

**UNIVERSIDAD PARA EL DESARROLLO
ANDINO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A FACTORES
ABIÓTICOS QUE AFECTAN NEGATIVAMENTE EL
RENDIMIENTO DE LOS CULTIVARES DE PAPA (*Solanum
tuberosum L.*)**

PRESENTADO POR:

Dra. MARGOT MITCHELA MORENO VIGO

**ANGARAES-HUANCAVELICA – PERÚ
2013**

ÍNDICE

I. DATOS INFORMATIVOS	2
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2.1. Fundamentación del Problema.....	2
2.2. Formulación del problema	2
2.3. Objetivos de la investigación	2
2.3.1. Objetivos generales	2
2.3.2. Objetivos específicos.....	3
2.4. Hipótesis	3
2.5. Justificación del estudio.....	3
III. MARCO TEÓRICO	3
3.1. Antecedentes de la investigación.	3
IV. METODOLOGÍA.....	5
4.1. Tipo y nivel de investigación.....	5
4.2. Método de la investigación	5
4.3. Diseño de la investigación	6
4.3.1. Estudio de expresión diferencial de proteoma a gran escala:.....	6
4.3.2. Análisis de abundancia de transcritos a nivel de RNA mensajero:.....	7
4.3.3. Estandarización del test de Polimerase Chain Reaction (PCR) convencional: ...	7
4.4. Población y muestra.....	7
4.5. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	7
V. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	10
5.1. Presupuesto	10
5.2. Bienes.....	10
5.3. Servicios.....	10
5.4. Cronograma	11
5.5. Financiamiento.....	11
VI. BIBLIOGRAFIA.....	12

I. DATOS INFORMATIVOS

- 1.1 Facultad : Ciencias e Ingeniería
1.2 E.P. : Ciencias Agrarias
1.3 Título : “Identificación de Marcadores Moleculares Relacionados con La Resistencia a Factores Abióticos que afectan Negativamente el Rendimiento de los Cultivares de Papa (*Solanum Tuberosum L.*)”
- 1.4 Investigador(a): Demetrio López Portilla y Carlos Portales Zeballos
1.5 Duración : Inicio: Enero 2014
Final: Julio 2016

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1.Fundamentación del Problema

Las heladas constituyen el factor abiótico más importante que afecta la productividad de los cultivares de papa en el Perú. Según el CIP y la coordinadora Nacional de productores de papa, en el 2012 se sembraron 319,000 Has. Y aproximadamente el 50% fue afectadas por las heladas.

Las bajas temperaturas impiden que la planta complete su ciclo vegetativo, en consecuencia no alcanzan los tamaños ideales para el mercado.

La comunidad científica viene descubriendo marcadores de resistencia a factores abióticos, sin embargo poco se ha descrito con relación a marcadores de factores abióticos, especialmente heladas.

2.2.Formulación del problema

¿Cuáles son los genes relacionados con la resistencia a heladas en el cultivo de papa?

2.3.Objetivos de la investigación

2.3.1.Objetivos generales

- Determinar los genes relacionadas con la resistencia a heladas a través de un análisis proteómico y transcriptómico.

2.3.2. Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar las proteínas que podrían estar implicadas en el fenotipo de resistencia a heladas.
- Verificar si existe correlación entre la proteína y la abundancia del transcrito.
- Estandarizar un test de PCR para determinar si los genes que codifican las proteínas candidatas correlacionan con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad

2.4. Hipótesis

La determinación de marcadores moleculares de resistencia a heladas podría contribuir al mejoramiento genético molecular de forma más rápida y efectiva, auxiliando a los mejoradores en la decisión de los parentales a usar en los cruces.

2.5. Justificación del estudio

La determinación de marcadores moleculares de resistencia a heladas podría contribuir al mejoramiento genético molecular de forma más rápida y efectiva, auxiliando a los mejoradores en la decisión de los parentales a usar para los cruces.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes de la investigación.

Los factores bióticos constituyen la amenaza más significativa a la producción de papa en el mundo, de éstos el Tizón tardío, enfermedad causada por el patógeno oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) es el que más daños causa. En este sentido, en nuestro país el Centro Internacional de la papa (CIP) ha venido trabajando en la búsqueda de marcadores moleculares de resistencia a este hongo [2,3] y a otros factores bióticos como virus [4]. Igualmente la comunidad científica ha descrito marcadores de resistencia a otros agentes bióticos como la verruga de la papa [5,6]. Por otro lado, probablemente el factor abiótico más investigado, con relación a genes de resistencia ha sido la sequía. En este sentido los estudios apuntan a que la supresión o disminución de transcritos de genes relacionados con fotosíntesis está relacionada con la respuesta a estrés hídrico [7,8]. Así como el aumento de actividad de enzimas de barrido de

especies reactivas de oxígeno [9] y a la acumulación de prolina y metabolitos de bajo peso molecular como ascorbato y α -tocoferol [7]. Otros genes como el PR10 aislado de la variedad de papa Desiree [10] y el gen StDREB1 [11] han mostrado una correlación positiva con el fenotipo de resistencia a sequía.

En el Perú actualmente existe 319 mil hectáreas sembradas de papa y de las cuales, el 50% son afectadas por heladas, constituyéndose así en el factor abiótico más importante que perjudica la productividad de los cultivares. Las bajas temperaturas impiden que la planta complete su periodo vegetativo y en consecuencia no se alcancen los tamaños ideales del mercado. A pesar de los estupendos avances en la obtención de variedades mejoradas resistentes a heladas, todavía poco se ha investigado con relación a marcadores de resistencia a las heladas y es aquí donde centraremos la investigación.

En nuestro país el Instituto de Innovación Agraria (INIA) y el CIP han realizado un excelente trabajo de mejoramiento genético clásico de papa. El año 2012 presentaron un catálogo de 13 variedades resistentes a heladas y sequía aptas para cultivarse desde los 200 hasta los 4,200 msnm. Estas variedades son: Altiplano, Punenita, Venturana, Roja ayacuchana, Antañita, Tocasina, Wanquita, Puca Lliclla, Pallay Poncho, Chujmarina, Serranita, Colparina y Maria Bonita. Plántulas de estas variedades serán utilizadas en los experimentos que plantea este trabajo de investigación.

En papa, a pesar del avance importante en las investigaciones a nivel de genoma [1] y transcriptoma pocos estudios existen a nivel de proteoma. Consideramos que para la exploración de candidatos de marcadores moleculares a nivel génico, se debe llevar en consideración la expresión de los mismos a nivel de proteína. Para la realización de los experimentos de análisis de expresión a gran escala se utilizará proteómica de segunda generación. Su precisión, exactitud y robustez de la tecnología permitirá identificar potenciales candidatos a nivel de proteína, así como determinar sus niveles de expresión con relación al proteoma entero o a subproteomas. Adicionalmente podremos realizar una comparación del nivel de oxidación de los proteomas.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo y nivel de investigación

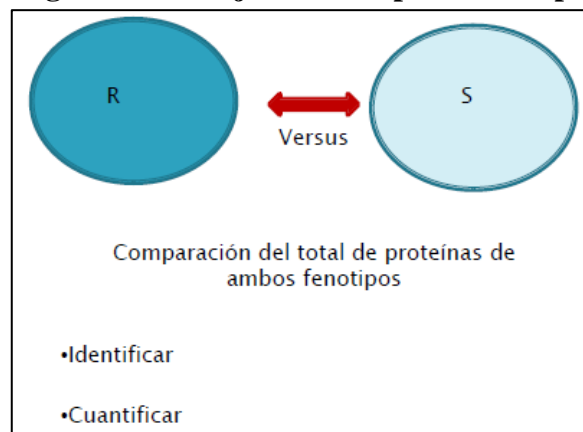
Este estudio es de tipo Explicativo-Experimental

4.2. Método de la investigación

A. Primera etapa: Análisis proteómico a gran escala usando espectrometría de masas.

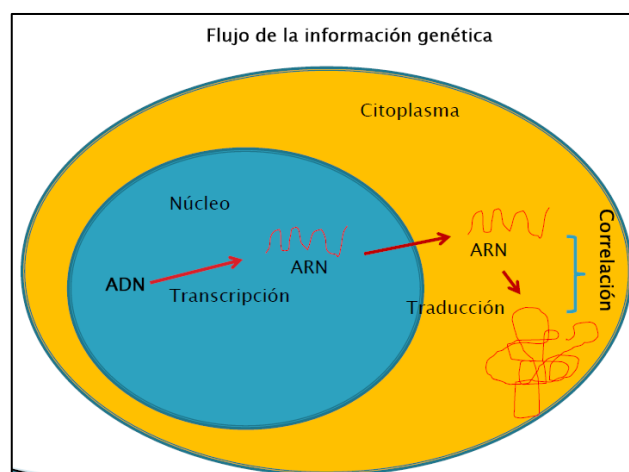
Se buscará identificar y cuantificar las proteínas que podrían estar implicadas en el fenotipo de resistencia a heladas.

Figura N° 1. Objetivo de la primera etapa



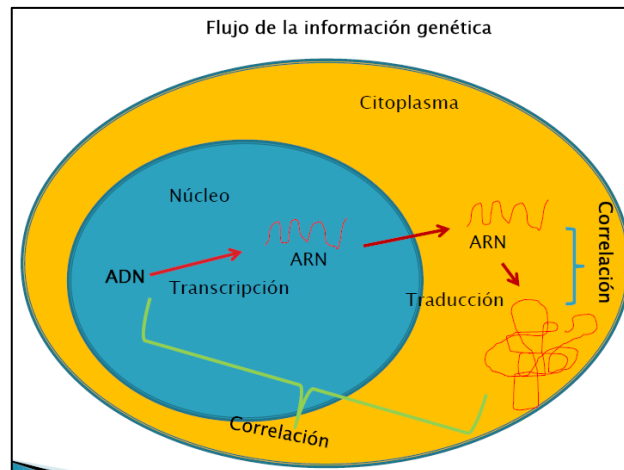
B. Segunda etapa: Análisis de abundancia de transcritos (ARN mensajero), usando RT-PCR (Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real). En esta etapa se desea verificar si existe una correlación entre la proteína y la abundancia del transcrito.

Figura N° 2. Metodología para encontrar la correlación ARN-proteína



C. Tercera etapa: Análisis a nivel genómico usando PCR. Estandarizar un test de PCR para determinar si los genes que codifican las proteínas candidatas correlacionan con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad.

Figura N° 3. Correlación proteínas-ADN



4.3. Diseño de la investigación

4.3.1. Estudio de expresión diferencial de proteoma a gran escala:

Se seleccionaron plántulas de una variedad de papa muy resistente a helada y otra susceptible. El proteoma total (producto de la expresión de todo el genoma) será extraído después de la exposición de ambas muestras a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se espera obtener la información de las proteínas más abundantes después de la exposición de las plántulas (resistentes y susceptibles) a bajas temperaturas. Los datos serán tratados por herramientas de bioinformática que usan algoritmos para el análisis de este tipo de datos proteómicos.

Se debe resaltar que el proteoma de un organismo está compuesto de miles de proteínas, por lo cual, el trabajo de bioinformática para el análisis de estos datos es de vital importancia.

4.3.2. Análisis de abundancia de transcritos a nivel de RNA mensajero:

Con la abundancia a nivel de RNA mensajero se realizará un análisis de Real Time Polimerase Chain Reaction (RT-PCR). Estos resultados indicarán si existe una correlación entre la abundancia de transcritos y el nivel de proteína.

4.3.3. Estandarización del test de Polimerase Chain Reaction (PCR) convencional:

Una vez identificadas las proteínas que podrían ser marcadores de tolerancia (o susceptibilidad) a bajas temperaturas, se amplificaran los genes a partir del genoma entero. Una vez estandarizado dicho test, se aplicará en muestras conocidas para tolerancia y susceptibilidad a bajas temperaturas, verificando su correlación con los fenotipos correspondientes. El test estandarizado y probado, puede ser aplicado en muestras cuyos fenotipos de tolerancia y susceptibilidad a heladas no es conocido.

4.4.Población y muestra

Se seleccionaran genotipos mejorados y que han sido liberados por el INIA en colaboración con el CIP, entre ellas, son candidatas las siguientes:

- Altiplano,
- Punenita,
- Venturana,
- Roja ayacuchana,
- Antañita,
- Tocasina,
- Wanquita,
- Puca Lliclla,
- Pallay Poncho,
- Chujmarina,
- Serranita,
- Colparina y
- Maria Bonita

4.5.Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

4.5.1. Proteómica de segunda generación:

Para realizar los análisis proteómicos a gran escala se usará la espectrometría de masas (EM) y HPLC. Esta tecnología es muy precisa, exacta y robusta. Además, esta

tecnología permitirá comparar el estado de oxidación de las muestras en cuestión. Este aspecto es interesante visto que al parecer en otro factor abiótico como la sequía el estado de oxidación de las proteínas parece tener un papel importante (referencia). La oxidación de cisteínas, por ejemplo, es una modificación post traduccional (MPT) que puede determinar la funcionalidad de la proteína: es decir. Así como la presencia de un gen no garantiza su expresión, de igual forma la expresión de la proteína no garantiza su viabilidad, de ahí la importancia de estudiarlas.

A. Marcaje y Generación de cromatogramas

Para la cuantificación de las proteínas en las dos mezclas complejas, las mismas serán digeridas con tripsina por separado, generando péptidos que luego serán marcados diferencialmente con isótopos 160/180. Ambas poblaciones de péptidos marcados o etiquetados serán mezclados y entonces sometidos a una separación por punto isoelectrico, obteniéndose de esta forma fracciones conteniendo péptidos que serán separados por HPLC y luego analizados por EM. Los péptidos de cada fracción a analizar serán ionizados; los iones entonces serán diferenciados por el analizador en función de su relación m/z que produce una señal eléctrica que es amplificada por un detector que se traduce en cromatogramas [16].

B. Identificación de péptidos y análisis de datos.

La base de datos de papa (*Solanum tuberosum*), tripsina bovina, tripsina porcina y keratina humana serán descargadas de European Bioinformatics Institute Website. La identificación a gran escala de péptidos en las bases de datos a partir de los espectros de masa se realizaran usando el algoritmo SEQUEST (Bioworks 3.2 package, Thermo Finnigan). Adicionalmente, las búsquedas incluirán la modificación variable en cisteína para identificar oxidación en las mismas; también oxidación en metionina.

4.5.2. Análisis de expresión a nivel de ARN mensajero:

El producto final de la expresión de un gen es la proteína, pero el primer producto de la expresión de un gen es el ARN (ácido ribonucleico) que por su vez será traducido en proteína. Es verdad que ni todo el ARN que codifica una proteína (ARN mensajero) es traducido. Se pretende realizar estudios de abundancia de ARN mensajero transcritos

para verificar si existe una correlación con la abundancia de proteína, para esto se utilizará ensayos de Real Time Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)

A. Extracción de RNA y diseño de oligonucleótidos iniciadores.

El RNA total será extraído de cada una de las muestras, usando el método de Trizol (se usará el kit comercial, probablemente de la marca Invitrogen). Para los ensayos de RT-PCR se utilizará pares de oligonucleótidos iniciadores para cada uno de los candidatos. Los oligonucleótidos serán diseñados usando el programa Primer Express Software - Applied Biosystems.

B. Análisis de los datos.

Se utilizará como normalizador un gen housekeeping. Éste será escogido de la lista generada en los análisis proteómicos. Para la determinación de la abundancia relativa de los transcritos y posterior análisis de las razones de expresión se utilizará el método comparativo AACt [18].

Análisis genómicos. Los análisis proteómicos usando espectrometría de masas son caros, por lo cual el diseño experimental plantea verificar los resultados a nivel genómico usando Polimerase Chain Reaction (PCR) en un termociclador convencional. Esta técnica es de uso rutinario en laboratorios de biología molecular y mucho más barata.

El objetivo al usar una tecnología de punta como la proteómica de segunda generación es detectar de forma exacta y efectiva los genes que realmente están siendo expresados y podrían tener un papel en la generación del fenotipo de tolerancia a bajas temperaturas, una vez identificado los candidatos en el último nivel de expresión de los genes, el trabajo con todas las demás muestras, se realizarán a nivel de gen con una tecnología más barata y a pequeña escala.

Los oligonucleótidos iniciadores específicos de los genes candidatos serán diseñados y las condiciones de PCR serán ajustadas a cada caso. La presencia o ausencia de producto de amplificación, indicará la validez del marcador como separador de grupo. Al aplicar el test a más muestras, la validación estadística se realizará mediante t-Student para demostrar la significancia estadística.

V. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

5.1.Presupuesto

	Monto (S/.)
EQUIPOS Y BIENES DURADEROS	128,700
RECURSOS HUMANOS (HONORARIOS)	50,000
SERVICIOS TECNOLOGICOS (TERCEROS)	16,500
PASAJES Y VIATICOS	10,000
MATERIALES E INSUMOS	68,000
OTROS GASTOS ELEGIBLES	23,200.00
GASTOS DE GESTION	18,582
	314,982.00

5.2.Bienes

Laboratorio de biotecnología equipado con:

- Tres estufas de esterilización.
- Dos autoclaves
- Dos baños maría automáticos
- Una estufa de cultivo de bacterias
- Microscopio de transmisión de luz con cámara acoplada.
- Dos refrigeradores – 20 grados.
- Una biocámara.
- Vidriería de laboratorio
- Una balanza analítica
- Tres balanzas digitales

5.3.Servicios

- Servicio de análisis proteómico en laboratorio externo

5.4.Cronograma

2014	Enero	Extracción de las proteínas
	Febrero	
	Marzo	
	Abril	
	Mayo	Análisis proteómicos y bioinformáticos
	Junio	
	Julio	
	Agosto	
	Setiembre	
	Octubre	
	Noviembre	
	Diciembre	
2015	Enero	Selección de los candidatos para confección de iniciadores
	Febrero	
	Marzo	
	Abril	
	Mayo	
	Junio	Ensayos de RT-PCR
	Julio	
	Agosto	
	Setiembre	
	Octubre	Diseño de primers y prueba de los mismos
	Noviembre	
	2016	Diciembre
Enero		
Febrero		
Marzo		cierre de proyecto
Abril		
Mayo		
Junio		
Julio		
Agosto		
Setiembre		
Octubre		

5.5.Financiamiento

- Recursos propios de la Universidad para el Desarrollo Andino.
- Fuentes de financiamiento a través de Fondos concursables como FINCYT y FONDECYT y/o a través del CONCYTEC.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Potato Genome Sequencing Consortium. 2011. Genome sequence and Analysis of the tuber crop potato. *Nature* v. 475. p.189-1995.
2. Lindqvist-Kreuze, H. 2013. Comunicación oral.
3. Li, J. et al. 2012. Conditional QTL underlying resistance to late blight in a diploid potato Population. *Theor. Appl. Genet* v. 124, p 1339-1350.
4. Aponte, M. 2013. Comunicación oral.
5. Groth, J. et al. 2013. Molecular characterisation of resistance against potato wart races 1,2,6 and 18 in a tetraploid Population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*). *J. Appl. Genet.* v 54, p 169-178.
6. Ballvora, A., et al. 2011. Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes. *Theor. Appl. Genet* v. 123, p 1281-1292.
7. Gururani, M.A et al. 2013. Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression. Of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Sci.* v. 198, p 7-16.
8. Kondrak, M. et al. 2012. Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.* v 30, p 12-74.
9. Ambrosone A, et al. 2013. Identification of early induced genes upon water deficit in potato cell cultures by cDNA-AFLP. *Plant Res.*, v 126, p 169-178.
10. Hanafy, M.S. et al. 2013. Enhanced tolerance to drought and salt stresses in transgenic faba bean (*Vicia faba* L.) plants by heterologous expression of the PR10 a gene from potato. *Plant Cell Rep.*, v 32, p 663-674.
11. Bouaziz D., et al. 2013. Overexpression of StDREB1 transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants. *Mol Biotechnol*, v 54, p 803-817.
12. Silva-Sanchez C., et al. 2013. Proteomic comparison of basal endosperm in maize miniature 1 mutant and its wild-type Mn1. *Front Plant Sci.*, v 25, p4:211.
13. Yang, L., et al. 2013. Proteomic Analysis of salt tolerance in sugar beet monosomic addition Line M14. *Proteome Res.* In press.
14. Martínez-Acedo, P. 2012. A novel strategy for global Analysis of the dynamics thiol redox proteome. *Mol. Cell Proteomics*, v 11, p 800-813.

15. Kim, Y.H. 2011. Transgenic poplar expressing Arabidopsis NDPK2 enhances growth as well as oxidative stress tolerance. *Plant. Biotechnol J*, v 9, p 334-347
16. Bonzon-Kulichenko E. et al. 2011. A Robust Method for Quantitative High-throughput Analysis of Proteomes by ¹⁸O Labeling. *Mol Cell Proteomics*. 10(1): M110.003335.
17. Martínez-Acedo P. et al. 2012. A Novel Strategy for Global Analysis of the Dynamic Thiol Redox Proteome. *Mol Cell Proteomics* 11(9): 800-813.
18. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.