS DE FORMA INVERSA ENTRE LAS VARIEDADES (↕).	35

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LAS VARIEDADES DE PAPA USADAS EN EL TRABAJO	22
TABLA 2: CONDICIONES GEOGRÁFICAS DE LA ESTACIÓN INIA – SANTA ANA. INFORMACIÓN TOMADA DE SU PÁGINA WEB....	22
TABLA 3: CALIDAD Y CANTIDAD DE RNA POR MUESTRA A PARTIR DE ESPECTROFOTOMETRÍA.	31
TABLA 4: RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE TOPHAT2. SE MUESTRAN EL NÚMERO TOTAL DE LECTURAS EN LAS LIBRERÍAS UTILIZADAS, EL PORCENTAJE DE LECTURAS MAPEADAS Y NO MAPEADAS Y EL PORCENTAJE DE ALINEAMIENTOS ÚNICOS Y MÚLTIPLES.....	34
TABLA 5: VALORES DE R ² A PARTIR DE UNA REGRESIÓN LINEAR SIMPLE ENTRE LAS REPETICIONES BIOLÓGICAS. EN LA PRIMERA COLUMNA, LAS REPETICIONES COMPARADAS; EN LA PRIMERA FILA, LA CONDICIÓN Y VARIEDAD A LA QUE CORRESPONDEN.	34
TABLA 6: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE CUFFLINKS. LA TABLA A CONTINUACIÓN PRESENTA LAS ENTRADAS CORRESPONDIENTES A LOS GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA VARIEDAD TOLERANTE Y CUYO CAMBIO DE EXPRESIÓN DE CONTROL A TRATAMIENTO FUE POSITIVO. LOS RÓTULOS DE LAS COLUMNAS CORRESPONDEN A EL CÓDIGO DEL GEN SEGÚN EL GENOMA DE REFERENCIA (ID), EL NOMBRE O DESCRIPCIÓN DE SU PRODUCTO (GEN), SU UBICACIÓN EN EL GENOMA DE REFERENCIA (LOCUS), LOS VALORES DE EXPRESIÓN PARA CADA CONDICIÓN EN FPKM (FPKM CONTROL, FPKM 0°C) Y EL CAMBIO DE EXPRESIÓN ENTRE AMBAS CONDICIONES DEFINIDO COMO EL LOGARITMO EN BASE DOS DEL COCIENTE DEL VALOR DE EXPRESIÓN EN EL TRATAMIENTO ENTRE EL DEL CONTROL. *LAS ENTRADAS PARA LAS CUALES LA COLUMNA “GEN” CORRESPONDÍA A FUNCIÓN DESCONOCIDA FUERON OMITIDAS.....	36
TABLA 7: LA TABLA A CONTINUACIÓN PRESENTA LAS ENTRADAS CORRESPONDIENTES A LOS GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN AMBAS VARIEDADES PERO CUYO CAMBIO DE EXPRESIÓN DE CONTROL A TRATAMIENTO OCURRIÓ EN DIRECCIONES OPUESTAS. LOS RÓTULOS DE LAS COLUMNAS SON IGUALES A AQUELLOS EN LA TABLA 6. *LAS ENTRADAS PARA LAS CUALES LA COLUMNA “GEN” CORRESPONDÍA A FUNCIÓN DESCONOCIDA FUERON OMITIDAS.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

TABLA 8: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ÚNICAMENTE EN LA VARIEDAD DE PAPA TOLERANTE A BAJAS TEMPERATURAS.....	63
TABLA 9: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN AMBAS VARIEDADES DE PAPA PERO EN DISTINTOS SENTIDOS.	70

I. Introducción

Importancia de la papa

La papa es un cultivo muy versátil tanto a nivel climático como ecológico, lo que ha propiciado su creciente importancia económica y social en por lo menos 120 países. Su distribución es mundial, y no sólo en cuanto a posición geográfica sino también rango altitudinal, llegando desde cero hasta 4300m.s.n.m. (Tapia y Fries, 2007). Sumado a ello está el alto valor alimenticio de sus tubérculos, compuestos aproximadamente en un 75% por carbohidratos y fuente también de proteínas, vitaminas, minerales y fibra (Birch *et al.*,2012). Debido a su amplia distribución y a sus cualidades nutricionales, se ha convertido en el tercer cultivo más importante en el mundo (Birch *et al.*,2012) y juega un rol vital en seguridad alimentaria y lucha contra el hambre y la pobreza como el cuarto alimento básico (FAO, 2009).

Factores de estrés y posibles respuestas

La producción de papa puede verse afectada por múltiples factores de estrés, los cuales se dividen en bióticos y abióticos. Los primeros se relacionan a otros organismos e incluyen plagas y enfermedades (CIP, 1996); mientras que los segundos están relacionados con las condiciones físicas o químicas que ofrece el ambiente, siendo la temperatura a la que está expuesta el cultivo una de las condiciones más importantes. Las respuestas de las plantas frente a condiciones adversas o de estrés se catalogan como susceptibilidad, evasión, tolerancia y resistencia. Los mecanismos de evasión permiten que la planta no sea expuesta al estrés; los de tolerancia, que la planta soporte el evento aunque pueda sufrir algunos daños; los de resistencia implican un cambio en la fisiología de la planta también llamado aclimatación que le permite sobrellevar las condiciones de estrés (Tuteja y Sarvajeet, 2013).

Efectos del frío

Los cultivos de papa pueden crecer a temperaturas bajas, mas no de congelamiento. Su temperatura ideal está entre los 10 y 15 °C; ya que los tubérculos dejan de crecer por debajo de entre 5 y 7°C y por encima de 19 a 21°C (FAO, 2010; Haverkrot y Verhagen, 2008). En las plantas, el frío por sí solo es capaz de desacelerar los procesos bioquímicos y desplazar su equilibrio hacia la liberación de energía, además de alterar estructuras como las membranas lipídicas (Sakai y Larcher, 1987). Ante temperaturas lo suficientemente bajas se puede formar hielo extracelular, provocando deshidratación osmótica y agravando el estrés de la planta. La formación de hielo intracelular, por otro lado, es letal. Los efectos del estrés, tales como los cambios en la fluidez de membranas, la formación de hielo extracelular, la deshidratación celular y la generación de ROS (*Reactive Oxygen Species*), son manejados por las plantas modulando la expresión de genes de modo que se dan cambios en la composición lipídica de las membranas, se acumulan moléculas crioprotectoras, aumenta la producción de proteínas chaperonas y se modulan moléculas antioxidantes, entre otras medidas (Thomashow, 1999). Las vías moleculares que regulan estas respuestas suelen dividirse entre dependientes de ICE1-CBF e independientes de CBF y desencadenan la expresión de un conjunto de genes llamados de respuesta a frío o COR (*COld Responsive*) (Chinnusamy *et al.*,2007).

Las heladas

Las heladas son eventos climáticos en los que la temperatura desciende dramáticamente, según su definición meteorológica, alcanzando 0°C o menos (SENAMHI-FAO, 2010). Éstas pueden causar serios daños a la agricultura e inclusive la pérdida total de los cultivos afectados (Gutiérrez, 2008) y representan uno de los principales factores de riesgo para el cultivo de papa en el Perú. Un ejemplo de su gravedad fue lo ocurrido en el valle del río Mantaro durante el año 2007, cuando una

helada moderada durante el periodo de tuberización de las papas provocó la disminución en un 13.5% de la producción, variando las temperaturas registradas en diferentes zonas del valle sólo entre -1.3°C y -0.3°C (UNDP, 2013; Trasmonte, 2009). Las heladas se hacen más frecuentes con la altura y se vuelven permanentes entre los 4000 m.s.n.m. (SENAMHI – FAO, 2010) y los 4500 m.s.n.m. (Huamani, J. C., 2007), de modo que son comunes en la región andina, sobre todo al sur del país. Según el Plan Multisectorial para la Atención de Heladas y Friaje 2013 del Gobierno del Perú, las regiones con mayor recurrencia de heladas serían Puno, Cusco, Huancavelica y las zonas altas de Arequipa, Ayacucho, Pasco y Junín. Según dicho informe, durante el año 2012 se presentaron temperaturas mínimas absolutas de como -11.6°C (Laive, Junín) hasta incluso -21.5°C (Chuapalca, Tacna). La acentuada variabilidad climática que presenta el Perú favorece la ocurrencia de eventos extremos y el cambio climático está causando variaciones en su frecuencia e intensidad (SENAMHI, 2009). La población más afectada por las heladas habita por encima de los 3000 m.s.n.m. y se dedica principalmente a la ganadería y agricultura de autoconsumo. Ellos ven afectada su producción agrícola y el acceso a una importante fuente de alimentación para sus familias. (FAO, 2010).

De forma práctica, las heladas pueden combatirse mediante algunas estrategias que se dividen en métodos activos o directos y pasivos, preventivos o indirectos (Martínez *et al.*, 2008). La protección activa consiste en aplicar energía para contrarrestar el calor perdido desde la superficie del suelo y evitar que el aire cercano a las plantas se enfríe demasiado. La protección pasiva no aplica energía, es menos costosa y usualmente lo suficientemente beneficiosa para evitar la necesidad de métodos activos. Destaca entre sus estrategias la selección de las plantas a cultivarse (Snyder y de Melo-Abreu, 2010; UNDP, 2013). En el Perú, los agricultores seleccionan cuidadosamente las variedades que van a cultivar, y ésta es sin duda la estrategia más efectiva (Pérez *et al.*, 2010).

Papas nativas como recurso de mejoramiento

La papa fue domesticada en la región andina, siendo su principal centro de domesticación el sur del Perú y el límite con Bolivia. Por este motivo, estas regiones poseen una gran diversidad, la cual se muestra en el alto número de variedades que poseen. Muchas de las variedades llamadas nativas son capaces de tolerar enfermedades o condiciones adversas. Estas variedades se han registrado en 16 países, de los cuales el Perú aloja cerca del 47% de la riqueza total de especies, así como un gran número de especies consideradas raras (Hijmans y Spooner, 2001). De este modo, el Perú cuenta con un reservorio genético amplio y de gran potencial, un recurso invaluable para el desarrollo de variedades comerciales mejoradas de papa.

El incrementar el conocimiento existente sobre qué mecanismos confieren tolerancia a heladas a ciertas variedades de papa es un paso hacia la generación de variedades comerciales tolerantes. Generar variedades de papa que toleren las heladas y den una buena producción beneficiaría el cultivo de papa en el Perú y disminuiría notablemente las pérdidas causadas por las heladas. Aunque esto podría llevarse a cabo mediante cruces sucesivos y constante selección, esta metodología tomaría mucho tiempo y esfuerzo. Otras opciones más rápidas son la selección asistida por marcadores o la ingeniería genética, para las cuales se necesita conocer los genes que estarían involucrados con respuestas de supervivencia frente a dicho estrés. Este proyecto apunta a establecer una base para investigaciones futuras al comparar los genes regulados en una variedad de papa susceptible contra una tolerante a heladas para indagar cuáles podrían ser de importancia en la respuesta de la variedad tolerante. Con este objetivo en mente es que se secuenció el transcriptoma de dichas variedades, a fin de compararlos y encontrar genes candidatos de tolerancia a heladas. Trabajos similares pueden realizarse con tecnología de microarreglos o *microarrays*; sin embargo, ésta solo permite evaluar la expresión de un conjunto determinado de genes y no es capaz de detectar nuevos candidatos. Dado que los

costos de secuenciamiento han disminuido, se decidió utilizar el método de secuenciamiento de RNA o RNA-seq, que permite una medida más certera de los niveles de transcritos y sí es capaz de detectar genes inesperados (Wang, 2009).

II. Antecedentes

Clasificación y morfología de la papa

La papa es una planta herbácea, suculenta y caducifolia (Tapia y Fries, 2007; Montaldo, 1984) que produce tubérculos. Estos son tallos subterráneos modificados que sirven de reserva de nutrientes y permiten que la planta vuelva a crecer y reproducirse en la siguiente estación favorable, haciéndola perenne. No obstante, el cultivo de papa es anual, ya que es precisamente el tubérculo lo que se cosecha (Struik, 2007).

Las papas se diferencian en cultivadas y silvestres, por una cuestión cultural, según se siembren o crezcan sin intervención del hombre (Spooner D & Salas A, 2006). Entre las cultivadas se pueden diferenciar los cultivares modernos y nativos (Spooner y Hetterscheid, 2006). Las papas cultivadas se han clasificado como especies según el ICBN (Código internacional de nomenclatura botánica) y han sido descritas por Dodds (1962), Bukasov (1971), Correl (1962), Hawkes (1990) y Ochoa (1990,1999). La clasificación más difundida es la de Hawkes, en la cual se divide la sección Petota en la subsección Potatoe Hawkes, que contiene 19 series, y la subsección Estolonifera Hawkes, con dos series. Esta clasificación reconoce siete especies de papas cultivadas: *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja*, *S. stenotomum* y *S. tuberosum* con las subespecies *tuberosum* y *andígena* (Spooner y Salas, 2006; Spooner y Hetterscheid, 2006; van den Berg y Jacobs, 2007). Según esta clasificación, la papa pertenece al género *Solanum*, familia Solanaceae, subgénero Potatoe, sección Petota.

Estrés abiótico y bajas temperaturas

Hoy en día, sabemos que las células vegetales se deshidratan al caer la temperatura por debajo de los 0°C. El hielo que empieza a formarse en el espacio intercelular causa un desbalance osmótico. En compensación, el agua sale de las células, deshidratándolas y concentrando el citosol. Esta deshidratación es la principal causa de daño por congelamiento. Aunque denatura proteínas y precipita otras moléculas, el daño más notorio que causa es la disrupción de la membrana celular por la transición de fase de la bicapa lipídica entre -4°C y -10°C (Thomashow 1998). Actualmente, incluso se está estudiando cómo es que, con ayuda de INAS (*Ice Nucleation Active Substances*) y moléculas de efecto opuesto como las AFP (*Anti-Freezing Proteins*), parece regularse en qué tejidos de una planta se acumula hielo de forma preferente (Wisniewski *et al.*, 2013).

Sin embargo, el interés de la comunidad científica en cómo las plantas resisten bajas temperaturas surgió alrededor del siglo XVIII y recién el siglo XIX, empezaron a discutirse algunas ideas sobre el efecto del congelamiento en las plantas. En un inicio se pensó que podían sobrevivir solo a un congelamiento parcial, cuyos efectos podrían atenuarse siempre y cuando se descongelasen gradualmente. Esto, ya que se creía que las estructuras celulares se desorganizarían durante el descongelamiento (Sachs, 1860). Posteriormente, la muerte de las plantas se atribuyó a que las estructuras, desde tejidos hasta células, se rompían cuando el hielo se expandía durante el congelamiento. A esto se le llamó "*rupture theory*" o, en castellano, teoría de la ruptura. Asimismo, se notó que la sabia de las plantas podía mantenerse fluida a temperaturas bajo cero; no obstante, se atribuyó dicha propiedad a su viscosidad (Le Conte, 1852; Blackman, 1909; Levitt, 1980).

A fines de siglo XIX, se desestimó la teoría de la ruptura tras observarse que las paredes celulares no se rompían (Nägeli, 1861) y demostrarse que los tejidos

vegetales más bien se contraían. El factor más determinante fue que se logró observar la formación de hielo en tejido vegetal al microscopio. De este modo se descubrió que los tejidos primero se super-enfriaban, para congelarse posteriormente de forma repentina, que el hielo se formaba comúnmente en el espacio intercelular y que a la par ocurría la deshidratación celular (Molisch, 1897). Así se empezó a sospechar que era la deshidratación lo que desorganizaba las estructuras celulares y causaba la muerte de las plantas (Muller-Thurgau, 1880; Molisch, 1897). También se descartó el rol de la velocidad del descongelamiento en el daño celular tras hallarse la fluorescencia de la ficoeritrina y el olor de la cumarina en el alga roja *Nitophyllum* y en hojas de *Agerantum mexicanum*, respectivamente, sin necesidad de descongelar los tejidos, ambos signos indicaban muerte celular (Molisch, 1897). Para inicios del siglo XX ya se había concluido que la deshidratación de las células y la concentración de las sales al interior afectaban la estabilidad de las proteínas. Tras comparar la concentración de proteínas en la savia de tejidos normales y descongelados en distintas plantas, se observó que no sólo precipitaban más proteínas en la savia descongelada; sino que también había diferencias entre muestras de plantas resistentes y susceptibles (Gorke 1906). A pesar de estos avances, faltaría mucho hasta que se pensara en mejorar cultivos contra el efecto de las heladas. Debido a que, en aquellos días, el campo de la genética y el mejoramiento de cultivos recién estaba empezando a convertirse en lo que conocemos ahora.

La agricultura ha acompañado al hombre desde los inicios del sedentarismo y desde entonces hemos impactado la evolución de nuestros alimentos seleccionándolos de forma intuitiva. Sin embargo; la genética, como el estudio de la herencia, nace recién en 1866 gracias a los estudios de Gregor Mendel. Sus estudios fueron incomprendidos y olvidados hasta que nuevos descubrimientos crearon un contexto en el que pudiesen encajar mejor. Es así que fueron redescubiertos con treinta años de retraso, traducidos al inglés y re-publicados. Fue su trabajo el que llevó

a la actual teoría cromosómica de la herencia y es, hasta ahora, la base de la genética clásica. Posteriormente, tuvo que comprobarse que era el ADN y no las proteínas quienes cargaban la información genética y recién a mediados de siglo supimos cómo era su estructura (Watson y Crick, 1953). Estos avances contribuyeron a la revolución verde, la cual inició en los 60s, y derivó en el mejoramiento de cultivos utilizando genes y marcadores moleculares. Abraham Blum hace un maravilloso recuento de dichos sucesos en el prefacio de uno de los manuales del CIMMYT (Reynolds *et al.*,2012). Este periodo inició al buscarse reducir la altura en plantas de trigo y arroz para evitar que se acamen. Tras la introducción del semi-enanismo en variedades comerciales de cereales, los avances en mejoramiento de cultivos se aceleraron de forma dramática. No obstante, el enfoque estaba en mejorar el rendimiento de los cultivos y se buscaba una sola variedad que funcionase para todo tipo de ambientes. Recién a mediados de siglo, se empieza a considerar la necesidad de cultivares específicos para distintas condiciones ambientales y empiezan también los esfuerzos conjuntos entre mejoradores y fisiólogos vegetales. Finalmente, no es sino hasta 1972 que se definen propiamente en la literatura términos como estrés biótico y abiótico, resistencia y susceptibilidad en el libro de Jacob Levitt (1972).

En este contexto en 1970, se propone que cambios en la expresión genética cumplían un rol en el proceso de aclimatación al frío. En 1983, se observa que inhibir la síntesis proteica evita el aclimatamiento en *Solanum commersonii*, una papa silvestre. Durante los 80s, varios estudios de traducción *in vitro* mostraron diferencias entre los tamaños de proteínas sintetizadas a partir de mensajeros de plantas aclimatadas y sin aclimatar, el primero en espinaca en 1985 (Guy *et al.*,1985; Guy *et al.*,1987). También se encontraron diferencias en experimentos de *northern blot* utilizando clones de cDNA o gDNA de genes que luego fueron designados como genes *COR* (*COLD Regulated*). De estos genes, el primero para el que se halló evidencia directa de un rol en la resistencia al congelamiento fue *COR15a*, a través de

su transformación en cloroplastos y protoplastos en plantas transgénicas en 1996 (Thomashow, 1990; Thomashow, 1998).

Hoy en día, tras nuevos avances en genética y el desarrollo de tecnologías de secuenciamiento del DNA, nuevos estudios echan luces al origen de la resistencia y susceptibilidad al congelamiento. En papa, ya se hacen trabajos en transcriptómica, en los que se evalúan los cambios de expresión en ciertos tejidos. Por ejemplo, se ha comparado el estrés por calor, frío y salinidad y concluido que parece haber respuestas específicas a cada uno; aunque también parece haber una respuesta general a los tres (Rensink *et al* 2005). Utilizando microarreglos en *Solanum tuberosum*, se ha encontrado que la represión de genes relacionados al proceso de fotosíntesis, glicólisis y gluconeogénesis es común entre el estrés por frío y salinidad. En cambio, la inducción de genes relacionados a detoxificación y rescate celular sería una respuesta única del estrés por frío (Evers *et al.*,2012). Estudios entre cultivares distintos de papa sometidos a bajas temperaturas apuntan además, a que la capacidad de aclimatación y el número de genes regulados durante dicho proceso, es variable entre los mismos (Oufir *et al.*,2008).

Estrategias de análisis de expresión genética

La cuantificación de la expresión genética hoy en día, se hace de distintas maneras. Las más populares siendo el uso de *RNA sequencing* (RNA-seq), microarreglos y *quantitative reverse transcription PCR* (qRT-PCR). Los primeros en cuantificar la expresión genética mediante *reverse transcription PCR* (RT-PCR) fueron Murphy *et al* y Noonan *et al.*, en 1990. La base teórica de sus metodologías estaría en que, al usar cDNA sintetizado a partir de RNA total, la cantidad de producto de PCR tendría que ser proporcional al número de moléculas molde o *template* iniciales, por lo que se tenía que verificar la linealidad de la PCR mediante estándares de diluciones en serie de cDNA, variaciones en el número de ciclos de la PCR, entre otros métodos. Posteriormente, se desarrolló el método de PCR en tiempo real, para el cual no hay

que corroborar la linealidad de la amplificación, es más sensible y requiere sólo de dos o tres horas (Schmittgen, 2001). Esta metodología; sin embargo, no es conveniente para un análisis de gran magnitud como el que implica un transcriptoma. Después de la invención del método Sanger de secuenciamiento se hizo posible conocer la secuencia de nucleótidos que codifican los genes (Sanger *et al.*,1977). La posibilidad de secuenciar DNA llevó a la generación de los llamados ESTs (*Expressed Sequence Tags*), secuencias parciales de clones de cDNA obtenidos por transcripción reversa a partir de mRNA y al primer esfuerzo por secuenciar y perfilar un transcriptoma. Éste se dio en 1991, cuando se generaron ESTs a partir de seiscientos clones de cDNA de tejido cerebral humano (Adams *et al.*,1991) con la finalidad de complementar y facilitar el estudio del genoma humano. El método de secuenciamiento por Sanger involucra el uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs) que terminan la cadena de DNA en cuatro reacciones de secuenciamiento, cada una con un tipo distinto de terminador correspondiente a un tipo de base nitrogenada. Los ddNTP se incorporan en la cadena de manera aleatoria, generándose moléculas de distintos tamaños que pueden ordenarse en un gel de electroforesis para leer la secuencia de DNA.

Estudios a mayor escala fueron posibles con la aparición de los chips de DNA, microarreglos o *microarrays*. Estos constan de una superficie sólida a la cual se adhieren secuencias conocidas de DNA a las que se puede hibridizar cDNA marcado, por ejemplo con fluoróforos, para medir el nivel de expresión genética. Curiosamente, estos microarreglos fueron generados pensando en su utilidad para estudios de genética funcional en plantas y probados en la planta modelo *A. thaliana* (Schena *et al.*,1995). Para 1996, Charles Auffray acuña el término “transcriptoma” (Piétu *et al.*,1999) y, tras la aparición de las tecnologías de NGS (*Next Generation Sequencing*), se llega finalmente a la aparición del método de RNA-seq para evaluar expresión genética. La primera tecnología de NGS consistía en pirosecuenciamiento sobre pequeñas perlas (Margulies *et al* –2005) y es la que luego se conocería como Roche

454. En su artículo, Margulies *et al* fragmentan gDNA y unen moléculas individuales a pequeñas perlas. Luego generan perlas con millones de copias de un mismo fragmento de DNA mediante PCR. Finalmente, denaturan el DNA en las perlas y lo utilizan para el secuenciamiento DNA de hebra simple. El pirosecuenciamiento se vale de la liberación del grupo pirofosfato tras la incorporación de un nucleótido durante la síntesis de DNA. Este se usa para generar ATP (*Adenosine TriPhosphate*) que reaccionará con luciferina, emitiendo luz sí y sólo sí el nucleótido fue incorporado. El secuenciamiento de RNA o RNA-seq fue registrado en la literatura en el 2006, utilizando ESTs (Bainbridge, 2006). Este fue realizado con la tecnología de 454 Life Sciences Corporation, luego Roche. Los beneficios del RNA-seq frente a las metodologías previas son múltiples. Primero, puede secuenciarse todo el transcriptoma sin limitarse a secuencias conocidas, de modo que permite descubrir nuevos transcritos. Además, genera poco ruido en los datos, ya que las secuencias suelen mapearse a posiciones únicas en el genoma; en el caso de los microarreglos, podría haber hibridaciones parciales o entre secuencias con cierto grado de similitud. Finalmente, permite detectar un mayor rango de expresión; desde transcritos con pocas copias hasta otros con un gran número de ellas. En el caso de los microarreglos, hay una menor sensibilidad ante transcritos con bajo nivel de expresión mientras que, si la expresión es muy alta, los *clusters* de DNA pueden saturarse y no se verá diferencia a partir de cierto punto (Zhao *et al.*,2014).

III. Objetivos

General

Identificar genes candidatos de respuesta a temperaturas de congelamiento comparando los genes diferencialmente expresados en una variedad de papa nativa tolerante contra una susceptible.

Específicos

- Obtener las secuencias del transcriptoma de las hojas de la variedad de papa tolerante y susceptible en condiciones de temperatura ambiental y temperatura de congelamiento.
- Determinar los genes diferencialmente expresados en papa en presencia de temperatura ambiente y de congelación.
- Determinar los genes candidatos de tolerancia a temperaturas de congelamiento comparando los genes diferencialmente expresados encontrados en la variedad de papa nativa tolerante y susceptible.

IV. Materiales y Métodos

Material Biológico



Figura 1: Variedad tolerante (izquierda) y susceptible (derecha) después de pasar una hora a 0°C y -4°C¹

Para el presente estudio se utilizaron dos variedades de papa nativa de Huancayo, una tolerante (Sumac Soncco) y una susceptible (Ceccorani) a heladas. Ambas variedades fueron evaluadas previamente por el INIA - Santa Ana en cuanto a tolerancia a heladas así como a su rendimiento como parte del proyecto “Caracterización molecular de germoplasma de papa nativa con vistas a generar variedades tolerantes a heladas”. Se puede observar en la Figura 1 cómo la planta tolerante no muestra daños aparentes, mientras que la susceptible claramente a perdido turgencia y se ve bastante debilitada después de ser sometidas a temperaturas de congelamiento.

¹ El punto de -4°C no es evaluado en esta tesis pero forma parte del proyecto que la engloba.

Debido a que las plantas debían pasar rápidamente de una temperatura a otra, no se tiene un registro gráfico después de únicamente el tratamiento de 0°C.

Las plantas utilizadas en esta tesis crecieron en macetas en un invernadero de la estación INIA – Santa Ana hasta la semana 10 bajo el cuidado de la Dra. Noemí Zúñiga. Se dispuso de tres repeticiones para cada variedad. A continuación se describen algunas características importantes:

Tabla 1: Información general sobre las variedades de papa usadas en el trabajo

	Susceptible	Tolerante
Variedad	Ceccorani	Sumacc Soncco
Género	Solanum	Solanum
Especie	<i>S. stenotomum</i>	<i>S. goniocalyx</i>
País de Origen	Perú	Perú
Altura	3300 – 4000 m.s.n.m.	3300 – 4000 m.s.n.m.

Localización geográfica

Las plantas descritas como material biológico crecieron en la estación de INIA – Santa Ana, la cual se encuentra en Hualaoyo – Saños Grande en el distrito de Tambo, Provincia de Huancayo, Departamento de Junín. A continuación algunos parámetros relevantes respecto al lugar.

Tabla 2: Condiciones geográficas de la estación INIA – Santa Ana.

Información tomada de su página web.

Latitud Sur	12°00'50"
Longitud Oeste	75° 13'11"
Altitud	3,260 m.s.n.m.
Temperatura	6 - 18 °C
Precipitación	800 mm.
Cuenca Hidrográfica	Mantaro

Procedimiento

i. Diseño Experimental y toma de muestras

Se utilizaron dos variedades de papas nativas: Sumac Soncco (Tolerante) y Ceccorani (Susceptible), y tres plantas o repeticiones por variedad. Se tomaron tres hojas de cada planta a temperatura ambiental, en ese momento de 15°C, y luego de exponerlas a 0°C por una hora en oscuridad.

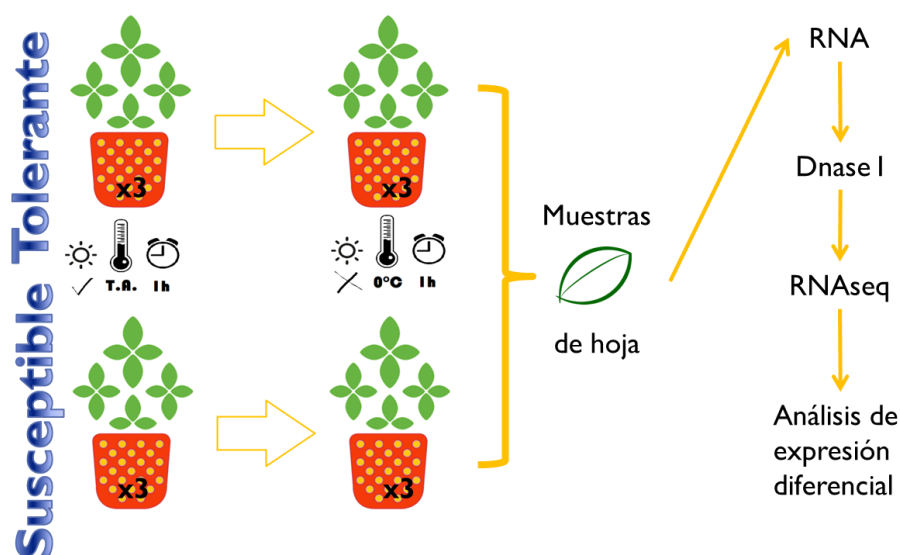


Figura 2: Esquema del diseño experimental. Se utilizaron tres réplicas biológicas. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento 0 o control: luz ambiental, temperatura ambiente (~15°C), 1 hora; Tratamiento 1: oscuridad², 0°C, 1 hora. Se extrajo RNA de muestras de hoja, el cuál fue utilizado para secuenciar el transcriptoma. Posteriormente se realizó el análisis bioinformático.

Las muestras se nombraron según el tratamiento, la variedad de papa y el número de repetición de la siguiente manera: Los dos primeros caracteres corresponden al

² Se realizó el experimento en oscuridad para simular las condiciones de campo de manera más apropiada. Las heladas suelen ocurrir en las madrugadas de las noches despejadas.

tratamiento (T0: 15°C, T1: 0°C), el tercer carácter corresponde a la variedad (R: tolerante, S: susceptible) y el último carácter corresponde al número de repetición (1, 2 ó 3). Por ejemplo, T0R1 corresponde a la repetición número uno del control a 15°C. de la variedad de papa tolerante.

Para la toma de muestra se utilizaron guantes, pinzas y tijeras para minimizar el efecto del calor de las manos en la temperatura de las hojas. Se tomaron hojas jóvenes, hacia la parte interna de las ramas y no las que estaban en los extremos ya que éstas podrían estar maltratadas. Tras ser cortadas, las hojas fueron introducidas a tubos de centrifuga estériles de 15mL marca Corning® previamente rotulados y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras fueron transportadas al laboratorio de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima).

ii. Extracción de RNA y secuenciamiento

El RNA total se extrajo a partir de las hojas utilizando TRIzol (Ambion, <https://www.thermofisher.com>) según las especificaciones del fabricante y se resuspendió en agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). TRIzol es un reactivo que viene preparado y listo para usar y que corresponde al método de extracción de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo en medio ácido (AGPC).

El tiocianato de guanidinio en el reactivo TRIzol permite la denaturación de las proteínas, entre ellas las ribonucleasas endógenas; mientras que el fenol saturado con agua permite la separación de fases tras añadir cloroformo. En un pH ácido, el RNA se mantiene en la fase acuosa mientras que el DNA, en la interfase y las proteínas, en la fase orgánica (Rio *et al.*,2010a, Chomczynski &

Sacchi, 2006; Chomczynski & Sacchi, 1987). DEPC modifica covalentemente las RNAsas, inactivándolas.

Tras la extracción, se midió la concentración de RNA obtenida utilizando espectrofotometría y se verificó la calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (90V por 30 min aprox.). Ya que el método de TRIzol no es eficiente removiendo fragmentos pequeños de DNA (Rio *et al.*,2010b), se eliminó cualquier DNA que pudiese estar presente utilizando el kit DNA-free™ (Ambion, <https://www.thermofisher.com>) según lo indicado por el fabricante y se corroboró que no hubiese restos de DNA mediante electroforesis y PCR con cebadores universales para plantas para un gen de rRNA. Se prepararon alícuotas de 50uL a 60ng/uL de las muestras de RNA para poder enviarlas a secuenciar.

El secuenciamiento del RNA fue realizado a través de un servicio por el laboratorio “Microarray Clinical Core” de la UCLA, a donde se enviaron las muestras en hielo seco para evitar degradación. El proveedor del servicio realizó también una purificación en columna para remover posibles contaminantes como las sales que suelen quedar de forma típica por el uso de TRIzol. Las bibliotecas de cDNA fueron preparadas con KAPA Stranded mRNASeq Kit (Illumina® platform) y secuenciadas en un aparato Illumina Nextseq500 a 1x75bp.

Para el análisis bioinformático se descargó la información al servidor de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual corre bajo el sistema operativo LINUX, distribución Ubuntu versión 14.04. El procesamiento bioinformático se hizo a través de línea de comandos.

Resumen del análisis bioinformático

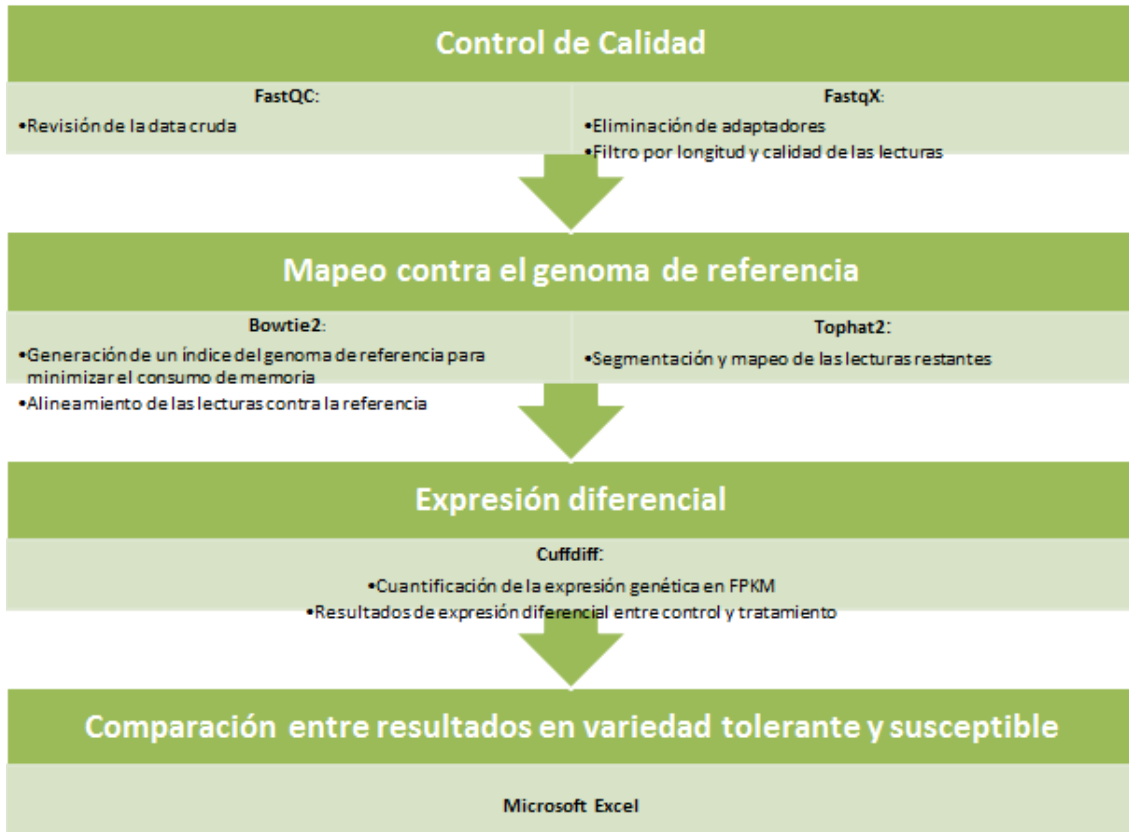


Figura 3: Resumen del procedimiento bioinformático. Se realiza un control de calidad previo en el cual se verifica la calidad de las secuencias, la calidad por base, la longitud de las lecturas, el contenido de GC, la presencia de adaptadores, entre otros parámetros. Dependiendo de lo encontrado, se realiza una “limpieza” de la data cruda y se procede con el análisis. Primero se utiliza Bowtie2 y Tophat2 para mapear las lecturas de cada réplica biológica. Posteriormente se utiliza cuffdiff para cuantificar la expresión y hallar los genes diferencialmente expresados entre ambas condiciones.

Para el control de calidad de las lecturas obtenidas se utilizó el programa de FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, por Babraham Bioinformatics), de libre acceso, en todas las bibliotecas a través del siguiente comando:

```
$ fastqc <NOMBRE DE LA LIBRERÍA>
```

Dicho programa permite corroborar la calidad de las secuencias obtenidas a partir de varias plataformas, entre ellas Illumina. Entre los parámetros que muestra se encuentran la calidad de secuencia, la calidad de secuencia por

base, la distribución de la longitud de las secuencias, secuencias sobrerrepresentadas, entre otros. Tras ver los resultados se filtraron las lecturas con longitud menor a 50bp y aquellas lecturas con una calidad menor a 25 en más del 50% de sus bases con el siguiente comando:

```
$ fastq_quality_filter -q 25 -p 50 -i <NOMBRE DE LA LIBRERÍA>
```

También se retiraron las secuencias de adaptadores y colas poliA que aún quedaban del siguiente modo:

```
$ fastx_clipper -a <SECUENCIA A REMOVER> -l 50 -o <NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA> <NOMBRE DE LA LIBRERÍA>
```

Esto se hizo con el paquete de herramientas FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/, por Hannon Lab).

iii. Análisis de expresión diferencial

Para el análisis se utilizó como guía el protocolo de Trapnell *et al* (2012) y se descargaron los archivos PGSC_DM_v4.03_pseudomolecules.fasta, que corresponde al genoma de referencia, y PGSC_DM_V403_genes.gff, que corresponde a anotaciones del transcriptoma. La descarga se hizo a partir de la web del Consorcio de Secuenciamiento del Genoma de la Papa (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml).

Antes de mapear las secuencias al genoma de referencia, se generó el índice del genoma y del transcriptoma utilizando Bowtie2 versión 2.2.3 (Langmead *et al.*,2012) y TopHat2 versión 2.0.12 (Kim *et al.*,2013) del siguiente modo:

```
$ bowtie2-build <GENOMA DE REFERENCIA> <NOMBRE DEL ÍNDICE DEL  
GENOMA>
```

```
$ tophat2 -G <ANOTACIONES DEL TRANSCRIPTOMA> --transcriptome-  
index=<NOMBRE DEL ÍNDICE DE LAS ANOTACIONES> <NOMBRE DEL ÍNDICE  
DEL GENOMA>
```

Posteriormente, se mapearon las lecturas utilizando Tophat2. Éste programa permite alinear las secuencias de los transcritos al genoma de referencia y a las anotaciones que estén disponibles. Alinea primero las lecturas completas llamando a Bowtie2 y luego segmenta las que restan en búsqueda de un sitio de splicing. En primera instancia, el alineamiento se hace contra las anotaciones del transcriptoma. Posteriormente, aquellas lecturas que no mapearon o lo hicieron pobremente y podrían estar mal ubicados, se alinean de nuevo pero contra el genoma. Finalmente, el programa toma las lecturas restantes y las segmenta para buscar nuevos sitios de splicing (Kim *et al.*,2013). El comando utilizado se muestra a continuación:

```
$ tophat2 -p 6 -i 10 -I 15000 -read-realign-edit-dist 0 -  
microexon-search -min-segment-intron 10 -max-segment-intron  
15000 -transcriptome-index=<NOMBRE DEL ÍNDICE DE LAS  
ANOTACIONES> -o < NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA> <NOMBRE DEL  
ÍNDICE DEL GENOMA> <NOMBRE DE LA LIBRERÍA>
```

Una vez obtenidos los archivos con extensión .bam a partir de tophat2, se procedió con el análisis de expresión diferencial con Cuffdiff versión 2.2.1. Cuffdiff calcula la abundancia de relativa de los transcritos de cada gen como FPKM (Fragmentos por Kilobase de exón por Millón de fragmentos mapeados)

y la significancia estadística de sus cambios entre distintas muestras (Trapnell *et al.*,2010). Los valores de FPKM representan el número de fragmentos que alinearon contra cada gen normalizado por la longitud del gen sin contar los intrones y por el número total de fragmentos mapeados. El comando utilizado en el caso de la variedad tolerante fue el siguiente:

```
$ Cuffdiff -p 7 -o <NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA> -u -b <GENOMA DE REFERENCIA> -L T0R,T1R <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 variedad susceptible, se cambiaron las etiquetas en la opción “-L” a “T0S, T1S”.

El programa Cuffdiff generó varios archivos, de los cuales el archivo de texto “gene_exp.diff” se importó a un libro de Microsoft Excel (2010). En dicho programa se filtraron aquellas entradas determinadas por el programa como significativas, aquellas con un FDR de 0.05. En experimentos donde hay comparaciones múltiples, los *p-values* son un indicador inapropiado de significancia estadística ya que no toma en cuenta el número de pruebas que en este caso sería equivalente al número de genes evaluados. El FDR o *False Discovery Rate* es una forma de ajustar los *p-values* en base al número de pruebas realizadas (Noble, 2009). El cambio en el nivel de expresión genética está medido como el logaritmo en base 2 de la razón entre los valores de FPKM entre ambas condiciones. Finalmente, se generaron los gráficos y tablas presentados en la sección de resultados y anexos. Los genes

sobrerrepresentados en el control en comparación con el tratamiento serán interpretados de ahora en adelante como reprimidos y los sobrerrepresentados en el tratamiento sobre el control, como inducidos.

V. Resultados:

i. Extracción de RNA y secuenciamiento

La extracción de RNA con el método de TRIzol fue exitosa, se obtuvo RNA de buena calidad y en concentración suficiente, ya que se nos solicitó un mínimo de 1-5ug de RNA a una concentración de al menos 50ng/uL para el servicio de secuenciamiento. Esto indica que la metodología es efectiva para la extracción de RNA de hojas de papa, además de ser rápida, ya que tomó un solo día. La calidad y cantidad de RNA extraído se puede observar en el gel de la Figura 4, donde las bandas de las subunidades ribosomales 25S, 18S y 5S se ven definidas e intensas; así como en la Tabla 3, donde los valores de la relación A260/A280 son cercanos a 2 y la concentración de RNA se encuentra indicada.

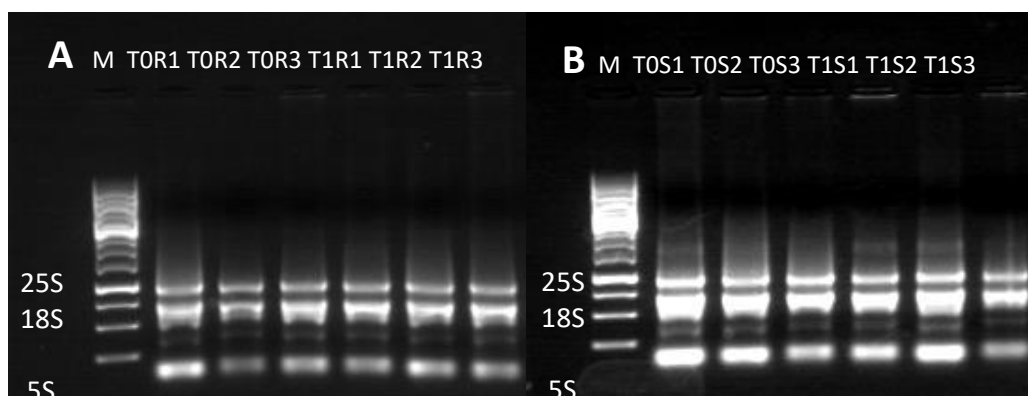


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de RNA. (M: marcador de 1kb) En ambos geles se pueden observar las subunidades ribosomales cerca de las bandas de 500bp y 750bp.

Tabla 3: Calidad y cantidad de RNA por muestra a partir de espectrofotometría.

Muestra	ng/uL	A260/A280
T0S1	980.2	2.04
T0S2	860.7	2.05
T0S3	612.6	2.04
T1S1	495.5	1.96
T1S2	890.3	2.03
T1S3	342.7	1.98
T0R1	419.7	2.08
T0R2	916.2	1.94
T0R3	672.3	2.01
T1R1	585.7	2.07
T1R2	749.1	2.05
T1R3	584.2	2.05

Las muestras fueron tratadas con DNA-free™ DNA Removal Kit de Thermo Fisher Scientific como medida de precaución a pesar de que no se obtuvieron bandas pesadas que indicaran presencia de DNA genómico. La ausencia de DNA se confirmó mediante una PCR para un gen de rRNA utilizando adaptadores universales para plantas.

Las muestras fueron diluidas a 60ng/uL en agua tratada con DEPC y enviadas en hielo seco al proveedor del servicio de secuenciamiento, el cual confirmó su llegada en buenas condiciones antes de proceder con el servicio. Las lecturas recibidas fueron analizadas con fastqc para el control de calidad y se encontró una calidad por base mayor a 30 en el puntaje Phred exceptuando la librería T0S2, en la cual las últimas bases llegaron cerca de 26 (Figura 5). La

longitud de las lecturas mostraba un pico marcado en 75bp, habiendo muy pocas lecturas con menor longitud como se ve en la Figura 6.

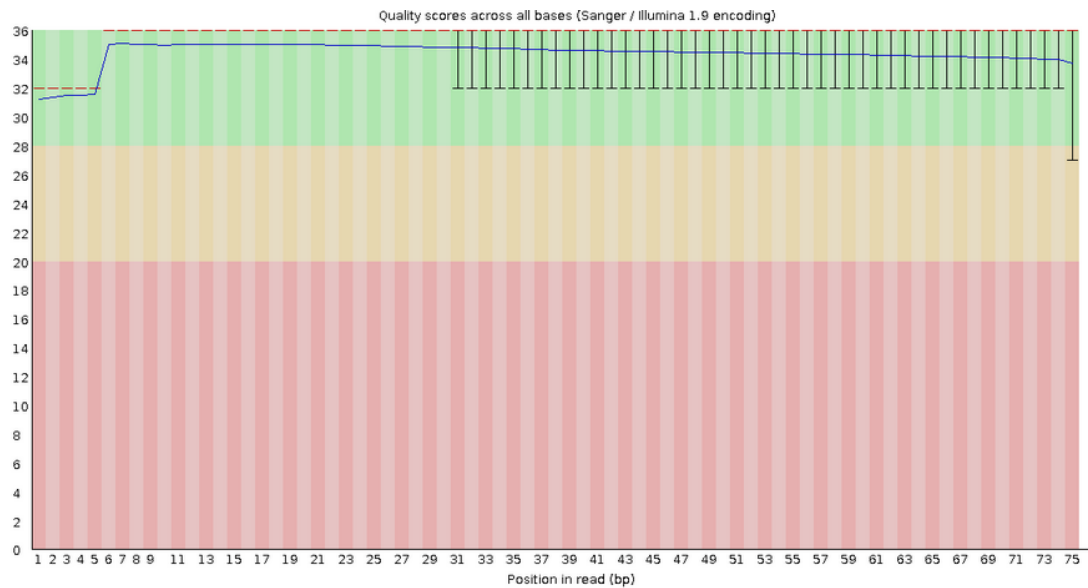


Figura 5: Gráfico de la calidad por base de las lecturas de la muestra T0S2. En el eje X se encuentra la posición en pares de bases y en el eje Y, la calidad en puntaje Phred. En la base número 75 se observa el puntaje Phred mínimo el cual estuvo entre 26 y 28.

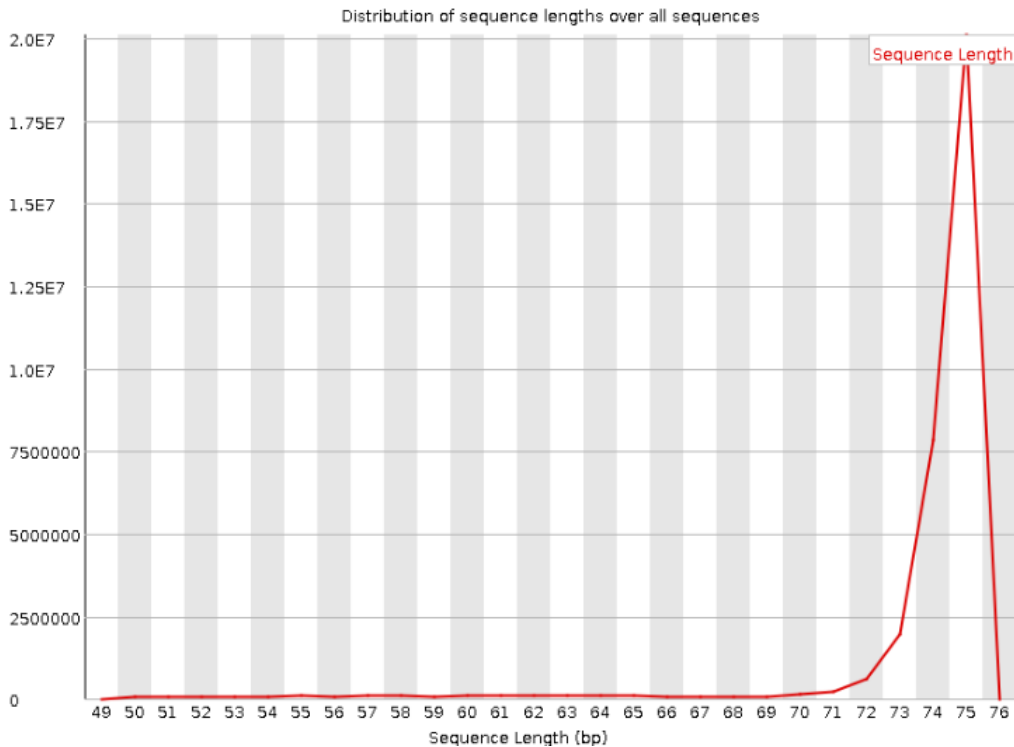


Figura 6: Distribución de la longitud de las secuencias. El eje Y es el número de secuencias que hay con la longitud indicada en el eje X. Claramente se ve que las secuencias menores a 70bp son cercanas a cero y que la mayor parte mide 75bp.

Tras verificar la calidad de las lecturas se filtraron las secuencias entre 50bp y 75bp. Se eligió cortar en 50bp porque, según el manual de bowtie2, éste es más rápido, sensible y consume menos memoria para longitudes mayores a 50bp, mientras que para lecturas más cortas, se recomienda bowtie1.

ii. Análisis de expresión diferencial

Como se puede observar en la Tabla 4, el total de lecturas varió entre 28 y 34 millones. El porcentaje de lecturas mapeadas se encontró entre 86% y 90% con 9.4% a 14% de no mapeadas. Por otro lado, los alineamientos múltiples variaron entre 6% y 10% y los únicos entre 77.5% a 82.7%.

Tabla 4: Resumen de los resultados de Tophat2. Se muestran el número total de lecturas en las librerías utilizadas, el porcentaje de lecturas mapeadas y no mapeadas y el porcentaje de alineamientos únicos y múltiples.

Librería	Número inicial de lecturas	Lecturas mapeadas	Lecturas no mapeadas	Alineamientos múltiples	Alineamientos únicos
TOR1	33317984	90.2%	9.8%	9.0%	81.2%
TOR2	30484028	88.6%	11.4%	7.0%	81.6%
TOR3	34002887	89.9%	10.1%	8.5%	81.4%
TOS1	28311328	89.2%	10.8%	7.1%	82.1%
TOS2	28301751	88.7%	11.3%	7.9%	80.8%
TOS3	32370728	89.6%	10.4%	9.4%	80.2%
T1R1	30701296	90.6%	9.4%	9.9%	80.7%
T1R2	34178176	89.0%	11.0%	10.3%	78.7%
T1R3	31843497	86.0%	14.0%	8.5%	77.5%
T1S1	30012206	88.8%	11.2%	6.8%	82.0%
T1S2	31110886	89.4%	10.6%	7.1%	82.3%
T1S3	30173306	89.4%	10.6%	6.7%	82.7%

Tras el mapeo de las lecturas, se procedió con la cuantificación y el análisis de expresión diferencial utilizando el programa Cuffdiff. Los valores de expresión entre las repeticiones se compararon con una regresión lineal. En la Tabla 5 se pueden observar los valores de R^2 para cada par de librerías.

Tabla 5: Valores de R^2 a partir de una regresión lineal simple entre las repeticiones biológicas. En la primera columna, las repeticiones comparadas; en la primera fila, la condición y variedad a la que corresponden.

	TOR	T1R	TOS	T1S
1 vs. 2	0,71	0,91	0,80	0,89
1 vs. 3	0,93	0,83	0,89	0,81
2 vs. 3	0,79	0,79	0,63	0,94

Tras filtrar los genes expresados diferencialmente, se obtuvieron los valores mostrados en la Figura 7, donde se observa que en la variedad tolerante se ha

detectado una cantidad menor de genes modulados en comparación con la variedad susceptible y que la variedad tolerante parece inducir más genes de los que reprime, mientras que en la variedad susceptible ocurre lo contrario.



Figura 7: Número de genes expresados diferencialmente entre el control (T.A.) y el tratamiento (1h a 0°C). El conjunto azul representa la variedad tolerante mientras que el conjunto rojo, la susceptible. Se distingue entre genes inducidos (↑), reprimidos (↓) y aquellos regulados de forma inversa entre las variedades (↕).

De los genes filtrados para realizar la Figura 6, se revisaron aquellos que no estaban compartidos o que lo estaban pero variaban en direcciones opuestas. Una notoria diferencia es la que puede observarse en cuanto al número de genes modulados en ambas variedades. Claramente, la variedad susceptible presenta un número mayor.

Los genes de mayor interés se encontrarían entre aquellos inducidos de forma única por la variedad tolerante y aquellos compartidos entre ambos transcriptomas pero con cambios en direcciones opuestas. Estos se presentan a continuación:

Tabla 6: Resultados del análisis de expresión diferencial mediante cufflinks. La tabla a continuación presenta las entradas correspondientes a los genes expresados diferencialmente en la variedad tolerante y cuyo cambio de expresión de control a tratamiento fue positivo. Los rótulos de las columnas corresponden a el código del gen según el genoma de referencia (ID), el nombre o descripción de su producto (Gen), su ubicación en el genoma de referencia (locus), los valores de expresión para cada condición en FPKM (FPKM Control, FPKM 0°C) y el cambio de expresión entre ambas condiciones definido como el logaritmo en base dos del cociente del valor de expresión en el tratamiento entre el del control. *Las entradas para las cuales la columna "Gen" correspondía a función desconocida fueron omitidas.

ID	Gen	locus	FPKM Control	FPKM 0°C	log2(fold_change)
PGSC0003DMG400000271	Monoxygenase	ST4.03ch12:3474351-3474861	0,00	1,49	inf
PGSC0003DMG400011223	Auxin-induced protein 5NG4	ST4.03ch07:1625534-1629813	0,00	0,43	inf
PGSC0003DMG400011879	Protein kinase	ST4.03ch06:43874995-43875592	0,00	0,49	inf
PGSC0003DMG400015557	ZPT2-13	ST4.03ch11:45238064-45238765	0,00	15,49	inf
PGSC0003DMG400030672	By genscan and genefinder	ST4.03ch02:41738777-41739340	0,00	0,47	inf
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2	ST4.03ch03:42082417-42084141	0,21	17,19	6,33
PGSC0003DMG400045603	Regulator of gene silencing	ST4.03ch11:43226158-43226710	0,63	36,78	5,86
PGSC0003DMG400009116	Membrane receptor 1	ST4.03ch03:45157566-45160096	0,17	6,00	5,14
PGSC0003DMG400008181	UDP-glucose:glucosyltransferase	ST4.03ch10:58633793-58636524	0,05	1,15	4,43
PGSC0003DMG400007376	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch08:40812187-40813595	0,24	3,17	3,75
PGSC0003DMG400017936	Late embryogenesis abundant protein 5	ST4.03ch06:461907-463086	58,78	590,51	3,33
PGSC0003DMG400017757	Arabinogalactan-protein	ST4.03ch12:55471255-55471864	2,49	19,75	2,99
PGSC0003DMG402026177	MYB domain class transcription factor	ST4.03ch07:47962765-47963967	0,44	3,31	2,91
PGSC0003DMG400006309	DC1 domain containing protein	ST4.03ch01:66729394-66730795	0,43	2,91	2,77
PGSC0003DMG400032273	N-acetyltransferase	ST4.03ch09:53949142-53950050	3,06	20,66	2,75
PGSC0003DMG400009021	Gibberellin 2-oxidase	ST4.03ch01:62991491-62994946	1,92	12,90	2,75
PGSC0003DMG400025824	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase family protein	ST4.03ch01:84981239-84982672	0,52	3,41	2,72
PGSC0003DMG401030312	ZPT2-12	ST4.03ch06:56383259-56384106	2,78	18,16	2,71
PGSC0003DMG400002507	Zinc finger protein	ST4.03ch03:60766504-60768866	4,44	28,62	2,69

PGSC0003DMG400032555	NAC domain protein	ST4.03ch04:5045169-5047136	14,61	93,69	2,68
PGSC0003DMG400016794	ATP binding protein	ST4.03ch05:46354697-46357474	0,18	1,01	2,52
PGSC0003DMG401003156	Glycosyltransferase, CAZy family GT2	ST4.03ch03:47090593-47096240	2,46	13,85	2,49
PGSC0003DMG402025869	C2 domain-containing protein	ST4.03ch01:84134533-84137749	0,89	4,99	2,48
PGSC0003DMG400001181	ACI19	ST4.03ch02:24696171-24698146	1,73	9,50	2,46
PGSC0003DMG401029843	Glucosyltransferase	ST4.03ch10:57905392-57906481	3,18	15,45	2,28
PGSC0003DMG400028235	Hin1	ST4.03ch10:56086449-56087352	1,86	8,99	2,27
PGSC0003DMG400030309	Auxin-regulated protein	ST4.03ch06:56329702-56332793	1,26	6,04	2,27
PGSC0003DMG400032272	N-acetyltransferase	ST4.03ch09:53954402-53955427	6,63	30,22	2,19
PGSC0003DMG400004860	Auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase	ST4.03ch06:48515587-48517771	5,10	21,67	2,09
PGSC0003DMG400031105	Hydroxyproline-rich glycoprotein GAS31	ST4.03ch07:51495374-51495939	1,98	8,41	2,08
PGSC0003DMG400031795	DNA binding protein homolog	ST4.03ch09:52914832-52916048	2,08	8,81	2,08
PGSC0003DMG400003568	Cellular nucleic acid binding protein	ST4.03ch02:39304867-39306068	1,13	4,75	2,06
PGSC0003DMG400043507	Cation-transporting atpase plant	ST4.03ch09:54687819-54691521	0,62	2,57	2,06
PGSC0003DMG400028185	Metal ion binding protein	ST4.03ch10:55143455-55145580	1,15	4,74	2,04
PGSC0003DMG400030698	Stress induced protein	ST4.03ch07:3073428-3074422	12,03	49,49	2,04
PGSC0003DMG400030364	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 284	ST4.03ch06:57298364-57300540	7,24	29,59	2,03
PGSC0003DMG400017330	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch07:50748548-50751266	2,89	11,27	1,97
PGSC0003DMG400031140	WRKY transcription factor	ST4.03ch04:61579492-61582536	78,44	299,60	1,93
PGSC0003DMG400005401	Sigma factor binding protein 1	ST4.03ch01:74238225-74239303	10,00	37,42	1,90
PGSC0003DMG400021114	Ethylene-responsive nuclear protein	ST4.03ch02:29155285-29156725	3,73	13,75	1,88
PGSC0003DMG400003227	SAUR family protein	ST4.03ch03:46106672-46107360	2,95	10,29	1,80
PGSC0003DMG400013488	F-box/kelch protein	ST4.03ch05:9111928-9113418	14,57	49,55	1,77
PGSC0003DMG401007388	MRNA, 1346 bp sequence	ST4.03ch08:40843263-40845641	23,61	80,20	1,76
PGSC0003DMG400017969	Hcr2-0A	ST4.03ch05:10959336-10962640	1,14	3,84	1,75
PGSC0003DMG400007886	Glycerol-3-phosphate transporter / glycerol 3-phosphate permease, putative	ST4.03ch12:1938324-1940948	3,54	11,84	1,74
PGSC0003DMG400000512	Stress-associated protein 11	ST4.03ch02:46764281-46765379	6,07	19,99	1,72

PGSC0003DMG400026671	Arginine decarboxylase	ST4.03ch10:45943836-45946623	25,90	83,57	1,69
PGSC0003DMG400010022	Patatin 3	ST4.03ch02:44264699-44266770	13,37	42,22	1,66
PGSC0003DMG400030608	Calcium-binding protein CML24	ST4.03ch02:41899335-41900585	13,69	42,52	1,63
PGSC0003DMG400013022	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type	ST4.03ch02:22746238-22752186	50,22	155,87	1,63
PGSC0003DMG400022894	Lipoxygenase	ST4.03ch03:61547720-61552116	31,89	98,71	1,63
PGSC0003DMG400021902	Squamosa promoter-binding protein	ST4.03ch05:15021022-15024830	4,54	14,00	1,63
PGSC0003DMG400024260	Receptor protein kinase zmpk1	ST4.03ch09:1235024-1237340	1,63	5,02	1,62
PGSC0003DMG400032231	NDR1	ST4.03ch01:1783476-1784286	4,68	14,30	1,61
PGSC0003DMG400027468	Leucine-rich repeat family protein	ST4.03ch07:1876212-1878372	3,67	11,18	1,61
PGSC0003DMG400003084	Two-component response regulator ARR8	ST4.03ch02:30408572-30409907	5,26	15,94	1,60
PGSC0003DMG400002586	Harpin-induced 1	ST4.03ch03:61009617-61010762	6,35	19,12	1,59
PGSC0003DMG400017318	Receptor-like kinase	ST4.03ch07:50522047-50523761	3,10	9,17	1,57
PGSC0003DMG400009955	Syringolide-induced protein 14-1-1	ST4.03ch04:71212535-71216633	13,03	38,07	1,55
PGSC0003DMG400026127	Beta-ketoacyl-coa synthase family protein	ST4.03ch06:46282143-46284653	18,42	53,51	1,54
PGSC0003DMG400027469	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch07:1880274-1882369	2,99	8,48	1,50
PGSC0003DMG402007388	MRNA, 1346 bp sequence	ST4.03ch08:40843263-40845641	22,73	64,12	1,50
PGSC0003DMG400027185	Hydrolase	ST4.03ch05:48026478-48029383	10,87	30,04	1,47
PGSC0003DMG400029207	WRKY transcription factor 6	ST4.03ch09:18826013-18827752	169,72	466,60	1,46
PGSC0003DMG400017278	Receptor-like kinase	ST4.03ch07:50526967-50529430	1,73	4,75	1,45
PGSC0003DMG400007073	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	ST4.03ch07:52583926-52585110	66,55	177,02	1,41
PGSC0003DMG400030220	Protein cbxX, chromosomal	ST4.03ch07:24666249-24671213	17,68	46,56	1,40
PGSC0003DMG400021574	21kD protein	ST4.03ch06:36214131-36214889	55,61	146,30	1,40
PGSC0003DMG400022633	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch05:6582961-6585423	8,60	22,19	1,37
PGSC0003DMG400014791	Jumonji domain protein	ST4.03ch08:49030410-49037507	3,06	7,83	1,36
PGSC0003DMG400003126	AG-motif binding protein-4	ST4.03ch01:86628052-86629634	49,11	125,47	1,35
PGSC0003DMG400013886	S-locus-specific glycoprotein S6	ST4.03ch02:35334568-35338691	9,13	23,25	1,35
PGSC0003DMG402007101	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	ST4.03ch07:52574590-52575762	5,98	15,19	1,34
PGSC0003DMG400024749	Rapid alkalization factor 2	ST4.03ch01:77289603-77290378	52,58	133,09	1,34

PGSC0003DMG400010283	Class I chitinase	ST4.03ch10:38265410-38265939	85,57	215,28	1,33
PGSC0003DMG400020493	Calcineurin B 1	ST4.03ch08:1062934-1068924	7,20	17,91	1,32
PGSC0003DMG400020271	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch02:47680487-47682817	5,19	12,81	1,30
PGSC0003DMG400024661	Brassinosteroid LRR receptor kinase	ST4.03ch03:55544742-55548544	1,31	3,22	1,30
PGSC0003DMG400026359	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	ST4.03ch11:40395335-40400616	7,75	19,03	1,30
PGSC0003DMG400025621	NDR1	ST4.03ch12:8317834-8323884	9,78	23,74	1,28
PGSC0003DMG400017307	ATFP4	ST4.03ch07:51299263-51300184	106,90	259,16	1,28
PGSC0003DMG400008386	ATELC	ST4.03ch10:53314592-53316544	11,29	27,18	1,27
PGSC0003DMG400004766	GEM 5	ST4.03ch08:52156991-52159082	36,35	87,18	1,26
PGSC0003DMG400025755	RING-H2 finger protein	ST4.03ch01:83778166-83782991	9,58	22,91	1,26
PGSC0003DMG400015492	ATP binding protein	ST4.03ch02:20796594-20799252	4,42	10,58	1,26
PGSC0003DMG400018942	Autoinhibited calcium ATPase	ST4.03ch09:54679958-54683244	4,10	9,81	1,26
PGSC0003DMG400001662	Arginine decarboxylase	ST4.03ch01:86846483-86849599	41,26	98,12	1,25
PGSC0003DMG400001853	NAK-type protein kinase	ST4.03ch08:50627141-50631771	21,28	50,49	1,25
PGSC0003DMG400031235	Protein kinase atsik	ST4.03ch10:48876365-48880609	13,80	32,57	1,24
PGSC0003DMG400025185	AT14A	ST4.03ch01:85652530-85654965	8,27	19,43	1,23
PGSC0003DMG400019398	Ubiquitin carrier protein	ST4.03ch10:5990806-5995117	71,20	163,26	1,20
PGSC0003DMG400028611	Peroxisomal membrane protein pmp34	ST4.03ch01:76509974-76514536	10,83	24,75	1,19
PGSC0003DMG402017902	Boron transporter	ST4.03ch01:35475706-35480057	12,74	28,89	1,18
PGSC0003DMG400033037	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	ST4.03ch06:51874727-51876278	114,93	259,56	1,18
PGSC0003DMG400014607	Aspartyl protease family protein	ST4.03ch05:45880234-45881822	24,36	54,57	1,16
PGSC0003DMG400010049	Transferase, transferring glycosyl groups	ST4.03ch02:45018469-45021749	12,65	28,33	1,16
PGSC0003DMG400012848	AO (L-ASPARTATE OXIDASE)	ST4.03ch12:9517640-9524111	6,73	15,03	1,16
PGSC0003DMG400000067	Late embryogenesis (Lea)	ST4.03ch01:72741380-72743035	34,82	76,65	1,14
PGSC0003DMG400016908	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch10:45023955-45025618	22,99	50,26	1,13
PGSC0003DMG400006217	C2 domain-containing protein	ST4.03ch10:42108079-42111048	30,97	67,03	1,11
PGSC0003DMG400019677	Elongation factor 1-alpha	ST4.03ch11:42006168-42008992	41,30	89,04	1,11
PGSC0003DMG400031079	Nodulin family protein	ST4.03ch11:3864017-3865958	41,97	90,39	1,11

PGSC0003DMG400021213	Argonaute protein group	ST4.03ch02:28396110-28402652	23,00	48,11	1,06
PGSC0003DMG400028462	ACRE 276	ST4.03ch02:31447686-31450302	17,55	36,08	1,04
PGSC0003DMG400029885	Kinase	ST4.03ch09:19231300-19235001	33,16	68,15	1,04
PGSC0003DMG400003040	Osmotin	ST4.03ch08:54278327-54279066	147,23	300,88	1,03

Tabla 7: La tabla a continuación presenta las entradas correspondientes a los genes expresados diferencialmente en ambas variedades pero cuyo cambio de expresión de control a tratamiento ocurrió en direcciones opuestas. Los rótulos de las columnas son iguales a aquellos en la Tabla 6. *Las entradas para las cuales la columna “Gen” correspondía a función desconocida fueron omitidas.

ID	Gen	locus	Variedad Tolerante			Variedad susceptible		
			FPKM Control	FPKM 0°C	log2 (fold_change)	FPKM Control	FPKM 0°C	log2 (fold_change)
PGSC0003DMG400021265	BCS1 protein	ST4.03ch10:2347928-2349623	7,88	23,81	1,60	10,16	4,36	-1,22
PGSC0003DMG400008801	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	ST4.03ch12:25639911-25643687	8,44	19,31	1,19	25,19	4,32	-2,55
PGSC0003DMG400028632	Flavonoid glucosyltransferase UGT73E2	ST4.03ch12:49623829-49625982	2,65	8,65	1,71	22,79	4,80	-2,25
PGSC0003DMG400019956	Glutathione s-transferase	ST4.03ch12:47549030-47550979	4,06	16,77	2,04	6,32	0,54	-3,55
PGSC0003DMG402010883	MYB transcription factor MYB139	ST4.03ch06:5965435-5966610	46,50	18,88	-1,30	4,65	23,20	2,32
PGSC0003DMG400001448	UDP-glucose dehydrogenase 2	ST4.03ch02:45703123-45706234	31,40	62,28	0,99	56,42	26,14	-1,11

Entre los genes diferencialmente expresados se encontró miembros de la vía dependiente de CBF. En la variedad de papa tolerante, el factor de transcripción CBF2 (PGSC0003DMG400014309) cambiaba de forma positiva y, de modo similar, en la variedad susceptible incrementaba la expresión de CBF4 (PGSC0003DMG400014307). La variedad susceptible mostró cambios en la expresión de genes descritos como factores de transcripción tipo bHLH (inducidos: 3; reprimidos: 2) y MYC (reprimidos: 1), que podrían relacionarse también con la vía dependiente de CBF. Del mismo modo, también se observaron cambios en factores de transcripción tipo MYB (inducidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG402026177; inducidos en la variedad susceptible: 6; reprimidos en la variedad susceptible: 4; pertenecientes a la Tabla 7: PGSC0003DMG402010883), relacionados también a la vía dependiente de CBF como también a la síntesis de flavonoides y antocianinas.

Excluyendo los factores MYB mencionados, se encontraron regulados otros genes relacionados a la síntesis de flavonoides y antocianinas. Uno de ellos inducido en la variedad tolerante y reprimido en la susceptible (PGSC0003DMG400028632), otro reprimido en la variedad tolerante (PGSC0003DMG400008632), un tercero inducido en la variedad susceptible y 22 reprimidos en la misma.

Otro tipo de genes que se hallaron modulados fueron aquellos relacionados al metabolismo de hormonas como auxinas y giberelinas. De las últimas se encontró una giberelina-2-oxidasa (GA2ox) incrementando su expresión en la variedad tolerante (PGSC0003DMG400009021). Por otro lado, 3 genes codificantes para receptores GID1 (*Gibberellin-Insensitive Dwarf*) se encontraron disminuyendo su expresión en la variedad susceptible. Con

relación a los genes involucrados con la regulación de auxinas se encontró que varios correspondientes a proteínas inducidas por auxinas mostraban cambios. Estos tanto incrementaban (PGSC0003DMG400011223, PGSC0003DMG400030309, PGSC0003DMG400004860, PGSC0003DMG400003227) como disminuían (PGSC0003DMG400001655) su expresión en la variedad tolerante. Igualmente en la variedad susceptible 10 incrementaban su expresión y 5 la disminuían. También se encontraron factores de transcripción de la familia NAC incrementando su expresión en ambas variedades (tolerante: PGSC0003DMG400032555; susceptible: 6), y 4 disminuyendo sólo en la variedad susceptible. Estos factores de transcripción median la señalización por auxinas. Otros genes relacionados a auxinas que mostraron cambios fueron las glicosiltransferasas, que se hallaron incrementando su expresión en ambas variedades (tolerante: PGSC0003DMG400008181, PGSC0003DMG401003156, PGSC0003DMG401029843, PGSC0003DMG400010049; susceptible: 12) mas también se hallaron 29 disminuyendo en la variedad susceptible. Éstas se encuentran involucradas, entre otras funciones, en el metabolismo de carbohidratos, la formación de conjugados de auxina y de antocianinas.

Factores de transcripción tipo dedos de zinc se hallaron, de igual forma, modulados en ambas variedades de papa. De manera específica, se observó que genes para proteínas ZPT2-13 (inducido en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400015557; inducido en la variedad susceptible: 2) y WRKYs (inducidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400031140, PGSC0003DMG400029207; inducidos en la variedad susceptible: 6; reprimidos en la variedad susceptible: 2) mostraron cambios. Otros genes

correspondientes a proteínas con dedos de zinc también se encontraron modulados (inducidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400002507; inducidos en la variedad susceptible: 14; reprimidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG402012192; reprimidos en la variedad susceptible: 29).

Otros genes de interés fueron los codificantes para arginina decarboxilasa (inducidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400026671, PGSC0003DMG400001662), osmotina (inducidos en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400003040; reprimidos en la variedad susceptible: 3) y LEA (inducido en la variedad tolerante: PGSC0003DMG400000067). Del mismo modo, se observaron cambios en relacionados al balance redox. En la variedad tolerante se observó uno para glutatión s-transferasa que era también reprimido en la susceptible (PGSC0003DMG400019956), en la cual se reprimían dos genes más. En la variedad susceptible se encontraron también aquellos codificantes para glutaredoxinas (inducidos: 2; reprimidos: 5), tioredoxinas (inducidos: 1; reprimidos: 1) y oxidoreductasas (inducidos: 4; reprimidos: 2).

VI. Discusión:

Para el diseño experimental, se decidió simular en la medida de lo posible las condiciones de una helada en campo. Las más comunes y dañinas son las que ocurren por radiación y se dan durante las noches despejadas y con poco viento. Es por ello que para la toma de muestras, el control estuvo a la temperatura y luz ambiental del día y el tratamiento contempló someter a las plantas no solo a temperaturas de congelamiento, sino también a oscuridad.

Al extraer el material, fue importante que las muestras conservaran su integridad. La extracción de RNA por TRIzol probó obtener RNA de buena calidad (Figura 4) además de dar un buen rendimiento y ser un protocolo de corta duración. El servicio de RNA-seq también mostró buenos resultados. El número de lecturas fue consistente entre librerías, variando entre 34 y 28 millones, siendo 30 millones de lecturas por librería la cobertura esperada, indicando que la construcción de librerías fue uniforme. La calidad mínima que se obtuvo por base entre las secuencias de todas las librerías fue de 26 en puntaje Phred. Ya que un puntaje de 20 implica una probabilidad de error de 1% (Ewing & Green, 1998), podemos decir que nuestras lecturas son bastante confiables. El mapeo de las secuencias estuvo también de acuerdo a lo esperado ya que el protocolo seguido indica que al menos 70% de las lecturas deben mapear contra el genoma de referencia, lo contrario indicaría mala calidad de las lecturas o posible contaminación del material genético (Trapnell *et al* 2012). El porcentaje de lecturas mapeadas estuvo entre 86% y 90% según la librería observada. Además de estar en el rango apropiado, observamos que no hay mucha variación. Esto nos permite estar más seguros de la validez de nuestros datos.

En cuanto el cálculo de la expresión genética, los programas utilizados la formulan en FPKM. Estos valores son el número de lecturas por gen normalizados tanto por la longitud del gen como por el número total de lecturas de la librería correspondiente.

Esto hace posible comparar los valores entre genes y entre librerías. La cuantificación, normalización y comparación de la expresión de cada gen entre tratamientos fue calculada por el programa cuffdiff utilizando un FDR de 0.05 como límite para seleccionar los genes diferencialmente expresados.

En cuanto a los resultados del análisis de expresión diferencial, tanto en la planta tolerante como en la susceptible hubo cambios de expresión en genes de proteínas CBF. Las CBF son proteínas de unión al DNA de la familia AP2/EREBP que forman parte importante de la vía CBF dependiente de aclimatación al frío, que desencadena la expresión de los denominados genes COR o de respuesta al frío (Thomashow, 2001). En la planta tolerante se encontró un incremento en la expresión de CBF2 (PGSC0003DMG400014309), el cual según literatura se expresa después de CBF1 y CBF3 en *A. thaliana* y parece regular que su expresión sea transitoria (Novillo *et al.*, 2004). En dicho estudio se muestra a través de *Northern blot* que la expresión de CBF1 y CBF3 incrementan en plantas de *A. thaliana* expuestas a 4°C a partir de los primeros 15 minutos, alcanzando un pico; y caen dramáticamente a las 2 horas, cuando la expresión de CBF2 se dispara. El incremento de expresión de CBF2 en nuestra variedad de papa tolerante nos lleva a pensar que dicha vía está relacionada a su capacidad de tolerancia al frío y que la ausencia de cambios visibles en la expresión de *CBF1* y *CBF3* se deben a que el tiempo elegido para nuestro tratamiento se encuentra pasada la ventana en que dichos cambios ocurrieron. En el caso de la variedad susceptible, se observa la activación de un gen CBF4. Según Haake *et al* (2002), este gen regula la expresión de genes COR y su sobreexpresión bajo el promotor CaMV 35S en *A. thaliana* confiere mayor resistencia a bajas temperaturas; pero, su activación sería inducida por estrés hídrico y aplicación externa de ABA y no por bajas temperaturas. Pennycook (2008), reportó, por el contrario, que CBF4 sí sería inducido por bajas temperaturas en solanáceas tuberosas. En su estudio secuenció los *CBFs* de varias solanáceas, entre ellas *S. commersonii* y *S. tuberosum* y encontró que

éstas dos contenían un gen *CBF4* y un gen *CBF5* y *CBF4* en tándem respectivamente. Carvallo *et al* (2011) utilizó estas mismas dos especies para comparar la respuesta frente a temperaturas de 2°C, ya que *S. commersonii* es tolerante y *S. tuberosum* es susceptible, y encontraron que el número de genes inducido por frío es similar; sin embargo, tras comparar también los genes inducidos por frío en plantas con el gen *AtCBF3* bajo el promotor CaMV 35S, encontraron que el número de genes inducido por frío por dicho gen era mayor en *S. commersonii*. Dado que dicho gen confiere tolerancia a bajas temperaturas en *S. tuberosum*, ellos concluyen que no se trata de que dicha especie carezca de los genes necesarios si no de que estos no están dentro del regulón de los *CBF1* y *CBF4*, que son inducidos por frío y por lo tanto, no están funcionando durante dicho estrés. En el caso de nuestra variedad susceptible, es probable que a pesar de expresarse *CBF4*, entre los genes que regula no estén aquellos que codifican para las moléculas efectoras de importancia para la tolerancia a bajas temperaturas. La variedad susceptible también inducía factores de transcripción de la familia bHLH, a las que corresponden los factor de transcripción tipo MYC-like ICE1 (Chinnusamy *et al.*,2003) e ICE2 (Fursova *et al.*,2009) presentes en *A. thaliana* y relacionados a la tolerancia a congelamiento según la literatura.

Observamos también cambios en la expresión de factores de transcripción tipo MYB. En la variedad tolerante se encontró sólo uno, siendo inducido, que resulta de interés; mientras que en la variedad susceptible se encontraron varios y modulados en ambas direcciones. Uno de ellos, *MYB20*, hallado reprimido, ha sido reportado también por Gao *et al* (2014) en respuesta a deshidratación. Él también observó que la pérdida de su función confiere tolerancia a deshidratación mientras que su sobreexpresión causa susceptibilidad. Se encontró también un *MYB139* inducido en la variedad susceptible pero reprimido en la variedad tolerante que también podría relacionarse a una respuesta favorable a bajas temperaturas ya que ha sido descrito como de respuesta a estrés (Liu *et al.*,2013 – archivo suplementario 1). La familia de

factores de transcripción tipo MYB es bastante grande y está involucrada en diversos procesos, entre los cuales entran las respuestas frente a estrés abiótico (Stracke *et al.*,2001). Existe un gen en la familia de los MYB cuya represión confiere resistencia a bajas temperaturas, MYB15. Éste parece participar en la regulación de la vía de aclimatación CBF dependiente, ya que es capaz de interactuar con ICE1 y de unirse a los promotores de CBF1, CBF2 y CBF3. Más aun, su sobreexpresión disminuye los niveles de transcritos de los tres CBFs mientras que la pérdida de su función aumenta la tolerancia al congelamiento (Agarwal *et al.*,2006). En arroz, se han estudiado varios factores de transcripción tipo MYB relacionados a la resistencia a bajas temperaturas. Por ejemplo, la sobreexpresión de *OsMYB2* en arroz confiere tolerancia a salinidad, deshidratación y frío, además causar la acumulación de azúcares, incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y de genes relacionados a estrés (Yang *et al* 2012); la expresión constitutiva de *MYBS3* en arroz confiere resistencia a bajas temperaturas en campo y reprime la expresión de CBF1 para que ésta sea transitoria (Su *et al.*,2010); .el gen *OsMYB3R-2* confiere resistencia a congelamiento en *A. thaliana* e incrementa la expresión de genes *COR* (Dai *et al.*,2007; Ma *et al.*,2009); la expresión de *OsMYB4* en *A. thaliana* y árboles de manzano confiere tolerancia a estrés por bajas temperatura (Vannini *et al.*,2004; Pasquali *et al.*,2008). *MYB96* también es inducido por frío y regula indirectamente la actividad de ICE1, ICE2 y CAMTA3 que a su vez desencadenan la expresión de los factores de transcripción CBF y los genes *COR* (Lee & Seo, 2015). Como se puede observar de estos ejemplos, la modulación de varios factores de transcripción tipo MYB tanto positiva como negativa está relacionada con la vía dependiente de CBF. El gen diferencialmente expresado hallado en la variedad tolerante y la mayoría de los hallados en la variedad susceptible se encontraban descritos como factores de transcripción tipo MYB a secas, sin mayor especificación respecto a su identidad por lo que podrían bien estar relacionados a la vía dependiente de CBF como el caso de los ejemplos mencionados y que los componentes de dicha vía están presentes y siendo modulados en ambas

variedades pero la respuesta al estrés sea diferente por variaciones en la dinámica de sus componentes; es decir el momento y lugar de su expresión y su interacción con otras señales que estén presentes a la vez, y/o variaciones en la composición del conjunto de moléculas efectoras que se expresan finalmente como resultado de la activación de la vía.

En el caso de la variedad susceptible se encontró un *MYB* inducido descrito como MYB48 y uno reprimidos, como MYB12, ambos relacionados a la síntesis de flavonoides (Gene-NCBI, 2016; Mehrrens *et al.*,2005). Los flavonoides y antocianinas son metabolitos secundarios que recientemente han sido ligados funcionalmente a la capacidad de tolerancia a bajas temperaturas por Shulz *et al* (2016), quien evaluó 20 mutantes de *A. thaliana* con pérdida de función para las enzimas más importantes en la vía de síntesis de flavonoides y encontró que los *knockouts* veían reducida su capacidad de tolerancia y que disminución o pérdida completa ciertos flavonoides socavaba la capacidad de tolerancia a congelamiento o era compensada por la acumulación de otro flavonoide. En el caso de genes relacionados a la síntesis de flavonoides y antocianinas, uno codificante para una flavonoideglucosiltransferasa se encontró inducida en la variedad de papa tolerante y reprimida en la susceptible, por lo que también resulta de interés su estudio. En el caso de la variedad tolerante, sólo se encontró un gen más a parte del ya mencionado, pero reprimido. Mientras que en la variedad susceptible se encontró un gen inducido y un gran número, reprimidos. Cabe resaltar que la falta de más genes identificados en la variedad tolerante y el gran número hallado en la susceptible puede deberse a que el genoma de referencia utilizado es más cercano al de la variedad susceptible y que bien podría haber otros genes relacionados a la síntesis de flavonoides siendo modulados.

Otras vías reguladas en nuestras variedades de papa estuvieron relacionadas a niveles de hormonas. Se ha visto en estudios anteriores que un contenido reducido de giberelinas confiere tolerancia a estrés por frío por inducción de la expresión de

giberelina-2-oxidasa (GA2ox) y acumulación de proteínas DELLA y que, además, esta tolerancia puede ser dependiente como independiente de CBF (Achard *et al.*,2008; Colebrook *et al.*,2014). Tanto en la variedad susceptible como en la tolerante se observaron cambios en la expresión relacionados a esta reducción del efecto de las giberelinas. En el caso de la variedad tolerante, parece emplear el mecanismo mencionado, ya que se encontró un gen de GA2ox inducido. En el caso de la variedad susceptible, la estrategia parece ser una insensibilización por represión de los receptores GID1 (Gibberellin-Insensitive Dwarf), los cuales facilitan la ubiquitinación de las proteínas DELLA (Murase *et al.*,2008). Sin embargo, este genotipo parece estar ligado a sensibilidad a sequía en arroz, resultando en un efecto contrario (Du *et al.*,2013).

En el caso de las auxinas, éstas juegan un rol importante en cuanto al desarrollo y arquitectura de raíces y por ello también se les relaciona a tolerancia a estrés de tipo osmótico y de sequía, y al balance del agua. Su cadena de señalización es mediada por factores de transcripción tipo NAC (Lekshmy *et al.*,2017). El balance de esta hormona se da en parte por la generación de conjugados de auxina mediante la acción de glicosiltransferasas. Las moléculas de auxina modificadas pueden ser acumuladas al estar protegidas de posible degradación (Bajguz & Piotrowska, 2009). Cabe mencionar que las glicosiltransferasas también parecen relacionarse a la síntesis de antocianinas (Lekshmy *et al.*,2017). Genes que codificaban glicosiltransferasas se encontraron modulados en ambas variedades de papa. En ambos casos se encontraron genes inducidos; pero, en el caso de la susceptible, se encontraron también muchos reprimidos. Conjuntamente, se encontraron cambios en la expresión de genes de factores de transcripción tipo NAC inducidos en ambas variedades y reprimidos sólo en la variedad susceptible; así como proteínas inducidas por auxinas moduladas en ambas direcciones para ambas variedades. Esto nos lleva a pensar que los componentes de esta vía y las diferencias en los genes que hemos encontrado

expresados podrían relacionarse a la diferencia en la respuesta al estrés por bajas temperaturas en nuestras variedades y que, los genes codificantes para glicosiltransferasas y el factor de transcripción tipo NAC inducidos en la variedad tolerante son candidatos para futuros estudios.

La familia de factores de transcripción tipo dedos de zinc o ZF (*zinc fingers*) también se vio representada entre nuestros genes diferencialmente expresados. En ambas variedades se indujeron genes codificantes para ZPT2-13. Cabe resaltar que aunque la descripción sea la misma, hablamos de distintos genes, por lo que aquellos modulados en la variedad tolerante podrían tener diferencias de interés. Las ZPT2 son una familia de 14 proteínas halladas en petunia híbrida que se caracterizan por tener dos dedos de zinc C2H2. Las proteínas ZF parecen participar en procesos de regulación de la expresión genética y muchas tipo C2H2 participan en respuestas a estrés abiótico (Kodaira *et al.*,2011; Kielbowicz-Matuk, 2012). Otras de este tipo que se hallaron moduladas fueron las WRKY, de las cuales dos se encontraron inducidas en la variedad tolerante y varias inducidas o reprimidas en la variedad susceptible. De esta familia también hay literatura que indica que no sólo se expresan en condiciones de frío sino que son capaces de conferir tolerancia a bajas temperaturas. Este es el caso del gen *WRKY76* en arroz, el cual probablemente influye en la protección de membranas (Yokotani *et al.*,2013) y el gen *WRKY71*, también en arroz, cuya expresión constitutiva también confiere tolerancia a bajas temperaturas (Kim *et al.*,2016). Además de estos factores, la variedad tolerante modula dos ZF más cuya descripción no ahonda más en su categorización, uno inducido y uno reprimido, mientras que en la susceptible se detectó un número mayor. Otras familias de factores de transcripción que se activan de forma temprana frente a estrés por frío a parte de los ZF y MYB son los AP2 y bZIP (Cheng *et al.*,2002) pero estos sólo se encontraron regulados en la variedad susceptible de modo que no son relevantes para este estudio.

Finalmente, en estudios previos se ha visto que las plantas se protegen de las bajas temperaturas a través de múltiples mecanismos, los cuales incluyen cambios en los lípidos de membrana, acumulación de prolina, azúcares y osmolitos, acumulación de antioxidantes y disminución del crecimiento, entre otros (Xin & Browse, 2000). Otros genes de interés hallados en nuestra variedad de papa tolerante son el que codifica para osmotina, ya que esta proteína ha sido recientemente ligada al estrés por bajas temperaturas (Le *et al.*,2017) y parece estar relacionada a la acumulación de prolina (Patade *et al.*,2013). También destaca el gen codificante para arginina decarboxilasa, proteína importante para el reciclaje de nitrógeno y precursora poliaminas. Su expresión constitutiva ha demostrado efectos de tolerancia a diversos tipos de estrés incluido el estrés por frío (Prabhavathi & Rajam, 2007) y en *P. trifoliata* se ha observado que está regulado por ICE1, y que la acumulación de poliaminas es, en parte, el origen de la tolerancia al frío de las mutantes estudiadas en dicho trabajo (Huang *et al.*,2015). Genes codificantes para osmotina estuvieron reprimidos en el caso de la variedad susceptible. Hay, además, estudios en papa que muestran que ésta induce proteínas relacionadas al rescate celular, incluyendo las tipo LEA y chaperonas como las heat shock; así como aquellas relacionadas a detoxificación de los ROS producidos por estrés oxidativo, como la tioredoxina, SOD y glutatión transferasas (Evers *et al.*,2012). Entre estas, nuestra variedad tolerante de papa mostró inducción un gen para proteína LEA y un gen para glutatión s-transferasa que se observó a la vez reprimido en la variedad susceptible. Se detectó la modulación de otros genes codificantes para glutaredoxinas y tioredoxinas en la variedad susceptible, pero lamentablemente no se hallaron en la tolerante. Es posible, nuevamente, que esto se deba a que no se hayan podido detectar debido al genoma de referencia utilizado y no a que estos no estuviesen cambiando de expresión.

VII. Conclusiones:

- El método de extracción de RNA con TRIzol es sencillo y efectivo para hojas de papa y el RNA obtenido puede utilizarse para secuenciamiento sin problemas.
- Se encontraron muchos más genes diferencialmente expresados en la variedad susceptible comparada con la tolerante, probablemente debido a la relación de ambas con el genoma de referencia. Se recomienda buscar una referencia más cercana a la variedad tolerante para otros estudios.
- Elementos de la vía de aclimatación dependiente de CBF se encontraron diferencialmente expresados en ambas variedades de papa nativa, por lo que esta vía estaría conservada y activa en ambos casos. Probablemente, la composición de los genes regulados y los tiempos en que se coordina la activación y señalización de esta vía sean lo que difiere y determina la respuesta de cada planta.
- Elementos de las vías relacionadas a giberelinas y auxinas se encuentran diferencialmente expresados en la variedad tolerante y podrían jugar un rol en su respuesta fisiológica.
- Entre los genes candidatos de tolerancia a bajas temperaturas se encuentran:
 - PGSC0003DMG400014309 (CBF2)
 - PGSC0003DMG402010883, PGSC0003DMG402026177 (MYB)
 - PGSC0003DMG400028632 (síntesis de flavonoides)
 - PGSC0003DMG400009021 (GA2ox)
 - PGSC0003DMG400008181, PGSC0003DMG401003156,
PGSC0003DMG401029843, PGSC0003DMG400010049
(glicosiltransferasas)
 - PGSC0003DMG400032555 (NAC)
 - PGSC0003DMG400015557, PGSC0003DMG401030312 (ZPT2)
 - PGSC0003DMG400031140, PGSC0003DMG400029207 (WRKYs)

- PGSC0003DMG400002507, PGSC0003DMG402012192 (ZF)
- PGSC0003DMG400026671, PGSC0003DMG400001662 (ADC)
- PGSC0003DMG400003040 (osmotina)
- PGSC0003DMG400000067 (LEA)
- PGSC0003DMG400019956 (Glutation S-transferasa)
- PGSC0003DMG400001448 (UDP glucose deshidrogenasa 2)

VIII. Abreviaturas:

AFP	<i>Anti-freezing protein</i>
AP2/EREBP	<i>Apetala 2/ Ethylene response element binding protein</i>
BZIP	<i>Basic Leucine zipper</i>
C2H2	Cys2Hist (2 Cisteínas y 2 histidinas)
CBF	<i>C-repeat binding factor</i>
cDNA	DNA complementario
COR	<i>Cold Regulated</i>
ddNTP	Dideoxynucleótido
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FPKM	Fragmentos por kilo base (de exón) por millón (de lecturas)
ICE1	<i>Inducer of CBF expression 1</i>
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
LEA	<i>Late embryogenesis abundant</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SOD	Super óxido dismutasa
TA	Temperatura Ambiente
UCLA	<i>University of California Los Angeles</i>
ZF	<i>Zinc finger</i>

IX. Bibliografía:

- Achard P, Gong F, Chéminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P. The Cold-Inducible CBF1 Factor – Dependent Signaling Pathway Modulates the Accumulation of the Growth-Repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism. 2008;20(August):2117–29.
- Adams MD, et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991;252(5013):1651-6
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong C-H, Fujii H, Zheng X, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem [Internet]*. 2006 Dec 8; 281(49):37636–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015446>
- Alarcón Velazco CE, Trebejo Varillas I, SENAMHI-FAO. Atlas de heladas del peru. 2010
- Artus, N., Uemura, M., Steponkus, P., Gilmour, S., Lin, C., Thomashow, M. Constitutive expression of the cold regulated *Arabidopsis thaliana* cor15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. 1996. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 13404-13409
- Ashworth EN, Pearce RS. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species. *Planta*. 2002;214:798–805.
- Bainbridge MN et al. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC Genomics* 2006, 7:247
- Bajguz A, Piotrowska A. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry [Internet]*. Elsevier Ltd; 2009;70(8):957–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.006>
- Bayer. *Akad. Wiss. München* pp. 264-271.
- Birch PRJ, Bryan G, Fenton B, Gilroy EM, Hein I, Jones JT, et al. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Secur*. 2012 Nov 10; 4(4):477–508.
- Blackman FF. Vegetation and frost. *New phytologist* 1909. 8(9-10): 354–363
- Campos D. *Agroclimatología cuantitativa de cultivos*. Editorial Trillas. México. 2005. 320p.
- Carvallo M a, Pino M-T, Jeknic Z, Zou C, Doherty CJ, Shiu S-H, et al. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot [Internet]*. 2011 Jul; 62(11):3807–19. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3134341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen W, Provart N, Glazebrook J. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant ... [Internet]*. 2002; 14(March):559–74. Available from: <http://www.plantcell.org/content/14/3/559.short>
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*. 2006; 126:52–61.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*. 2007 Oct; 12(10):444–51.

- Chinnusamy, V. et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. 2003. *Genes Dev.* 17, 1043–1054
- Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156–159.
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Jul;1(2):581–5.* Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- CIP. Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa [Internet]. Ardi B, editor. CIP. Lima, Perú: CIP; 1996. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Principales+Enfermedades+,+Nematodos+a+Insectos+de+la+Papa#0>
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol.* 2014;(217):67–75.
- Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol [Internet]. 2007 Apr; 143(4):1739–51.* Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1851822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- De Fina, A. L.: Los Elementos Climáticos y los Cultivos. Editorial Sudamericana, Buenos Aires, 1945, segunda edición, 258 pp.
- Du H, Chang Y, Huang F, Xiong L. *GID1* modulates stomatal response and submergence tolerance involving abscisic acid and gibberellic acid signaling in rice. *J Integr Plant Biol.* 2013;57(11):954–68.
- Elías, F., Castellvi F.: *Agrometeorología*. Ediciones MundiPrensa, Madrid, 2001, segunda edición. 517 pp.
- Evers D, Legay S, Lamoureux D, Hausman JF, Hoffmann L, Renaut J. Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Mol Biol [Internet]. 2012 Mar; 78(4-5):503–14.* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258187>
- FAO. *New Light on a Hidden Treasure [Internet]. Rome; 2009.* Available from: <http://www.fao.org/potato-2008/pdf/IYPbook-en.pdf>
- Feng H, Ma N, Meng X, Zhang S, Wang J, Chai S, et al. A novel tomato MYC-type ICE1-like transcription factor, SlICE1a, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem.* 2013;73:309–20.
- Fuller BJ. CRYOPROTECTANTS: THE ESSENTIAL ANTIFREEZES TO PROTECT LIFE IN THE FROZEN STATE. *CryoLetters.* 2004;25(6):375–88.
- Fursova O V, Pogorelko G V, Tarasov VA. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *Gene [Internet]. 2009; 429(1–2):98–103.*
- Gao S, Zhang YL, Yang L, Song JB, Yang ZM. AtMYB20 is negatively involved in plant adaptive response to drought stress. *Plant Soil [Internet]. 2014; 376(1):433–43.*
- Gobierno del Perú. PLAN MULTISECTORIAL PARA LA ATENCIÓN DE HELADAS Y FRIAJE 2013. 2013. Disponible en: <http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/pdf/esp/doc2381/doc2381-contenido.pdf>

- Gorke H. "Ober clicmisclic Vorgilnge bciin Erfricren dej-Pflanzen."Landwirtschaftlichcii Versuclis-Stationen. Bd. LXV., 1906.
- Gusta L V, Wisniewski M. Frost Tolerance in Plants. In: Intl C, editor. Plant Stress Physiology. 2012.
- Gutiérrez R. Papas nativas, desafiando al cambio climático. Primera. Soluciones Prácticas; 2008.
- Guy CL and Haskell D. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. Plant Physiol, 1987: 84,872-878.
- Guy CL, Niemi, KJ, Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A . 1985: 82,3673-3677.
- Haake V, Cook D, Riechmann J, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. Plant Physiol [Internet]. 2002; 130:639–48. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/130/2/639.short>
- High Temperature Stresses," 2nd ed. Academic Press, New York
- Hinch DK, Zuther E. Plant Cold Acclimation Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2014.
https://books.google.co.jp/books?id=_CVGAAAACAAJ
- Huamani, J. C. Caracterización Climática del Régimen de Heladas Meteorológicas en el Perú. 2007. Tesis. Lima: Universidad Mayor de San Marcos
- Huang X-S, Zhang Q, Zhu D, Fu X, Wang M, Zhang Q, et al. ICE1 of Poncirus trifoliata functions in cold tolerance by modulating polyamine levels through interacting with arginine decarboxylase. J Exp Bot [Internet]. 2015;66(11):3259.
- Kielbowicz-Matuk A. Involvement of plant C(2)H(2)-type zinc finger transcription factors in stress responses. Plant Sci [Internet]. 2012 Apr; 185-186:78–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325868>
- Kim C-Y, Vo KTX, Nguyen CD, Jeong D-H, Lee S-K, Kumar M, et al. Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, OsWRKY71. Plant Biotechnol Rep [Internet]. 2016;10(1):13–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-015-0383-2>
- Kim D, Perteza G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. . Genome Biology 2013, 14:R36
- Kodaira K-S, Qin F, Tran L-SP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, et al. Arabidopsis Cys2/His2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate abscisic acid-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions. Plant Physiol [Internet]. 2011 Oct; 157(2):742–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 2012, 9:357-359.
- Le TTT, Williams B, Mundree S. An osmotin from the resurrection plant Tripogon loliiformis (TIOsm) confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic rice. Physiol Plant [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ppl.12585>

- LeConte J, Observations on the freezing of vegetables, and on the causes which enable some plants to endure the action of extreme cold. *Am.j.sci.Arts* 1852. XIII(XXXVII):84 [Disponibile en:
- Lee HG, Seo PJ. The MYB96–HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF–COR pathway in Arabidopsis. *Plant J* [Internet]. 2015;82(6):962–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12866>
- Lekshmy **et al.** Mechanism of Auxin Mediated Stress Signaling in Plants **In: Pandey.** Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress. Hoboken, New Jersey: JohnWiley & Sons, Inc., 2017
- Levitt , J. (1972) Responses of plants to environmental stresses. New York; Academic Press.
- Levitt, J. (1980). "Responses of Plants to Environmental Stress: Chilling, Freezing, and
- Li PH, Fennell A. Potato Frost Hardiness. *Potato Physiology*. Orlando, Florida: Academic Press, Inc.; 1985.
- Li PH, Huner NPA, Toivio-Kinnucan M, Chen HH, Palta JP. Potato freezing injury and survival, and their relationships to other stress. *Am Potato J.* 1981;58:15–29.
- Liu M, Shi J, Lu C. Identification of stress-responsive genes in *Ammopiptanthus mongolicus* using ESTs generated from cold- and drought-stressed seedlings. *BMC Plant Biol* [Internet]. 2013; 13(1):88.
- Ma Q, Dai X, Xu Y, Guo J, Liu Y, Chen N, et al. Enhanced tolerance to chilling stress in OsMYB3R-2 transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiol* [Internet]. 2009 May; 150(1):244–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2675741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Margulies M et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005, 437:376–380
- Matías L., Fuentes A. y García F. Heladas. 2014. Centro Nacional de Prevención de Desastres. Disponible en: <http://www.cenapred.gob.mx/es/Publicaciones/archivos/122-FASCCULOHELADAS.PDF>
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The Arabidopsis Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. Vol. 138, *Plant Physiology*. 2005. p. 1083–96.
- Miura K, Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan; 14(3):5312–37. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Molisch H, "Untersuchungen iiber das Erfrieren der Pflanzen." Jena, 1897.
- Muller-Thurgau H. "Uber das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen." Tbeil I,, *Landwirtscliaftliclie Jalirbiicber*. Bd. IX 1850, Theil 11,, *ibid*, Bd, XV,, 1886,
- Murase K, Hirano Y, Sun T, Hakoshima T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*. 2008;456(November):459–64.
- Murphy LD et al. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1990, 29:10351–10356.
- Nägeli, C. (1861). Über die Wirkung des Frostes auf die Pflanzenzellen. *Sitzber. Math. Phys. Kl.*

- Noble WS. How does multiple testing correction work? *Nature biotechnology*. 2009;27(12):1135-1137. doi:10.1038/nbt1209-1135.
- Noonan KE et al. Quantitative analysis of MDRI (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. 87:7160-7164
- Novillo F, Alonso J, Ecker J, Salinas J. 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 U S A* [Internet]. 2004; 101(11):3985–90. Available from: <http://www.pnas.org/content/101/11/3985.short>
- Orvar, B.L. et al. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. 2000. *Plant J*. 23, 785-794
- Oufir M, Legay S, Nicot N, Van Moer K, Hoffman L, Renaut J, Hausman J, Evers D. Gene expression in potato during cold exposure: changes in carbohydrate and polyamine metabolism. *Plant Science* 175 (2008) 839–852
- Pasquali G, Biricolti S, Locatelli F, Baldoni E, Mattana M. Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Rep* [Internet]. 2008 Oct; 27(10):1677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679687>
- Patade VY, Khatri D, Kumari M, Grover A, Mohan Gupta S, Ahmed Z. Cold tolerance in Osmotin transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is associated with modulation in transcript abundance of stress responsive genes. Vol. 2, SpringerPlus. Cham; 2013.
- Pearce R. Plant Freezing and Damage. *Ann Bot* [Internet]. 2001 Apr; 87(4):417–24. Disponible en: <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1006/anbo.2000.1352>
- Pennycooke JC, Cheng H, Roberts SM, Yang Q, Rhee SY, Stockinger EJ. The low temperature-responsive, *Solanum* CBF1 genes maintain high identity in their upstream regions in a genomic environment undergoing gene duplications, deletions, and rearrangements. *Plant molecular biology*. 2008 Jul; 67(5):483–97.
- Pereyra, A. R.; Angelocci, L. R.; Sentelhas, P. C.: *Agrometeorología: fundamentos e aplicações práticas*. Livraria e Editora Agropecuaria Ltda. Guaíba, Brasil, 2002, 478 pp
- Pereyra, D.; Zitácuaro, I.; Palma, B.: *Heladas en el Cofre de Perote: técnicas de rotación*. 1990. Primera edición, Universidad Veracruzana, México. 45 pp
- Perez C, Nicklin C, Dangles O, Vanek S, Sherwood S, Halloy S, et al. Climate Change in the High Andes: Implications and Adaptation Strategies for Small-scale Farmers. *Int J Environ Cult Econ Soc Sustain*. 2010;6(5):71–88.
- Pietu G, Mariage-Samon R, Fayein NA, Matingou C, Eveno E, et al. The Genexpress IMAGE knowledge base of the human brain transcriptome: A prototype integrated resource for functional and computational genomics. *Genome Res* 1999, 9: 195–209.
- Plieth C, Hansen UP, Knight H, Knight MR Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. 1999. *Plant J* 18: 491–497
- Prabhavathi VR, Rajam MV. Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotechnol*. 2007;24(3):273–82.
- Ralf Stracke MW and BW. The R2R3 - MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*. 2001;4:447–56.

- Rensink W. A., Iobst S., Hart A., Stegalkina S., Liu J., Buell C. R. (2005). Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Funct. Integr. Genomics* 5, 201–207
- Reynolds, MP., Pask, A.J.D. and Mullan DM. (Eds.) (2012) *Physiological Breeding I : Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation* . Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Rio D. C., Ares M. Jr., Hannon G. J. & Nilsen T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb prot5439 (2010a).
- Rio DC, Ares M, Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. *Cold Spring Harbor protocols.* 2010b;2010 pdb prot5439.
- Sachs J (1860) kristallbildung beim einfrieren und auftauen saftiger pflanzenteile. mitgeteilt von W.. Hofmeister. *Ber Verhandl Sächs Akad Wiss* 12:1-50
- Sanger F; Nicklen S; Coulson AR (December 1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5463–7.
- Sangwan, V. et al. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. 2001. *Plant J.* 27, 1–12
- Scheller, HV., Haldrup, A. Photoinhibition of photosystem I. 2005. *Planta.* 221: 5-8
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):467-70.
- Schmittgen TD, Real-Time Quantitative PCR, *METHODS* 25, 383–385 (2001) doi:10.1006/meth.2001.1260
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie AR, Hincha DK. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* [Internet]. Nature Publishing Group. Nature Publishing Group; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34027>
- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). Climate Scenarios for Peru to 2030. Second National Communication on Climate Change. Executive Summary. Lima 2009.
- Snyder RL, de Melo-Abreu JP, editors. *FROST DAMAGE: PHYSIOLOGY AND CRITICAL TEMPERATURES*. Frost protection: fundamentals, practice, and economics - Volume 1 [Internet]. Rome: FAO; 2005. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y7223e/y7223e0a.htm>
- Su C-F, Wang Y-C, Hsieh T-H, Lu C-A, Tseng T-H, Yu S-M. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol* [Internet]. 2010 May; 153(1):145–58. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2862423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy AF, Dhindsa RS, Borg M. The induction of kingenes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. 1997. *Planta* 203: 442–447
- Thomashow MF. So What 's New in the Field of Plant Cold Acclimation? Lots! *Plant Physiol* [Internet]. 2001; 125(1):89–93. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/125/1/89.full.pdf+html>
- Thomashow MF (1990) Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet* 28:99–131

- Thomashow MF. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology* 118, 1–8.
- Thomashow, M. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. 1999. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 571-599
- Torres, C., Cubas, H. 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). 2007. Informe de consultoría para Soluciones Prácticas-ITDG, Lima.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature biotechnology*. 2010;28(5):511-515. doi:10.1038/nbt.1621.
- Trasmonte Soto GL. Propuesta de gestión de riesgo de heladas, que afectan a la agricultura del Valle del Mantaro. Universidad Ricardo Palma; 2009. P. 198. Disponible en: http://www.met.igp.gob.pe/publicaciones/2009/g_trasmonte_TESIS.pdf
- Tuteja Narendra, Sarvajeet Singh Gill. *Plant Acclimation to Environmental Stress*. Springer Science. New York 2013.
- United Nations Development Programme (UNDP), Bureau for Crisis Prevention and Recovery (BCPR). 2013. *Climate Risk Management for Agriculture in Peru: Focus on the Regions of Junín and Piura*. New York, NY: UNDP BCPR.
- Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, et al. Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J [Internet]*. 2004 Jan; 37(1):115–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.2003.01938.x>
- Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, et al. Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J [Internet]*. 2004 Jan [cited 2016 Apr 29];37(1):115–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.2003.01938.x>
- Vaultier, M.N. et al. Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. 2006. *FEBS Lett.* 580, 4218–422
- Watson JD, Crick FH (1953). "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid" (PDF). *Nature*. 171 (4356): 737–738
- Wisniewski M, Fuller M, Glenn DM, Palta J, Carter J, Gusta L, et al. Factors involved in ice nucleation and propagation in plants: an overview based on new insights gained from the use of infrared thermography. *Búvísindi Icelandic Agric Sci*. 2001;14:41–7.
- Wisniewski M, Lindow SE, Ashworth EN. Observations of Ice Nucleation and Propagation in Plants Using Infrared Video Thermography '. *Plant Physiol*. 1997;(113):327–34.
- Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ [Internet]*. 2000; 23:893–902. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x/full>
- Xin Z. Acquired Freezing Tolerance in Higher Plants : The Sensing and Molecular Responses to Low Nonfreezing Temperatures. In: Storey KB, Storey JM, editors. *Sensing, Signaling And Cell Adaptation [Internet]*. Elsevier Science B.V.; 2002. p. 121–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1568-1254\(02\)80011-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1568-1254(02)80011-0)

- Xin, Z. and Browse, J. eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing tolerant. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.95, 7799– 7804
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK. The Arabidopsis LOS5/ABA3locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stressresponsive gene expression. 2001. Plant Cell 13: 2063–2083
- Yang A, Dai X, Zhang W-H. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. J Exp Bot [Internet]. 2012 Apr; 63(7):2541–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, Chujo T, Shimizu T, Okada K, et al. WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. Vol. 64, Journal of Experimental Botany. UK; 2013. p. 5085–97.
- Zhang Z, Huang R. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis. Plant Mol Biol [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 Mar 28];73(3):241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135196>
- Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-seq and microarray in transcriptome profiling of activated T-cells. PLoS One. 2014 Jan 16;9(1):e78644. doi: 10.1371/journal.pone.0078644. eCollection 2014.

X. Anexos

Tabla 8: Genes diferencialmente expresados únicamente en la variedad de papa tolerante a bajas temperaturas.

ID	Gene	locus	FPKM Control	FPKM 0°C	log2 (fold_change)
PGSC0003DMG400000271	Monoxygenase	ST4.03ch12:3474351-3474861	0,00	1,49	inf
PGSC0003DMG400011223	Auxin-induced protein 5NG4	ST4.03ch07:1625534-1629813	0,00	0,43	inf
PGSC0003DMG400011879	Protein kinase	ST4.03ch06:43874995-43875592	0,00	0,49	inf
PGSC0003DMG400015557	ZPT2-13	ST4.03ch11:45238064-45238765	0,00	15,49	inf
PGSC0003DMG400024676	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch03:54709248-54710000	0,00	1,01	inf
PGSC0003DMG400026268	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch08:51513747-51514618	0,00	0,54	inf
PGSC0003DMG400030672	By genscan and genefinder	ST4.03ch02:41738777-41739340	0,00	0,47	inf
PGSC0003DMG400042683	Gene of unknown function	ST4.03ch09:5599968-5600523	0,00	0,48	inf
PGSC0003DMG400014309	CRT binding factor 2	ST4.03ch03:42082417-42084141	0,21	17,19	6,33
PGSC0003DMG400045603	Regulator of gene silencing	ST4.03ch11:43226158-43226710	0,63	36,78	5,86
PGSC0003DMG402030595	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch02:41686395-41687344	0,53	19,87	5,24
PGSC0003DMG400009116	Membrane receptor 1	ST4.03ch03:45157566-45160096	0,17	6,00	5,14
PGSC0003DMG400008181	UDP-glucose:glucosyltransferase	ST4.03ch10:58633793-58636524	0,05	1,15	4,43
PGSC0003DMG400027550	Gene of unknown function	ST4.03ch04:62332356-62332791	1,95	36,71	4,24
PGSC0003DMG400018445	Gene of unknown function	ST4.03ch03:32226444-32226966	0,59	10,68	4,17
PGSC0003DMG400006905	Gene of unknown function	ST4.03ch02:26174609-26176393	0,64	11,35	4,15
PGSC0003DMG400007376	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch08:40812187-40813595	0,24	3,17	3,75
PGSC0003DMG400017936	Late embryogenesis abundant protein 5	ST4.03ch06:461907-463086	58,78	590,51	3,33
PGSC0003DMG400026512	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch06:48059122-48060102	0,28	2,79	3,30
PGSC0003DMG400017757	Arabinogalactan-protein	ST4.03ch12:55471255-55471864	2,49	19,75	2,99
PGSC0003DMG402026177	MYB domain class transcription factor	ST4.03ch07:47962765-47963967	0,44	3,31	2,91

PGSC0003DMG400012524	Gene of unknown function	ST4.03ch08:114497-115614	0,38	2,70	2,85
PGSC0003DMG400006309	DC1 domain containing protein	ST4.03ch01:66729394-66730795	0,43	2,91	2,77
PGSC0003DMG400032273	N-acetyltransferase	ST4.03ch09:53949142-53950050	3,06	20,66	2,75
PGSC0003DMG400009021	Gibberellin 2-oxidase	ST4.03ch01:62991491-62994946	1,92	12,90	2,75
PGSC0003DMG400025824	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein	ST4.03ch01:84981239-84982672	0,52	3,41	2,72
PGSC0003DMG401030312	ZPT2-12	ST4.03ch06:56383259-56384106	2,78	18,16	2,71
PGSC0003DMG400002507	Zinc finger protein	ST4.03ch03:60766504-60768866	4,44	28,62	2,69
PGSC0003DMG400032555	NAC domain protein	ST4.03ch04:5045169-5047136	14,61	93,69	2,68
PGSC0003DMG400025163	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:85542155-85543175	2,42	14,28	2,56
PGSC0003DMG400016794	ATP binding protein	ST4.03ch05:46354697-46357474	0,18	1,01	2,52
PGSC0003DMG400027566	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:62368866-62369383	11,77	66,35	2,49
PGSC0003DMG401003156	Glycosyltransferase, CAZy family GT2	ST4.03ch03:47090593-47096240	2,46	13,85	2,49
PGSC0003DMG402025869	C2 domain-containing protein	ST4.03ch01:84134533-84137749	0,89	4,99	2,48
PGSC0003DMG400001181	ACI19	ST4.03ch02:24696171-24698146	1,73	9,50	2,46
PGSC0003DMG400025267	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:66419481-66420105	6,23	31,22	2,32
PGSC0003DMG400005908	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch06:54457918-54458905	2,89	14,42	2,32
PGSC0003DMG401029843	Glucosyltransferase	ST4.03ch10:57905392-57906481	3,18	15,45	2,28
PGSC0003DMG400028235	Hin1	ST4.03ch10:56086449-56087352	1,86	8,99	2,27
PGSC0003DMG400030309	Auxin-regulated protein	ST4.03ch06:56329702-56332793	1,26	6,04	2,27
PGSC0003DMG400006790	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:65374900-65375512	4,03	19,30	2,26
PGSC0003DMG400025513	Gene of unknown function	ST4.03ch06:1660999-1661660	1,69	8,01	2,24
PGSC0003DMG402007970	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:68201446-68204201	1,68	7,86	2,22
PGSC0003DMG400032272	N-acetyltransferase	ST4.03ch09:53954402-53955427	6,63	30,22	2,19
PGSC0003DMG400025266	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:66421684-66422197	37,23	163,27	2,13
PGSC0003DMG400022337	Gene of unknown function	ST4.03ch07:54913046-54914090	1,66	7,15	2,11
PGSC0003DMG400004860	Auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase	ST4.03ch06:48515587-48517771	5,10	21,67	2,09
PGSC0003DMG400031105	Hydroxyproline-rich glycoprotein GAS31	ST4.03ch07:51495374-51495939	1,98	8,41	2,08
PGSC0003DMG400031795	DNA binding protein homolog	ST4.03ch09:52914832-52916048	2,08	8,81	2,08

PGSC0003DMG400003568	Cellular nucleic acid binding protein	ST4.03ch02:39304867-39306068	1,13	4,75	2,06
PGSC0003DMG400043507	Cation-transporting atpase plant	ST4.03ch09:54687819-54691521	0,62	2,57	2,06
PGSC0003DMG400028185	Metal ion binding protein	ST4.03ch10:55143455-55145580	1,15	4,74	2,04
PGSC0003DMG400030698	Stress induced protein	ST4.03ch07:3073428-3074422	12,03	49,49	2,04
PGSC0003DMG400030364	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 284	ST4.03ch06:57298364-57300540	7,24	29,59	2,03
PGSC0003DMG400017330	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch07:50748548-50751266	2,89	11,27	1,97
PGSC0003DMG400031140	WRKY transcription factor	ST4.03ch04:61579492-61582536	78,44	299,60	1,93
PGSC0003DMG400005401	Sigma factor binding protein 1	ST4.03ch01:74238225-74239303	10,00	37,42	1,90
PGSC0003DMG400021114	Ethylene-responsive nuclear protein	ST4.03ch02:29155285-29156725	3,73	13,75	1,88
PGSC0003DMG400032563	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:4893562-4896321	3,02	10,75	1,83
PGSC0003DMG400003227	SAUR family protein	ST4.03ch03:46106672-46107360	2,95	10,29	1,80
PGSC0003DMG400013488	F-box/kelch protein	ST4.03ch05:9111928-9113418	14,57	49,55	1,77
PGSC0003DMG401007388	MRNA, 1346 bp sequence	ST4.03ch08:40843263-40845641	23,61	80,20	1,76
PGSC0003DMG400017969	Hcr2-0A	ST4.03ch05:10959336-10962640	1,14	3,84	1,75
PGSC0003DMG400007886	Glycerol-3-phosphate transporter / glycerol 3-phosphate permease, putative	ST4.03ch12:1938324-1940948	3,54	11,84	1,74
PGSC0003DMG400000512	Stress-associated protein 11	ST4.03ch02:46764281-46765379	6,07	19,99	1,72
PGSC0003DMG400026671	Arginine decarboxylase	ST4.03ch10:45943836-45946623	25,90	83,57	1,69
PGSC0003DMG400010022	Patatin 3	ST4.03ch02:44264699-44266770	13,37	42,22	1,66
PGSC0003DMG400030608	Calcium-binding protein CML24	ST4.03ch02:41899335-41900585	13,69	42,52	1,63
PGSC0003DMG400013022	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type	ST4.03ch02:22746238-22752186	50,22	155,87	1,63
PGSC0003DMG400022894	Lipoxygenase	ST4.03ch03:61547720-61552116	31,89	98,71	1,63
PGSC0003DMG400021902	Squamosa promoter-binding protein	ST4.03ch05:15021022-15024830	4,54	14,00	1,63
PGSC0003DMG400024260	Receptor protein kinase zmpk1	ST4.03ch09:1235024-1237340	1,63	5,02	1,62
PGSC0003DMG400032231	NDR1	ST4.03ch01:1783476-1784286	4,68	14,30	1,61
PGSC0003DMG400027468	Leucine-rich repeat family protein	ST4.03ch07:1876212-1878372	3,67	11,18	1,61
PGSC0003DMG400026623	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch10:4364940-4366136	9,65	29,33	1,60
PGSC0003DMG400003084	Two-component response regulator ARR8	ST4.03ch02:30408572-30409907	5,26	15,94	1,60

PGSC0003DMG400002586	Harpin-induced 1	ST4.03ch03:61009617-61010762	6,35	19,12	1,59
PGSC0003DMG400017318	Receptor-like kinase	ST4.03ch07:50522047-50523761	3,10	9,17	1,57
PGSC0003DMG400009955	Syringolide-induced protein 14-1-1	ST4.03ch04:71212535-71216633	13,03	38,07	1,55
PGSC0003DMG400026127	Beta-ketoacyl-coa synthase family protein	ST4.03ch06:46282143-46284653	18,42	53,51	1,54
PGSC0003DMG400023107	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch12:41076392-41077892	15,04	42,80	1,51
PGSC0003DMG400027469	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch07:1880274-1882369	2,99	8,48	1,50
PGSC0003DMG402007388	MRNA, 1346 bp sequence	ST4.03ch08:40843263-40845641	22,73	64,12	1,50
PGSC0003DMG400027185	Hydrolase	ST4.03ch05:48026478-48029383	10,87	30,04	1,47
PGSC0003DMG400029207	WRKY transcription factor 6	ST4.03ch09:18826013-18827752	169,72	466,60	1,46
PGSC0003DMG400017278	Receptor-like kinase	ST4.03ch07:50526967-50529430	1,73	4,75	1,45
PGSC0003DMG400007073	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	ST4.03ch07:52583926-52585110	66,55	177,02	1,41
PGSC0003DMG400030220	Protein cbxX, chromosomal	ST4.03ch07:24666249-24671213	17,68	46,56	1,40
PGSC0003DMG400021574	21kD protein	ST4.03ch06:36214131-36214889	55,61	146,30	1,40
PGSC0003DMG400002530	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch03:60356015-60356791	6,14	16,04	1,38
PGSC0003DMG400022633	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch05:6582961-6585423	8,60	22,19	1,37
PGSC0003DMG400014791	Jumonji domain protein	ST4.03ch08:49030410-49037507	3,06	7,83	1,36
PGSC0003DMG400003126	AG-motif binding protein-4	ST4.03ch01:86628052-86629634	49,11	125,47	1,35
PGSC0003DMG400013886	S-locus-specific glycoprotein S6	ST4.03ch02:35334568-35338691	9,13	23,25	1,35
PGSC0003DMG402007101	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	ST4.03ch07:52574590-52575762	5,98	15,19	1,34
PGSC0003DMG400024749	Rapid alkalization factor 2	ST4.03ch01:77289603-77290378	52,58	133,09	1,34
PGSC0003DMG400010283	Class I chitinase	ST4.03ch10:38265410-38265939	85,57	215,28	1,33
PGSC0003DMG400020493	Calcineurin B 1	ST4.03ch08:1062934-1068924	7,20	17,91	1,32
PGSC0003DMG400020271	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch02:47680487-47682817	5,19	12,81	1,30
PGSC0003DMG400024661	Brassinosteroid LRR receptor kinase	ST4.03ch03:55544742-55548544	1,31	3,22	1,30
PGSC0003DMG400026359	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	ST4.03ch11:40395335-40400616	7,75	19,03	1,30
PGSC0003DMG400025621	NDR1	ST4.03ch12:8317834-8323884	9,78	23,74	1,28
PGSC0003DMG400017307	ATFP4	ST4.03ch07:51299263-51300184	106,90	259,16	1,28
PGSC0003DMG400014558	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch05:2697953-2698566	24,53	59,26	1,27

PGSC0003DMG400006643	Gene of unknown function	ST4.03ch06:34654429-34655071	118,89	286,88	1,27
PGSC0003DMG400008386	ATELC	ST4.03ch10:53314592-53316544	11,29	27,18	1,27
PGSC0003DMG400020698	Gene of unknown function	ST4.03ch07:7770971-7773841	320,95	771,31	1,26
PGSC0003DMG400004766	GEM 5	ST4.03ch08:52156991-52159082	36,35	87,18	1,26
PGSC0003DMG400025755	RING-H2 finger protein	ST4.03ch01:83778166-83782991	9,58	22,91	1,26
PGSC0003DMG400015492	ATP binding protein	ST4.03ch02:20796594-20799252	4,42	10,58	1,26
PGSC0003DMG400018942	Autoinhibited calcium ATPase	ST4.03ch09:54679958-54683244	4,10	9,81	1,26
PGSC0003DMG400001662	Arginine decarboxylase	ST4.03ch01:86846483-86849599	41,26	98,12	1,25
PGSC0003DMG400001853	NAK-type protein kinase	ST4.03ch08:50627141-50631771	21,28	50,49	1,25
PGSC0003DMG400024912	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:80168198-80169380	17,26	40,88	1,24
PGSC0003DMG400031235	Protein kinase atsik	ST4.03ch10:48876365-48880609	13,80	32,57	1,24
PGSC0003DMG400025185	AT14A	ST4.03ch01:85652530-85654965	8,27	19,43	1,23
PGSC0003DMG400019398	Ubiquitin carrier protein	ST4.03ch10:5990806-5995117	71,20	163,26	1,20
PGSC0003DMG400028611	Peroxisomal membrane protein pmp34	ST4.03ch01:76509974-76514536	10,83	24,75	1,19
PGSC0003DMG402017902	Boron transporter	ST4.03ch01:35475706-35480057	12,74	28,89	1,18
PGSC0003DMG400033037	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	ST4.03ch06:51874727-51876278	114,93	259,56	1,18
PGSC0003DMG400007741	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch09:59455493-59457501	17,73	39,91	1,17
PGSC0003DMG400014607	Aspartyl protease family protein	ST4.03ch05:45880234-45881822	24,36	54,57	1,16
PGSC0003DMG400010049	Transferase, transferring glycosyl groups	ST4.03ch02:45018469-45021749	12,65	28,33	1,16
PGSC0003DMG400012848	AO (L-ASPARTATE OXIDASE)	ST4.03ch12:9517640-9524111	6,73	15,03	1,16
PGSC0003DMG400000067	Late embryogenesis (Lea)	ST4.03ch01:72741380-72743035	34,82	76,65	1,14
PGSC0003DMG400016908	Serine-threonine protein kinase, plant-type	ST4.03ch10:45023955-45025618	22,99	50,26	1,13
PGSC0003DMG400006217	C2 domain-containing protein	ST4.03ch10:42108079-42111048	30,97	67,03	1,11
PGSC0003DMG400019677	Elongation factor 1-alpha	ST4.03ch11:42006168-42008992	41,30	89,04	1,11
PGSC0003DMG400031079	Nodulin family protein	ST4.03ch11:3864017-3865958	41,97	90,39	1,11
PGSC0003DMG400010579	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch02:8632419-8635676	15,23	32,10	1,08
PGSC0003DMG400021213	Argonaute protein group	ST4.03ch02:28396110-28402652	23,00	48,11	1,06
PGSC0003DMG400001204	Gene of unknown function	ST4.03ch01:46348797-46349646	22,82	47,06	1,04

PGSC0003DMG400028462	ACRE 276	ST4.03ch02:31447686-31450302	17,55	36,08	1,04
PGSC0003DMG400029885	Kinase	ST4.03ch09:19231300-19235001	33,16	68,15	1,04
PGSC0003DMG400003040	Osmotin	ST4.03ch08:54278327-54279066	147,23	300,88	1,03
PGSC0003DMG400011624	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch09:11544875-11547147	41,36	84,46	1,03
PGSC0003DMG400007960	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:68016934-68018942	18,55	37,77	1,03
PGSC0003DMG400016877	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch12:58968088-58968608	9,29	1,01	-3,20
PGSC0003DMG400000546	UP-9A	ST4.03ch03:46709345-46710177	11,81	1,51	-2,97
PGSC0003DMG400020939	Sesquiterpene synthase 2	ST4.03ch09:59839769-59841971	2,70	0,60	-2,16
PGSC0003DMG400013015	N-acetyltransferase	ST4.03ch02:22769360-22771952	3,29	0,77	-2,09
PGSC0003DMG400007835	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch12:2447668-2448747	80,47	19,52	-2,04
PGSC0003DMG400009263	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch11:14210033-14211193	11,65	2,87	-2,02
PGSC0003DMG400017255	ATBET12	ST4.03ch09:55906711-55907293	30,00	7,40	-2,02
PGSC0003DMG400001655	Auxin-induced protein 6B	ST4.03ch01:86927636-86928507	20,78	5,28	-1,98
PGSC0003DMG400025721	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch07:39598009-39599161	131,14	34,42	-1,93
PGSC0003DMG400012791	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:52890179-52890825	16,10	4,49	-1,84
PGSC0003DMG400003339	F-box and wd40 domain protein	ST4.03ch04:69049778-69051761	2,56	0,73	-1,82
PGSC0003DMG400011282	Tryptophan synthase beta chain	ST4.03ch10:369865-372589	9,41	2,72	-1,79
PGSC0003DMG402012192	Zinc finger protein	ST4.03ch08:55075278-55076016	29,95	8,69	-1,79
PGSC0003DMG400008632	Chalcone synthase J	ST4.03ch12:58758676-58761269	6,11	1,79	-1,77
PGSC0003DMG400014461	Microsomal omega-6-desaturase	ST4.03ch12:49505060-49506441	8,29	2,54	-1,71
PGSC0003DMG400029628	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch09:58468014-58470814	13,51	4,15	-1,70
PGSC0003DMG400009876	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch04:71055248-71056275	13,21	4,09	-1,69
PGSC0003DMG400021499	Ctp synthase	ST4.03ch01:30833777-30843971	9,91	3,07	-1,69
PGSC0003DMG400015230	Pectate lyase	ST4.03ch03:51432583-51434561	49,34	15,80	-1,64
PGSC0003DMG400027705	Gene of unknown function	ST4.03ch10:48458622-48460178	7,49	2,43	-1,63
PGSC0003DMG400021397	Gene of unknown function	ST4.03ch02:42310662-42313425	7,84	2,57	-1,61
PGSC0003DMG400038556	RING-H2 finger protein ATL8	ST4.03ch03:3058483-3059020	27,70	9,50	-1,54
PGSC0003DMG401011095	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	ST4.03ch10:53942908-53952046	176,05	61,45	-1,52

PGSC0003DMG400000310	Gene of unknown function	ST4.03ch12:4463944-4466819	3,08	1,08	-1,52
PGSC0003DMG400029328	Ring finger protein	ST4.03ch12:57202182-57203287	15,38	5,63	-1,45
PGSC0003DMG400004030	Ubiquitin-protein ligase	ST4.03ch02:43586852-43589172	16,16	5,98	-1,43
PGSC0003DMG401030252	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:615360-617661	19,42	7,36	-1,40
PGSC0003DMG400009514	Kunitz-type protease inhibitor	ST4.03ch03:49941305-49942079	53,50	20,52	-1,38
PGSC0003DMG400023703	F-box family protein	ST4.03ch10:57368000-57369328	447,86	172,18	-1,38
PGSC0003DMG400010402	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch02:22500833-22502119	12,92	4,98	-1,38
PGSC0003DMG400016650	Expansin	ST4.03ch06:33813804-33815587	152,91	59,69	-1,36
PGSC0003DMG400039214	Arachidonic acid-induced DEA1	ST4.03ch08:52521962-52522379	183,30	74,59	-1,30
PGSC0003DMG402022984	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch07:6065806-6066459	99,29	40,50	-1,29
PGSC0003DMG400022762	F-box family protein	ST4.03ch08:54028895-54031633	29,17	12,08	-1,27
PGSC0003DMG400015853	EIN3-binding F-box protein 1	ST4.03ch08:15998652-16002234	169,66	71,68	-1,24
PGSC0003DMG401018223	Ferric-chelate reductase	ST4.03ch01:79287173-79291540	88,35	38,03	-1,22
PGSC0003DMG400021740	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch08:34252755-34254124	30,35	13,10	-1,21
PGSC0003DMG400005528	DNA binding protein	ST4.03ch10:5054699-5056343	18,79	8,27	-1,18
PGSC0003DMG400009513	Aspartic protease inhibitor 5	ST4.03ch03:49930057-49930845	67,37	29,83	-1,18
PGSC0003DMG400029624	S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase	ST4.03ch09:58420149-58422045	53,10	23,72	-1,16
PGSC0003DMG400015425	SRE1a	ST4.03ch12:56838739-56841549	157,71	71,56	-1,14
PGSC0003DMG400003565	DnaJ	ST4.03ch02:39343659-39344698	527,93	245,03	-1,11
PGSC0003DMG400029719	Rnf5	ST4.03ch02:34039088-34041358	30,60	14,22	-1,11
PGSC0003DMG400033123	Basic 7S globulin 2 small subunit	ST4.03ch01:61708126-61709740	75,82	35,25	-1,11
PGSC0003DMG400027839	Gene of unknown function	ST4.03ch01:57016804-57017446	93,54	44,37	-1,08
PGSC0003DMG400012646	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch02:47660884-47664620	23,11	11,07	-1,06
PGSC0003DMG400020136	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1	ST4.03ch06:58936956-58943104	50,46	24,60	-1,04
PGSC0003DMG400000706	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:85915200-85919260	66,72	32,77	-1,03
PGSC0003DMG400015442	Conserved gene of unknown function	ST4.03ch12:56665289-56666469	94,95	46,83	-1,02
PGSC0003DMG400004099	Gene of unknown function	ST4.03ch07:10923635-10924432	0,45	0,00	(-inf)

Tabla 9: Genes diferencialmente expresados en ambas variedades de papa pero en distintos sentidos.

Gen	Locus	Resistente			Susceptible			R+ S-	R- S+
		FPKM Control	FPKM 0°C	log2 (fold_change)	FPKM Control	FPKM 0°C	log2 (fold_change)		
UDP-glucose dehydrogenase 2	ST4.03ch02:45703123-45706234	31,40	62,28	0,99	56,42	26,14	-1,11	x	
Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	ST4.03ch12:25639911-25643687	8,44	19,31	1,19	25,19	4,32	-2,55	x	
Glutathione s-transferase	ST4.03ch12:47549030-47550979	4,06	16,77	2,04	6,32	0,54	-3,55	x	
BCS1 protein	ST4.03ch10:2347928-2349623	7,88	23,81	1,60	10,16	4,36	-1,22	x	
Flavonoid glucosyltransferase UGT73E2	ST4.03ch12:49623829-49625982	2,65	8,65	1,71	22,79	4,80	-2,25	x	
MYB transcription factor MYB139	ST4.03ch06:5965435-5966610	46,50	18,88	-1,30	4,65	23,20	2,32		x
Conserved gene of unknown function	ST4.03ch02:47659471-47660271	17,98	43,14	1,26	32,29	9,03	-1,84	x	
Conserved gene of unknown function	ST4.03ch01:83914614-83916464	63,13	27,44	-1,20	0,73	3,83	2,38		x
Conserved gene of unknown function	ST4.03ch07:6068690-6069665	10,79	1,93	-2,48	2,57	8,97	1,81		x