

	FICHA TÉCNICA		
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62

1 IDENTIFICACION GENERAL DEL PROYECTO

Nombre del Proyecto Caracterización de la respuesta fisiológica de genotipos de papa diploide (Grupo Phureja) y determinación de la expresión diferencial de genes en dos genotipos de papa (<i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja) bajo condiciones de estrés por alta temperatura.
Objetivo principal: Caracterizar la respuesta fisiológica de 60 genotipos de papa diploide y determinar la expresión génica en dos genotipos de papa diploide (<i>S. tuberosum</i> L. Grupo Phureja), al estrés por alta temperatura
Duración: Vigencia 2021
Valor Total del Proyecto: \$ 268.799.600
Cofinanciación: FNFP: \$ 113.300.000 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA: \$140.496.128 FEDEPAPA: \$15.003.472
Cobertura: Nacional
Fecha preparación proyecto: Octubre 2020
Fecha última modificación: Enero 2021
Describa brevemente en que consiste el proyecto La variabilidad climática actual presenta retos importantes para la producción agrícola debido a que los sistemas productivos son altamente vulnerables dada su baja capacidad de adaptación en el corto plazo. Para el cultivo de papa se estima una reducción de la productividad entre el 25-38% para el año 2070 debido a un incremento de temperatura en las zonas aptas para el cultivo, por lo tanto, es necesario entender los mecanismos genéticos y fisiológicos que explican dicha tolerancia. Esto, con el propósito de avanzar y consolidar en el mediano plazo, procesos de selección de genotipos usando germoplasma local, que tolere la condición de estrés por alta temperatura. La Facultad de Ciencias Agrarias de la UNC-Bogotá cuenta con una colección de trabajo de papas diploides (<i>Solanum Tuberosum</i> Grupo Phureja) representativa de su diversidad en el país, que está siendo evaluada en cuanto a su respuesta fisiológica, sin embargo, aún se desconoce el contexto genético asociado a esta respuesta, la cual es una herramienta de gran valor para el desarrollo de un programa de mejoramiento orientados a obtener materiales tolerantes.



FICHA TÉCNICA



VERSIÓN: 03

FECHA: 20-05-2020

CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62

El objetivo de esta propuesta es caracterizar la respuesta fisiológica de 60 genotipos de la colección de papas diploides y determinar la expresión génica y los posibles mecanismos moleculares de aclimatación en dos genotipos de papa diploide (*S. tuberosum* L. Grupo Phureja), como respuesta a estrés por alta temperatura. La investigación que se está adelantando permitirá seleccionar dos genotipos, uno tolerante y uno susceptible al estrés por alta temperatura los cuales, bajo condiciones controladas serán sometidos a estrés por alta temperatura, [38°C/24°C (día/noche)] por 48 horas en condiciones controladas, en la etapa inicial de tuberización. La determinación de la expresión diferencial de genes y de los posibles mecanismos moleculares asociados de aclimatación al estrés por alta temperatura en estos genotipos se realizará mediante el análisis de RNAseq a las 0, 2 y 48 horas de estrés y a las 24 horas después de finalizado el estrés (estado de recuperación). Para el ensamblaje del transcriptoma, análisis de las secuencias y anotación se emplearán diferentes programas bioinformáticos. Con base en los resultados obtenidos en este estudio y la literatura reportada, se definirán los mecanismos de aclimatación empleados por estos genotipos del Grupo Phureja a nivel molecular y fisiológico que expliquen su comportamiento global ante el estrés por alta temperatura. La papa cuenta con una amplia gama de recursos genómicos/transcriptómicos, por lo cual, los datos que se generarán en la presente investigación podrán ser analizados en un marco comparativo con datos de secuenciación, fenotípicos y de asociación producidos por diversos grupos de investigación en materiales de papa de diferentes partes del mundo, lo que se constituye en un valor agregado para el presente proyecto. La información generada podrá ser validada y utilizada en la selección temprana de genotipos tolerantes a alta temperatura, en los programas de mejoramiento. El proyecto usará y valorizará la agrobiodiversidad del cultivo presente en el germoplasma de papa y se ejecutará un taller participativo para la comunicación de los resultados obtenidos a la comunidad de productores de papa e integrantes del sector productivo, con el propósito que se reconozca la importancia de la agrobiodiversidad del cultivo, y su uso como herramienta para desarrollar tecnologías que puedan mitigar el escenario presente de variabilidad climática.

Proponente:

FEDEPAPA - FONDO NACIONAL DE FOMENTO DE LA PAPA – FNFP UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE BOGOTA. FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Ejecutor:

FEDEPAPA – FNFP - UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE BOGOTA. FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

2 INFORMACIÓN DEL PROYECTO

2.1 ESTADO DEL ARTE

2.1.1 Importancia del cultivo de papa

La papa es el tercer cultivo alimentario más importante después del arroz y el trigo con una producción de 376 MT (FAO, 2018). Los principales productores de papa a nivel mundial son China, Holanda, Rusia, Estados Unidos, India, Polonia, Ucrania, Perú, Bolivia, Chile y Canadá. Se cultivan papas en una superficie estimada de 195.000 kilómetros cuadrados de tierras agrícolas (FAO, 2016). En Colombia, de acuerdo con Fedepapa (2018), el cultivo se desarrolla en la zona andina fría por encima de los 2300 msnm, la característica principal del cultivo es ser minifundista en su mayoría (90% aproximadamente) y estar ubicado en zona de ladera principalmente. Con una producción total estimada de 2'700.000 toneladas, se tiene un rendimiento promedio de 21,5 Ton/Ha. En Colombia se cultiva el grupo Andígena, adaptada a días cortos y con un ciclo vegetativo que oscila entre 150 a 185 días aproximadamente y la papa criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja), cuyo ciclo es de 120 días aproximadamente. La producción se orienta exclusivamente al mercado local y se comercializa por diferentes canales desde plazas de mercado hasta grandes superficies, el consumo per cápita es de 45 Kg/año (Fedepapa, 2018). La papa es a menudo la fuente principal de los ingresos y la seguridad alimentaria en los países en desarrollo (Lutaladio & Castaldi, 2009), donde la población aumenta más que cualquier otra región en el mundo (Lutz & Kc, 2010).

S. tuberosum Grupo Phureja, es una especie diploide, adaptada a días cortos, sin tiempo de reposo del tubérculo, se caracteriza por tener una producción precoz en comparación con variedades de *S. tuberosum* L. (Rodríguez, 2009). Las condiciones agroecológicas óptimas para su cultivo son alturas entre los 2,300 y los 2,800 msnm, temperaturas promedio de 10 °C a 20 °C, precipitaciones promedio de 900 mm/anual; aunque, el cultivo se desarrolla bien con precipitaciones superiores (Cevipapa, 2005). Colombia se ubica

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

como el mayor productor, consumidor y exportador de papas diploides a nivel mundial (Rodríguez, 2009); los principales departamentos productores son Nariño, Cundinamarca, Boyacá y en menor proporción Antioquia, Norte de Santander y Santander (Cevipapa, 2005). En Colombia el área cultivada representa aproximadamente el 6% del área sembrada, con exportaciones cercanas a 1.000 Ton/ año (Fedepapa, 2018). Para Colombia, *S. tuberosum* Grupo Phureja representa un recurso genético de gran importancia considerando las propiedades del cultivo a nivel nutricional, cualidades culinarias, economía y potencial de exportación.

La Colección de trabajo de la Universidad Nacional de Colombia de la sede Bogotá – Facultad de Ciencias Agrarias, cuenta con 110 accesiones. De acuerdo con lo reportado por Piñeros (2009), se han realizado trabajos de investigación en diferentes tópicos; sin embargo, el rasgo de tolerancia a estrés por alta temperatura, no ha sido estudiado.

2.1.2 Calentamiento global y producción de papa

Pachauri et al., (2014), define el cambio climático como una alteración en el estado del clima que puede identificarse por cambios en la media y/o la variabilidad de sus propiedades, y que persiste durante un período prolongado, típicamente décadas o más. Es decir, se refiere a cualquier cambio en el clima que se presenta a lo largo del tiempo, ya sea debido a la variabilidad natural o como resultado de la actividad humana. En el 2016, el mismo IPCC define al calentamiento global como el aumento reciente y en curso de la temperatura de la superficie terrestre. Los efectos del cambio climático son de alcance mundial y varían de una región a otra, y tienen implicaciones importantes para la hidrología y los recursos hídricos a escala mundial, regional y local (Yang et al., 2012). La Variabilidad climática incluye el incremento en temperatura ambiental, alteraciones en las precipitaciones, y cambios en la composición atmosférica entre otros.

La emisión y acumulación de gases efecto invernadero, han conducido a la variación en la composición proporcional de la atmósfera, incrementando principalmente el CO₂ y el

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

NH₄ (Pachauri et al., 2014). Según Tubiello et al. (2007), un incremento en el dióxido de carbono elevaría la tasa fotosintética de las plantas y por consiguiente incrementaría el rendimiento. Los efectos del calentamiento global incluyen un aumento en la temperatura atmosférica, que de acuerdo con el IPCC, ha sido 0.74 °C desde 1906 hasta 2005 (Pachauri et al., 2014). Cada uno de los tres últimos decenios ha sido sucesivamente más cálido en la superficie de la Tierra que cualquier decenio anterior desde 1850. Es muy probable que el período entre 1983 y 2012 haya sido el período más cálido de los últimos 800 años en el hemisferio norte, y es probable que sea el período de 30 años más cálido de los últimos 1400 años (Pachauri et al., 2014). En Colombia de acuerdo con el IDEAM et al. (2014), se ha evidenciado un aumento de la temperatura media del orden de 0,13°C/década para 1971-2000 y el ensamble multimodelo de los escenarios de cambio climático proyectan que la temperatura promedio del aire en el país aumentará con respecto al período de referencia 1971-2000 en 1,4°C para el 2011-2040, 2,4°C para 2041-2070 y 3,2°C para el 2071-2100.

El estrés por alta temperatura es definido como la elevación de la temperatura por un periodo lo suficientemente prolongado como para causar daños irreversibles en el metabolismo y el desarrollo de las plantas; es un fenómeno complejo que involucra la duración del estrés, la tasa de su incremento y las temperaturas máximas alcanzadas (Porch, T. Hall, 2013) El aumento de temperatura es uno de los factores que tiene mayor impacto a nivel de la producción vegetal y que puede causar una reducción en los rendimientos de la producción de papa que pueden estar entre el 10%-19% en 2010-2039, y entre el 18-32% en los años 2050 (Hijmans, 2003); (Hancock et al., 2014), además de una alteración de los patrones de crecimiento y desarrollo y por tanto, se espera una reducción de la fase de crecimiento vegetativo (Eyshi Rezaei, Webber, Gaiser, Naab, & Ewert, 2015). Adicionalmente, se espera alteraciones fisiológicas como una reducción de la biosíntesis de la clorofila (Efeoğlu, Ekmekçi, & Çiçek, 2009), daño en membranas celulares causado por peroxidación lipídica inducida por alta temperatura (Parankusam, Bhatnagar-Mathur, & Sharma, 2017), entre otros. Hijmans (2003) estimó los efectos del calentamiento global en la producción de papa en diferentes regiones del mundo y

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

concluyó que el rendimiento potencial mundial de la papa podría disminuir entre un 18% y un 32% sin adaptación y entre un 9% y un 18% con adaptación. Su estimación de la disminución del rendimiento de la papa en Turquía fue del 36,7% sin adaptación y del 17,1% con adaptación.

En Colombia a la fecha no se han realizado estudios de estrés por alta temperatura con variedades locales, lo cual se constituye en un campo de estudio necesario para el diseño e implementación de estrategias de adaptación a la variabilidad climática -calentamiento global.

2.1.3 Efecto del aumento de la temperatura en variables relacionadas con fotosíntesis

El estrés por alta temperatura afecta notablemente el estado del agua en las hojas y la concentración intracelular de CO₂ (Greer & Weedon, 2012). Se ha encontrado que los estomas foliares permiten que la planta se adapte rápidamente a cambios en los estímulos bióticos y abióticos (Chaves, Maroco, & Pereira, 2003). De acuerdo con Efeoğlu et al. (2009), la planta expuesta a estrés por alta temperatura muestra una reducción de la biosíntesis de la clorofila (Chl). La menor acumulación de Chl en plantas estresadas por alta temperatura se pueden atribuir tanto a la menor síntesis de Chl como su degradación acelerada o una combinación de ambos. Se ha encontrado que la inhibición de la biosíntesis de Chl en alta temperatura resulta de la denaturación de numerosas enzimas involucradas su biosíntesis (Efeoğlu et al., 2009). En respuesta al estrés por altas temperaturas (38°C /28°C), en soja se observó una disminución en el contenido total de Chl, el contenido de Chl a, la relación Chl a/b, el contenido de sacarosa y un aumento en el contenido de azúcares reductores así como de azúcares solubles en la hoja (Hasanuzzaman, Nahar, Alam, Roychowdhury, & Fujita, 2013). De acuerdo con Hancock et al. (2014), en plantas de papa, de la variedad Desiree que se sometieron estrés térmico durante una semana a 30/20 °C (día/noche), hubo disminuciones significativas de hasta 20% en los niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides).

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Resultados experimentales preliminares realizados por Acevedo *et al* (resultados no publicados) se determino que para papa diploide (*S. Tuberosum* Grupo Phureja) de las variedades mejoradas Criolla Colombia, Violeta y Paola sometidas a temperaturas día/noche de 38°C/24°C y 40°C/25°C evaluadas con respecto al testigo a temperatura ambiente media 18°C/12°C, existió una reducción en el contenido relativo de clorofilas, siendo estadísticamente diferentes los tratamientos al testigo, e iguales entre si, lo que permite determinar que para la evaluación de estos materiales diploides la temperatura optima entre las evaluadas es de 38°C/24°C (día/noche).

En el aparato fotosintético el fotosistema II (PSII) es considerado como el más sensible a alta temperatura (Cajbek, Storch, Lachetovri, & Kalina, 1998). Los dos factores que hacen que el transporte de electrones en el PSII sea más susceptible al estrés por alta temperatura son el aumento de la fluidez de las membranas tilacoides que causa el desacople del complejo del PSII de la membrana tilacoide y la necesidad de la integridad del PSII para que se de el transporte de electrones a través del PSII. El estudio de las respuestas del PSII puede revelar los efectos primarios del estrés por alta temperatura en plantas (Parankusam et al., 2017). Dentro de este complejo están las clorofilas a y b, los complejos aceptores de oxígeno y los centros de reacción lumínica o antenas (Allahverdiyeva et al., 2013) La susceptibilidad a alta temperatura en especies de plantas varía entre genotipos y etapas de desarrollo (Camejo et al., 2005; Wahid, Gelani, Ashraf, & Foolad, 2007) y las respuestas de las plantas al estrés por alta temperatura implican numerosas regulaciones de procesos fisiológicos causados por modificaciones en los organelos. Los cloroplastos juegan un papel principal en la fotosíntesis y son los organelos más sensibles a alta temperatura. La medición de la eficiencia fotoquímica de PSII con la fluorescencia de clorofila a es una técnica efectiva y no invasiva para detectar daños en PSII (Baker & Rosenqvist, 2004). En trabajos realizados por Zhou et al. (2015) en tomate, se evaluó la máxima eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) en dos grupos de genotipos susceptibles y tolerantes al estrés por alta temperatura, concluyeron que la relación Fv/Fm es un indicador temprano de tolerancia al estrés y las respuestas de las plantas de tomate al estrés calórico fueron las mismas en condiciones de cultivo. El mantenimiento del

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

verdor, el incremento de la regulación estomática y los contenidos más altos de antioxidantes parecen ser parte de los mecanismos de protección en tomates tolerantes a alta temperatura. Hameed et al.(2015), encontraron que al evaluar 44 líneas de tomate y tres accesiones silvestres las mediciones de fluorescencia de clorofila tanto de F_v/F_m como de F_v'/F_m' decrecieron en genotipos susceptibles y de acuerdo con estos autores, el parámetro F_v'/F_m' fue el mejor predictor de susceptibilidad al choque térmico. De acuerdo con Acevedo *et al* (resultados no publicados) en evaluaciones preliminares se determino, variedades mejoradas Criolla Colombia, Violeta y Paola (*Solanum tuberosum* Grupo *Phureja*), sometidas a temperaturas día/noche de 38°C/24°C y 40°C/25°C evaluadas con respecto al testigo a temperatura ambiente media 18°C/12°C, existió una reducción en la eficiencia fotosintética evaluada como F_v/F_m con el fluorómetro Junior PAM, siendo estadísticamente diferentes los tratamientos al testigo, e iguales entre si, donde la FV de temperatura fue significativa, resultados similares a los reportados por los autores previamente mencionados.

Por tanto se considera, como lo presenta Wahid et al., 2007), que las mediciones del contenido de clorofila y la fluorescencia de la clorofila ayudan a evaluar el nivel de daño inducido por estrés en las estructuras fotosintéticas y son indicadores de la tolerancia al alta temperatura

2.1.4 Efecto del aumento de la temperatura en el estrés oxidativo

El estrés a altas temperaturas induce la rápida producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Almeselmani, Deshmukh, Sairam, Kushwaha, & Singh, 2006). Las ROS son moléculas involucradas en la transducción de señales en el estrés por alta temperatura que se producen en el cloroplasto (Mittler, 2002) y su acumulación es indispensable para generar respuestas. Adicionalmente, las moléculas ROS son generadas activamente por NADPH oxidasas, enzimas que se encuentran ubicadas en la membrana celular (X. Wang, Dinler, Vignjevic, Jacobsen, & Wollenweber, 2015). Niveles altos de ROS, desencadenan respuestas de protección; sin embargo, pueden dañar los

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

compuestos y estructuras celulares e influyen negativamente en los procesos metabólicos (Allen, 1992). Por lo tanto, las plantas han desarrollado diferentes estrategias de desintoxicación de ROS en donde el sistema antioxidante cumple un papel muy importante (Asthir, Koundal, & Bains, 2009).

Las membranas celulares son sensibles a los cambios de temperatura y se han identificado como estructuras vulnerables al estrés por alta temperatura (Wahid, 2007). La pérdida de su estabilidad e integridad ocasiona disfunción celular porque los ROS pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados, causando peroxidación lipídica en la membrana plasmática y en las membranas de los organelos (Candan & Tarhan, 2003). La peroxidación de la membrana plasmática causa la salida de compuestos, por alteración de la permeabilidad, modificando el metabolismo celular y causando la muerte celular; la peroxidación de las membranas en los organelos afecta la actividad respiratoria mitocondrial y puede causar degradación de los pigmentos fotosintéticos en el cloroplasto, llevando a la pérdida de la capacidad de fijación de carbono (Foyer, 2009). Igualmente, en estrés por alta temperatura se ha reportado desnaturalización o disociación de las proteínas de membrana relacionadas con el fotosistema II (De Ronde, Cress, Krüger, Strasser, & Van Staden, 2004). Trabajos realizados por Parankusam et al., (2017) en garbanzo, reportan que el estrés calórico estimuló la acumulación de Malondialdehído (MDA) y la fuga de electrolitos, como un indicativo de peroxidación lipídica inducida por alta temperatura y daño en la membrana celular. La fuga de electrolitos fue 20-25% mayor en el genotipo sensible cuando se comparó con el genotipo tolerante. Por lo tanto, mantener la estructura e integridad de las membranas celulares es importante y puede determinar la tolerancia de la planta al estrés por alta temperatura (Wahid et al., 2007).

2.1.5 Efecto del aumento de la temperatura en el crecimiento y componentes de rendimiento del cultivo de papa

La temperatura es el factor externo más importante que afecta el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Levy & Veilleux, 2007), es determinante en su distribución y

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

productividad y tiene efectos importantes en la actividad fisiológica de la planta (Mera, Niyogi, Buol, Wilkerson, & Semazzi, 2006). La alta temperatura en papa conduce al desarrollo de plantas altas con tallos delgados, hojas pequeñas, estolones largos, entrenudos alargados, inhibición del desarrollo del tubérculo y una disminución en la proporción de peso fresco de tubérculos frente al peso fresco total (Muthoni & Kabira, 2015). Así mismo pueden aumentar la carboxilación en la planta y estimular las tasas de fotosíntesis, la respiración y la transpiración, reduciendo la producción neta. Adicionalmente las fluctuaciones de temperatura se consideran los factores ambientales más importantes que influyen en la calidad y el rendimiento de la papa (Levy & Veilleux, 2007).

En el cultivo de papa bajo condición de alta temperatura una mayor proporción del carbono asimilado se asigna a las partes vegetativas, mientras que a temperatura más baja la mayor parte del carbono asimilado es dirigido a los tubérculos. De acuerdo con lo presentado por Muthoni and Kabira (2015), el desarrollo de tubérculos es sensible a la temperatura elevada y se ha sugerido que la señal de tuberización se inhibe a temperaturas más altas. Hancock et al. (2014) evaluaron el efecto del estrés térmico en plantas de papa de la variedad Desiree encontrando que plantas cultivadas a temperaturas elevadas (30/20 °C día / noche) muestran una distribución de biomasa baja a los tubérculos y una elevada a las hojas. Las altas temperaturas de crecimiento también dieron como resultado un mayor número de tubérculos más pequeños. Wang (2015) encontró que, al variar la fecha de siembra como estrategia de aclimatación al calentamiento global, se altera la oferta climática para cada periodo de crecimiento, lo que afectó significativamente la duración de dicho periodo de crecimiento, la altura de la planta y el índice de área foliar; por tanto, se sugiere cambiar la fecha de siembra, como una estrategia para maximizar la utilización de los recursos climáticos y de aclimatación efectiva. Resultados preliminares, de Acevedo *et al* (resultados no publicados) mostraron que en variedades mejoradas Criolla Colombia, Violeta y Paola (*Solanum tuberosum* Grupo *Phureja*), sometidas a temperaturas día/noche de 38°C/24°C y 40°C/25°C comparadas con respecto al testigo a temperatura ambiente media 18°C/12°C, se

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

evidencio una alteración de la distribución de materia seca, encontrando efectos de la temperatura vs el control y particularmente algunos mecanismos diferenciales de adaptación al estrés atribuibles a cada una de las variedades, ya que bajo a condición de estrés, acumulan fotoasimilados en diferentes órganos para su protección y defensa. De la misma forma no se evidenciaron alteraciones en la tuberización, pero si se observaron efectos sobre el rendimiento, siendo significativamente menor los tratamientos de alta temperatura con respecto al control.

2.1.6 Efecto del aumento de la temperatura en el desarrollo

La temperatura es el principal factor que controla el desarrollo fenológico de la papa (Kooman, Fahem, Tegera, & Haverkort, 1996). El cambio climático global podría alterar significativamente la fenología en la planta, ya que la temperatura influye en el desarrollo, ya sea independientemente o mediante interacciones con otras señales, como el fotoperiodo (Partanen, Koski, & Hänninen, 1998). El desarrollo reciente de modelos climáticos ha conducido a una mejor representación del tiempo y el clima extremos, lo que posibilita tener en cuenta factores de estrés abiótico al simular respuestas bióticas (Jönsson et al., 2015).

El incremento en temperatura acelera el crecimiento de la planta y acelera la floración y la maduración. Por lo tanto, se espera una reducción de la fase de crecimiento vegetativo como resultado del calentamiento global (Eyshi Rezaei et al., 2015). La disminución de la fase de crecimiento probablemente disminuirá el rendimiento, porque el tiempo disponible para la utilización de los recursos de producción se reducirá (Adavi, Moradi, Saeidnejad, Tadayon, & Mansouri, 2018).

2.1.7 Defensa de las plantas al estrés por alta temperatura

La termotolerancia adquirida es una potente respuesta adaptativa que permite a las plantas sobrevivir a temperaturas que son letales cuando las plantas no están preparadas

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

(Hilker et al., 2016). Por tal razón, las plantas tienen diferentes mecanismos que les permiten detectar el estrés por alta temperatura por diferentes rutas. El calcio (Ca^{2+}) es uno de las primeras moléculas señalizadoras que induce las respuestas de las plantas al stress por alta temperatura (Rensink et al., 2005). El aumento de fluidez o fluidización de la membrana plasmática en exposición al estrés por alta temperatura permite que el Ca^{2+} ingrese al citosol (Saidi et al., 2009). De la misma forma, la entrada de Ca^{2+} es mediada por canales denominados CNGC (cyclic nucleotide gated calcium channels), principalmente CNGC2, CNGC4, CNGC6 y CNGC16, que han sido relacionados con respuesta por estrés por alta temperatura. Los CNGC se abren en respuesta a nucleótidos cíclicos y Adenosina mono fosfato Cíclico (cAMP) y los niveles de Guanyl monofosfato cíclico (cGMP) aumentan durante el estrés por alta temperatura (Tunc-Ozdemir et al., 2013). Por lo tanto, la fluidización puede abrir los CNGC por activación de nucleótidos ciclasas. Otra de las vías relacionada con el aumento de Ca^{2+} en el citosol es el inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que adicionalmente permite la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares el del retículo endoplasmático (Zhang, 2012).

Se ha reportado que la aclimatación de las plantas con varios rangos de temperatura inducen termotolerancia, en diferentes especies que presentan requerimientos particulares para expresar tolerancia a alta temperatura (Trapero-Mozos et al., 2018). Como la tolerancia al estrés por alta temperatura es poligénica, la comprensión de las respuestas básicas fisiológicas, bioquímicas y moleculares a nivel transcriptómico y genómico, beneficia a los fitomejoradores en la identificación de genotipos resistentes a alta temperatura mediante métodos convencionales de reproducción, transgénicos o de edición genómica (Hancock et al., 2014) Por otro lado, los avances en los enfoques de fenotipado usando medios bioquímicos como lipidómica o metabolómica son prometedores en la identificación de marcadores bioquímicos robustos para complementar los esfuerzos de mejoramiento (Prasad, Bheemanahalli, & Jagadish, 2017)

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

2.1.8 Rutas metabólicas en respuesta al estrés por alta temperatura

2.1.8.1 Síntesis de Proteínas de choque térmico (HSP)

Las HSP son inducidas no solo en respuesta al estrés a corto plazo, sino que su producción es un paso necesario en la aclimatación a altas temperaturas de la planta. Kotak et al. (2007), plantea que los Heat shock factor (HSF) y las Heat shock protein (HSP), desempeñan un papel central en el estrés térmico y la termotolerancia adquirida en las plantas. Los HSF sirven como el componente terminal de la transducción de señales y media en la expresión de HSP. Sin embargo, los intentos de aumentar la termotolerancia a través de la sobreexpresión de genes únicos de HSF o HSP tienen efectos limitados, lo que sugiere que HSF y HSP confieren resistencia al estrés por alta temperatura solo en condiciones sinérgicas.

La función general de HSPs es actuar como chaperonas moleculares, que regulan tanto el plegamiento, como la acumulación y la degradación de las proteínas denaturadas en plantas y animales (Schulze-Lefert, 2004). Las HSP, como chaperonas evitan la agregación irreversible de las proteínas y participan en el replegamiento de proteínas durante condiciones de estrés por alta temperatura (Tripp, Mishra, & Scharf, 2009). Estas proteínas en plantas son agrupadas en cinco clases según su peso molecular. Las HSP incluyen HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP pequeñas (sHSP) y tienen un papel fundamental en la regulación de la funcionalidad de las proteínas ya que renaturalizan las proteínas desnaturalizadas por estrés por alta temperatura. Se cree que la diversificación de estas proteínas refleja una adaptación para tolerar el estrés por alta temperatura, aunque también se ha encontrado que se inducen en la mayoría de estreses abióticos. Las proteínas de choque térmico tienen funciones relacionadas con la regulación estrés abiótico resolviendo el problema del mal plegamiento y agregación, así como su papel como chaperonas (Al-Whaibi, 2011).

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

2.1.8.2 Síntesis de Antioxidantes

Bajo estrés oxidativo, derivado del estrés por alta temperatura, la acción sincronizada de todos estos antioxidantes conduce a la eliminación de ROS y protege las plantas contra el daño oxidativo. Los principales componentes del sistema antioxidante enzimático son la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POX), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPX) y las peroxirredoxinas (PRX), entre otras (Awad et al., 2015; Candan & Tarhan, 2003; Choudhury, Rivero, Blumwald, & Mittler, 2017).

Bajo estrés oxidativo, derivado del estrés por alta temperatura, la acción sincronizada de todos estos antioxidantes conduce a la eliminación de las ROS, protegiendo las plantas contra el daño oxidativo. (C. ling Wang, Shen, Zhang, Li, & Yao, 2015), encontraron un incremento significativo en la actividad de SOD y POD en estrés por alta temperatura en dos cultivares de rododendro después de dos días, aunque finalmente disminuyeron junto con los niveles de proteína soluble total. Estos metabolitos aliviaron el daño de la acumulación de ROS como Malondialdeído (MDA) y H_2O_2 .

2.1.9 Mecanismos moleculares de defensa al estrés

Los mecanismos de adaptación a condiciones ambientales adversas son controlados por redes moleculares involucradas en la percepción del estrés, transducción de señales, y regulación de la expresión de genes efectores (Umezawa, Fujita, Fujita, Yamaguchi-Shinozaki, & Shinozaki, 2006). Estas cascadas activan mecanismos protectores para restablecer la homeostasis y proteger y reparar biomoléculas y membranas dañadas. En consecuencia, la manipulación de genes que ayudan a mantener las funciones de células y componentes puede, en principio, incrementar la tolerancia a estrés, y la mayor parte de las estrategias empleadas para mejorar el rendimiento de plantas bajo condiciones adversas se han basado en el fortalecimiento de estos sistemas endógenos. Se han realizado numerosos estudios sobre el desarrollo de tolerancia a estrés abiótico, muchos de ellos involucran el análisis del transcriptoma para determinar los perfiles de expresión diferencial de genes que se pueden presentar en dos genotipos contrastes a la respuesta

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

al estrés (Umezawa et al., 2006), proporcionando el conocimiento indispensable para entender los mecanismos de tolerancia utilizados por las plantas.

2.1.9.1 Cambio en la expresión génica en condiciones de alta temperatura

La identificación de genes candidatos que confieran tolerancia a alta temperatura de las accesiones silvestres en programas de mejoramiento en curso podría ser un desafío, pero una estrategia sistemática que puede ayudar a superar este obstáculo y beneficiarse de la riqueza de la diversidad alojada en especies silvestres y accesiones (Prasad et al., 2017). Los genes sensibles al estrés se pueden dividir en dos categorías como "genes de respuesta temprana" y "genes de respuesta tardía". Los genes de respuesta temprana se inducen muy rápidamente y de manera transitoria. Su inducción no requiere nueva síntesis de proteínas porque todos los componentes de señalización ya están activos. Los genes de respuesta tardía son activados por el estrés más lentamente y su expresión a menudo es sostenida. Los genes de respuesta temprana típicamente codifican factores de transcripción que activan los genes de respuesta tardía de tolerancia al estrés ((Üniversitesi, Fakültesi, & Bölümü, 2005).

En la actualidad, con avance de la secuenciación de nueva generación (NGS) la transcriptómica es una herramienta que permite relacionar las características fisiológicas de las plantas con sus secuencias expresadas y entender los mecanismos de defensa utilizados por la planta ante diferentes ambientes en un espacio y tiempo determinado. En general se han reportado diferentes estrategias para identificar genes candidatos tolerantes a la estreses abióticos y bióticos para *S. Tuberosum L*, entre las que se encuentran los microarreglos, microRNAs, y RNAseq.

2.1.10 Análisis de la expresión génica mediante RNAseq

La expresión génica es un proceso dinámico que regula los procesos de crecimiento y diferenciación de un organismo, así como la interacción con otros organismos y el medio

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

ambiente. El transcriptoma es el conjunto completo de transcripciones en una célula, y su cantidad, para una etapa de desarrollo o condición fisiológica específica. Comprender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los constituyentes moleculares de las células y tejidos (Zhong, Mark, & Michael, 2009). Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciamiento de nueva generación (NGS) es posible estudiar la expresión génica a gran escala, a nivel transcriptómico, lo que permite mejorar el entendimiento de los procesos biológicos en un tiempo y espacio determinado. El secuenciamiento del ARN (RNAseq) es un método preciso para cuantificar y determinar los perfiles de expresión diferencial de genes y también para descubrir variantes alternativas de expresión y precursores de microRNA. Para ello, es necesario con herramientas de software y programas bioinformáticos que permitan realizar el ensamblaje del transcriptoma de novo o de referencia, cuantificar la expresión de genes y su anotación para determinar su función y poderla relacionarla con una ruta metabólica.

En la actualidad se han publicado excelentes revisiones sobre Secuenciación de nueva generación (NGS)(Metzker, 2010); (Kircher & Kelso, 2010) y de como ensamblar un transcriptoma y realizar el análisis de las secuencias expresadas ((Martin & Wang, 2011). En principio, se puede utilizar cualquier tecnología de secuenciación de alto rendimiento para RNA-Seq, entre las plataformas empleadas para este fin se encuentran 454 Life Science, cuya tecnología se fundamenta en la pirosecuenciación; Illumina basada en la síntesis química en donde se emplean didioxinucleótidos marcados con fluorocromos; SOLiD basado en secuenciación por ligación, Pacific Bioscience (PacBio), en donde se hace secuenciación en tiempo real de una molécula sencilla de ADN, sin amplificar. . El sistema Helicos Biosciences tSMS aún no se ha utilizado para los estudios publicados de RNA-Seq, pero también es apropiado y tiene la ventaja adicional de evitar la amplificación del ADNc objetivo (Zhong et al., 2009). Para realizar los análisis de estas secuencias de ARN (ARNseq) es necesario procesar los datos crudos obtenidos en el proceso de secuenciación considerando las siguientes etapas, como lo presenta Martin & Wang (2011): Preparación o construcción de la librerías, Generación de Clusters, Secuenciación, ensamblaje de transcriptoma de novo por referencia, estimación de la abundancia de los

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

transcriptos, análisis de expresión diferencial de genes y su anotación estructural y funcional.

Preparación o construcción de librerías. Las secuencias de DNA son fragmentadas en cientos de miles de pequeños fragmentos de menor tamaño, los cuales en sus extremos son poli-adenilados, esto sirve para que sean ligados más adelante a los adaptadores. Cada nucleótido es marcado con un colorante fluorescente y una DNA polimerasa especial incorpora los nucleótidos uno a uno. Los fragmentos de DNA son ligados a ambos extremos de los adaptadores, después son inmovilizados sobre un extremo en un soporte sólido.

Generación de Clusters. La superficie del soporte se encuentra cubierta densamente por los adaptadores. Cada fragmento de cadena sencilla se inmoviliza en un extremo sobre la superficie y se forma un “puente” para la hibridación con el extremo libre al adaptador complementario que también se encuentra sobre la superficie del soporte. Continúa una reacción con reactivos de PCR, actuando los adaptadores de la superficie como primers de amplificación. Después de varios ciclos de PCR, se generan clusters de cerca de 1000 copias de fragmentos de DNA de cadena sencilla.

Secuenciación. La mezcla para las reacciones de secuenciación y la síntesis de DNA se adiciona en la superficie; contiene primers, cuatro nucleótidos terminadores reversibles, cada uno marcado con un colorante fluorescente diferente y la DNA polimerasa. Después de la incorporación del nucleótido a la cadena de DNA, cada posición es detectada e identificada gracias al colorante fluorescente por medio de una cámara CCD. Los grupos terminadores del extremo 3' de la base y el colorante fluorescente son removidos y el ciclo de síntesis se repiten.

Ensamblaje de transcriptoma. Las lecturas resultado de secuenciación vienen en fragmentos que hoy en día van desde 75 pb en adelante dependiendo la tecnología, estos fragmentos de DNA deben ser sobrelapados para reconstruir la secuencia original. La

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

reconstrucción de la secuencias comienza con la suma de las lecturas que se sobrelapan en contigs, estos con HSP (tigs a su vez pueden juntarse para llenar los huecos (gaps) que existen entre ellos resultado de secuencias repetitivas que se encuentren en el DNA, para ello se realiza un análisis de coincidencia de extremos de dos contigs con los de algún inserto que tengan en común, método conocido como de extremos apareados (mate-pairs o paired-end reads) generando finalmente esqueletos o scaffolds.

Ensamblaje de transcriptoma por referencia. Consiste en el alineamiento de las lecturas a un genoma o un transcriptoma de referencia. Existen diferentes algoritmos que permiten hacer este tipo de ensamblaje como los métodos semilla “seed methods” y método de transformación “Burrows-Wheeler” donde el alineamiento de lecturas a una referencia no permite grandes huecos (gaps). El método semilla encuentra las coincidencias para las subsecuencias, denominadas “semillas”, asumiendo que al menos una semilla en una lectura puede coincidir perfectamente a la referencia, este algoritmo se desarrolló para lecturas muy cortas y es lento computacionalmente.

Ensamblaje del transcriptoma de novo. Este tipo de ensamblaje no tiene la necesidad de mapear primero las lecturas a una referencia. Existen varios algoritmos que realizan este tipo de ensamblajes como Oases (Schulz, Zerbino, Vingron, & Birney, 2012), Trinity (Bruce W., Nir Manfred G., Grabherr Brian J., Haas Moran Yassour Joshua Z., Levin Dawn A., Thompson Ido, Amit Xian , Adiconis Lin Fan Raktima Raychowdhury, Qiandong Zeng Zehua .Chen Evan, Mauceli Nir, Hacohen Andreas Gnirke, Nicholas Rhind, Federica di Pal, 2013) y TransAbyss (Robertson et al., 2010) entre otros, los cuales usan las lecturas directamente para construir un consenso de transcritos. El objetivo del ensamblaje de novo es dividir las lecturas en múltiples componentes no conectados, los cuales representen las isoformas de los genes. Una estrategia comúnmente usada es la construcción de un grafo de Bruijn, el cual modela un sobrelapamiento de subsecuencias, denominadas K-meros en lugar de lecturas. Esto reduce la complejidad asociada con el manejo de millones de lecturas a un número fijo de posibles K-meros (Schliesky, Gowik, Weber, & Bräutigam, 2012)

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Anotación estructural y funcional. La anotación es el proceso mediante el cual la información oculta en una secuencia genómica es extraída, con el objetivo de identificar las características principales del genoma y los genes (Potter et al., 2016). Luego del proceso de ensamblaje de secuencias por medio de algoritmos computacionales, se realiza la anotación de las secuencias genómicas o transcriptómicas, con el fin de obtener la información biológica útil, cerrando la brecha entre el secuenciamiento y la biología del organismo (Stein, 2001).

2.1.11 Estudios de la respuesta del cultivo de papa sometidos al estrés por alta temperatura

En la investigación realizada por Trapero-Mozos et al., (2018b), se encontró termotolerancia en cuatro cultivares comerciales de papa tetraploide, Bintje, Atlantic, Desiree y Norchip. Se encontraron que 492 genes significativamente diferentes en abundancia en los tratamientos comparados con el control y lo agruparon en cinco clústeres. El primero, conformado principalmente por genes que codifican auxinas, etileno y factores de transcripción; el segundo, por genes involucrados en reacciones fotosintéticas, síntesis de clorofila a/b, síntesis de ADN, función en la cromatina y transcritos para modificación de pared celular; el tercero agrupa a las proteínas de choque térmico (HSP); el cuarto se asocia con síntesis y modificación de pared y con algunos transcritos que codifican para fitohormonas y el quinto clúster es pequeño y se relaciona principalmente con la síntesis de etileno.

Gangadhar et al., (2014), utilizaron un método de detección funcional en levaduras que expresaban secuencias de cADN obtenidas de plantas sometidas a estrés térmico a 35 °C durante dos y 48 horas. Esto con el objetivo de identificar, caracterizar y clasificar los genes de alta temperatura sensibles al estrés en la papa. De este estudio se identificaron un total de 95 genes candidatos potenciales y se encontró que están asociados al metabolismo celular, la transducción celular, respuesta al estrés y a los mecanismos de

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

plegamiento de proteínas. Adicionalmente, se encontró que algunos de estos genes también responden a otros tipos de estreses como la sequía y la salinidad.

Para *S. tuberosum* Grupo Phureja Clon DM1-3 516R4 se ha reportado un transcriptoma de referencia obtenido a partir de librerías de cADNs obtenidas a partir de diferentes tipos de tejidos (flores, frutos, hojas, estolones/tubérculos, raíces y otros tipos de tejidos), así como de plantas sometidos a diferentes ambientes bióticos (*Phytophthora infestans*) y abióticos (salinidad y alta temperatura, entre otros) (Massa et al., 2013).

Adicionalmente, el Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC), ha reportado a la fecha de la revisión, 528 genes candidato, que presentan expresión diferencial en papa, la siguiente tabla relaciona el número de genes reportados a la fecha y la anotación funcional correspondiente. lo que facilita el ensamblaje y análisis de nuevos transcriptomas pertenecientes a otros genotipos de papa.

Estos genes se pueden consultar en <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>

2.2 SITUACIÓN ACTUAL

La variabilidad climática actual presenta retos importantes para la producción agrícola debido a que los sistemas productivos son altamente vulnerables dada su baja capacidad de adaptación en el corto plazo. Para el cultivo de papa se estima una reducción de la productividad entre el 25-38% para el año 2070 debido a un incremento de temperatura en las zonas aptas para el cultivo, por lo tanto, es necesario entender los mecanismos genéticos y fisiológicos que explican dicha tolerancia. Esto con el propósito de avanzar y consolidar en el mediano plazo, procesos de selección de genotipos usando germoplasma local, que tolere la condición de estrés por alta temperatura. La Facultad de Ciencias Agrarias de la UNC-Bogotá cuenta con una colección de trabajo de papas diploides (*Solanum Tuberosum* Grupo Phureja) representativa de su diversidad en el país, que está siendo evaluada en cuanto a su respuesta fisiológica, sin embargo, aún se desconoce el

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

contexto genético asociado a esta respuesta, la cual es una herramienta de gran valor para el desarrollo de un programa de mejoramiento orientados a obtener materiales tolerantes.

2.3 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA U OPORTUNIDAD

La papa es el tercer cultivo en importancia después del arroz y el trigo y garantiza la seguridad alimentaria en los países en desarrollo (Lutaladio & Castaldi, 2009). En Colombia, la producción de papa fue de 2.700.000 Ton, en el año 2017 lo cual se traduce en un consumo *per cápita* cercano a los 48 Kg/Hab/año. El rendimiento para el 2018 fue de 21,5 Ton/Ha (Fedepapa, 2018). Con esta actividad económica se benefician aproximadamente 100 mil familias que trabajan directamente en el cultivo. Las variedades de papa sembradas en el país corresponden a la especie *Solanum tuberosum* grupos Andigenum (tetraploide) y Phureja (diploide) (Huamán y Spooner, 2002), la primera con un ciclo vegetativo que oscila entre 150 a 185 días y, la segunda, con un ciclo más corto de 120 días con ausencia de reposo del tubérculo (Rodríguez *et al.*, 2009).

Colombia se ubica como el mayor productor, consumidor y exportador de papas diploides a nivel mundial (Rodríguez, 2009) con una área cultivada cercana al 6% del total del área sembrada de papa, con exportaciones de 1.000 Ton/año (Fedepapa, 2018). El cultivo de papa criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja) se desarrolla en la zona andina fría por encima de los 2300 hasta los 2800 msnm, con temperaturas promedio de 10°C a 20°C (Cevipapa, 2005). Representa un recurso genético valioso por su calidad nutricional y su potencial de exportación. Sin embargo, como resultado al cambio climático, la productividad del cultivo se puede ver disminuida afectando a las familias que dependen de este cultivo y a la seguridad alimentaria. De acuerdo con Pachauri *et al.*, (2014) y el IDEAM *et al.* (2014), las zonas de producción de papa en Colombia incrementarán su temperatura promedio entre 5 y 8°C en el año 2070 causando una reducción en la productividad del cultivo entre 27% -38%. Actualmente, se han caracterizado genotipos, principalmente variedades tetraploides, tales como Desiree, que muestran termotolerancia

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

a condiciones de estrés por alta temperatura y se han identificado genes asociados a rutas de defensa compartidas con otros estreses abióticos (Hancock et al., 2014); (Gangadhar, Yu, Sajeesh, & Park, 2014). Para *Solanum tuberosum* Grupo Phureja genotipo DM1-3 516 R44 se ha demostrado que existe una expresión diferencial de genes bajo el estrés por alta temperatura y se han identificado genes ortólogos comunes en su expresión con *Arabidopsis thaliana* ((Massa, Childs, & Buell, 2013). No obstante, no existe información en Colombia, sobre la respuesta de los genotipos diploides al estrés por altas temperaturas, a pesar de que el país cuenta con una colección del germoplasma de papas diploides la cual es una herramienta con alto potencial para ser usada en programas de mejoramiento con el propósito de obtener materiales tolerantes a diferentes tipos de estrés. Adicionalmente, se tienen la ventaja de que el análisis molecular es más sencillo bajo un contexto de papa diploides.

Este proyecto de investigación representa una oportunidad para ampliar el conocimiento de los recursos genéticos presentes en la colección de trabajo de papas diploides de la UNAL - Bogotá – Facultad de Ciencias Agrarias que cuenta con 110 accesiones, con el fin de identificar por primera vez genotipos con características asociadas a procesos de aclimatación a altas temperaturas, explorar los mecanismos de resistencia asociados a este tipo de estrés a nivel genético, molecular y fisiológico.

2.4 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto, pionero en el país y particularmente en el estudio de las respuestas de genotipos de papa diploide al estrés por alta temperatura, contribuye significativamente con el conocimiento de esta especie de importancia estratégica para el sector productivo. Con base en los resultados obtenidos en este estudio, los análisis fisiológicos que se realizarán y la literatura reportada, se definirán los mecanismos de aclimatación empleados por estos genotipos del Grupo Phureja a nivel molecular y fisiológico que expliquen su comportamiento global ante el estrés por alta temperatura. La papa cuenta con una amplia gama de recursos genómicos/transcriptómicos, por lo cual, los datos que

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

se generarán en la presente investigación podrán ser analizados en un marco comparativo con datos de secuenciación, fenotípicos y de asociación producidos por diversos grupos de investigación en materiales de papa de diferentes partes del mundo, lo que se constituye en un valor agregado para el presente proyecto. La información generada podrá ser validada y utilizada en la selección temprana de genotipos tolerantes a alta temperatura, en los programas de mejoramiento. El proyecto usará y valorizará la agrobiodiversidad del cultivo presente en el germoplasma de papa y se ejecutara un taller participativo para la comunicación de los resultados obtenidos a la comunidad de productores de papa e integrantes del sector productivo, con el propósito que se reconozca la importancia de la agrobiodiversidad del cultivo, y su uso como herramienta para desarrollar tecnologías que puedan mitigar el escenario presente de variabilidad climática.

2.5 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta fisiológica de 60 genotipos de papa diploide y determinar la expresión génica en dos genotipos de papa diploide (*S. tuberosum* L. Grupo Phureja), al estrés por alta temperatura

2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar 60 genotipos de la colección de papas diploides en su respuesta fisiológica al estrés por alta temperatura.
2. Evaluar la expresión diferencial genes de dos genotipos de papa diploide (*S. tuberosum* L. Grupo Phureja) con respuesta contrastante al estrés por alta temperatura.



FICHA TÉCNICA



VERSIÓN: 03

FECHA: 20-05-2020

CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62

3. Determinar los posibles mecanismos fisiológicos y moleculares de aclimatación al estrés por alta temperatura en el genotipo de papa diploide (*S. tuberosum* L. grupo Phureja) tolerante al estrés por alta temperatura.
4. Socializar los resultados a personal técnico vinculado a la cadena agroalimentaria de la papa y a organizaciones de productores de papa del departamento de Cundinamarca, para resaltar la importancia de valorizar la agrobiodiversidad del cultivo ante la variabilidad climática.

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

3 MARCO LOGICO

PROYECTO	PROYECTO: Caracterización de la respuesta fisiológica de genotipos de papa diploide (Grupo Phureja) y determinación de la expresión diferencial de genes en dos genotipos de papa (Solanum tuberosum Grupo Phureja) bajo condiciones de estrés por alta temperatura.				
PROGRAMA	INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA				
OBJETIVO GENERAL:	Caracterizar la respuesta fisiológica de 60 genotipos de papa diploide y determinar la expresión génica en dos genotipos de papa diploide (S. tuberosum L. Grupo Phureja), al estrés por alta temperatura				
DESCRIPCIÓN GENERAL:	La variabilidad climática actual presenta retos importantes para la producción agrícola debido a que los sistemas productivos son altamente vulnerables dada su baja capacidad de adaptación en el corto plazo. Para el cultivo de papa se estima una reducción de la productividad entre el 25-38% para el año 2070 debido a un incremento de temperatura en las zonas aptas para el cultivo, por lo tanto, es necesario entender los mecanismos genéticos y fisiológicos que explican dicha tolerancia. Esto, con el propósito de avanzar y consolidar en el mediano plazo, procesos de selección de genotipos usando germoplasma local, que tolere la condición de estrés por alta temperatura. La Facultad de Ciencias Agrarias de la UNC-Bogotá cuenta con una colección de trabajo de papas diploides (Solanum Tuberosum Grupo Phureja) representativa de su diversidad en el país, que está siendo evaluada en cuanto a su respuesta fisiológica, sin embargo, aún se desconoce el contexto genético asociado a esta respuesta, la cual es una herramienta de gran valor para el desarrollo de un programa de mejoramiento orientados a obtener materiales tolerantes. Por tanto el objetivo de esta propuesta es caracterizar la respuesta fisiológica de 60 genotipos de la colección de papas diploides y determinar la expresión génica y los posibles mecanismos moleculares de aclimatación en dos genotipos de papa diploide (S. tuberosum L. Grupo Phureja), como respuesta a estrés por alta temperatura. La investigación que se está adelantando permitirá seleccionar dos genotipos, uno tolerante y uno susceptible al estrés por alta temperatura los cuales, bajo condiciones controladas serán sometidos a estrés por alta temperatura, [38°C/24°C (día/noche)] por 48 horas en condiciones controladas, en la etapa inicial de tuberización. La determinación de la expresión diferencial de genes y de los posibles mecanismos moleculares asociados de aclimatación al estrés por alta temperatura en estos genotipos se realizará mediante el análisis de RNAseq a las 0, 2 y 48 horas de estrés y a las 24 horas después de finalizado el estrés (estado de recuperación).				
PRESUPUESTO	\$ 113.300.000				
ACCIONES	INDICADOR	TIPO DE INDICADOR	METAS	FUENTES DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS* *Eventos que pueden llevar al no cumplimiento de la acción
1. Caracterizar 60 genotipos de la colección de papas diploides en su respuesta fisiológica al estrés por alta temperatura.					
Siembra de bloques de selección	60 genotipos sembrados en 15 repeticiones cada uno	Cuantitativa	Siembra de los experimentos	Seguimiento fotográfico, reporte escrito	disponibilidad de insumos y espacio físico para la siembra

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Caracterización fisiológica de la respuesta al estrés en 60 genotipos diploides	Ejecución rubro Personal/Planeado Rubro personal	Cuantitativa		Base de datos con los seguimientos fisiológicos para los 60 genotipos	Equipos de medición Disponibles y en condiciones. Contratación de estudiantes de pregrado asociados al proyecto. Adecuado desarrollo del cultivo de los genotipos para la evaluación.
Selección de genotipos contrastantes (8)	ejecución rubro Servicios técnicos/Planeado Servicios técnicos	Cuantitativa	8 genotipos contrastantes seleccionados para la segunda fase	Informe parcial de proyecto	
Desarrollo de tesis de pregrado (2)	ejecución rubro Personal/Planeado Rubro personal	Cuantitativa	dos tesis de pregrado sometidas a los jurados	Certificación de la UN en relación a la situación académica de los dos estudiantes de pregrado y su trabajo de grado	Contratación de los estudiantes asociados al proyecto.
2. Evaluar la expresión diferencial genes de dos genotipos de papa diploide (S. tuberosum L. Grupo Phureja) con respuesta contrastante al estrés por alta temperatura					
Siembra de genotipos contrastantes, seguimiento y caracterización fisiológica	Colección sembrada	Cualitativo	Siembra de los experimentos	Seguimiento fotográfico, reporte escrito	Selección de genotipos de la Fase I realizada
Muestreo, Extracción, purificación y envío de DNA para Secuenciación	ejecución rubro Servicios técnicos/Planeado Servicios técnicos	Cuantitativa	24 muestras enviadas para secuenciación Illumina, al proveedor definido.	Recibo de pago y aceptación de las muestras	Contratación adecuada del proveedor. Entrega de muestras oportunamente y con la calidad requerida
Recepcion de resultados crudos, limpieza ensamblaje del transcriptoma.	ejecución de Análisis computacional	Cualitativo	2 genotipos caracterizados en su expresión diferencial de genes como respuesta al Estrés por alta temperatura.	Análisis computacionales finalizados	Cumplimiento del proveedor de secuenciación en el envío de los datos crudos
3. Determinar los posibles mecanismos fisiológicos y moleculares de aclimatación al estrés por alta temperatura en el genotipo de papa diploide (S. tuberosum L. grupo Phureja) tolerante al estrés por alta temperatura.					

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Anotación estructural y funcional	ejecución de Análisis computacional	Cualitativo	2 transcriptomas de genotipos de papa con su respectiva anotación funcional y estructural	Informe de anotación estructural y funcional	Disponibilidad del servidor para análisis de datos. Análisis de información y anotación funcional.
4. Socializar los resultados a personal técnico vinculado a la cadena agroalimentaria de la papa y a organizaciones de productores de papa del departamento de Cundinamarca					
Publicación de resultados	Informe entregado	Cualitativo	Resultados disponibles para la comunidad científica	Un informe final del proyecto, revisado y entregado	
Seminario técnico para agricultores donde se presente la importancia de las colecciones, su uso y valorización de los recursos genéticos de la papa diploide.	ejecución rubro Comunicación técnicos/Planeado Comunicación	Cuantitativa	Un seminario de divulgación departamental para productores	Listados de asistencia	Organización del día de socialización con productores y técnicos asociados al cultivo.

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

4 ASPECTOS TÉCNICOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA REGIÓN EN DONDE SE EJECUTARÁ EL PROYECTO

4.2 COMPONENTE TÉCNICO

Para la realización de este proyecto la Universidad Nacional de Colombia – FCA dispondrá de los siguientes recursos físicos:

- Invernaderos: Espacios acondicionados para la propagación del material vegetal, bajo condiciones semicontroladas, dotados de sistema de riego centralizado con la posibilidad de adaptar sistemas localizados o de aspersión de acuerdo con la necesidad del proyecto.
- Laboratorio de fisiología vegetal: ubicado en el aula 325, cuenta con los espacios necesarios para la investigación, cámaras de crecimiento, equipos de medición para las variables consideradas en este proyecto, apoyo de laboratorista.
- Laboratorio de Agrobiotecnología: Dotado con los equipos necesarios para la conservación de material vegetal, extracción, conservación de mRNA y análisis de muestras.
- Cuarto climatizado: se pone a disposición del proyecto un cuarto climatizado, que permite suministrar a las plantas las condiciones climáticas definidas para los experimentos, tanto en temperatura, como en la simulación de luz día (fotoperiodo e intensidad lumínica).

De la misma forma vincula al proyecto los siguientes Docentes:

- I.A. Liz Patricia Moreno Fonseca Ph.D. LIDER DE PROYECTO. Funciones: Apoyo en el diseño del montaje del experimento y evaluación fisiológica, Apoyo en el análisis de resultados y escritura de documentos. Participación en la estrategia de comunicación y socialización de resultados con los agricultores

	FICHA TÉCNICA		
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62

- B.Sc. Esperanza Torres Rojas Ph.D. Apoyar la extracción de ARN y los análisis de RNAseq de dos genotipos de papa criolla por su respuesta al estrés por alta temperatura. Apoyo en el análisis de resultados y escritura de documentos. Participación en la estrategia de comunicación y socialización de resultados con los agricultores.
- I.A. Carlos E. Ñustez López Ph.D. Asesoría en la selección y multiplicación de material de los genotipos contrastantes al estrés por alta temperatura. Apoyo en el análisis de resultados y escritura de documentos. Participación en la estrategia de comunicación y socialización de resultados con los agricultores

5 ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

5.1 METODOLOGÍA - Fase I. Caracterización de la colección

En esta fase se utilizarán 60 accesiones de *S. tuberosum* L. Grupo Phureja de la Colección de Trabajo del Programa de Papa, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá (UNAL). Los tubérculos para la propagación serán proveídos por dicho programa, se seleccionaran tubérculos de 30 a 50 gramos de peso. Los tubérculos para siembra serán sometidos a una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Posteriormente, se dejarán secar a condiciones ambiente y se almacenarán en canastillas plásticas hasta el momento de la siembra, para asegurar la adecuada brotación.

Las plantas serán fertilizadas de acuerdo con las dosis evaluadas en el Grupo de investigación de papa de la UNAL, con 20 gr por bolsa de un fertilizante compuesto 12-24-12 (N-P-K) en mezcla 1:3 con un complejo de micronutrientes (Agrimins) o una mezcla equivalente. A los 30 días después de emergencia (dde), se realizara una aplicación de fertilizante compuesto 1-2-2 + EM en una dosis de 10 gr/planta, posteriormente se adicionará suelo para simular el proceso de aporque que se hace en campo. Se aplicarán riegos periódicos, acordes con la condición climática, con el fin de mantener el suelo a capacidad de campo. El manejo fitosanitario de cultivo se realizará de acuerdo al resultado del monitoreo semanal, empleando los productos registrados y recomendaciones comerciales para el cultivo.

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Las plantas recibirán dos tratamientos en los experimentos propuestos:

Tratamiento Control (TC): Las plantas se harán crecer en condiciones semicontroladas, en invernadero, únicamente bajo cubierta, con el fin de poder mantener la condición de humedad en el suelo a capacidad de campo y controlar la posibilidad de tener influencia de otro tipo de estrés. Se realizará la instalación de una estación climatológica y se controlara permanentemente el suministro hídrico, la temperatura, HR. Bajo esta condición se desarrollara todo el ciclo de cultivo y se realizaran las evaluaciones en los momentos requeridos para cada fase de la investigación.

Tratamiento Estrés Térmico (HS): Las plantas se harán crecer en condiciones semicontroladas, en invernadero. Bajo esta condición se desarrollaran los primeros 30 días después de emergencia. En este momento las plantas serán sometidas a una temperatura de 38°C / 24°C (día/noche) por 48 horas y posteriormente serán regresadas al invernadero para terminar su ciclo de cultivo. Para la aplicación de la condición de estrés planteada, las plantas se llevaran a un cuarto de crecimiento que garantice condiciones de fotoperiodo y ventilación equivalentes a la condición en invernadero y temperatura de acuerdo con el tratamiento.

Variables a evaluar

Las variables serán evaluadas inmediatamente antes de la aplicación del estrés, durante el estrés a las 2 y 48 horas y 24 horas después de someter las plantas a los tratamientos de temperatura. Las mediciones se realizarán sobre el foliolo terminal de la cuarta hoja completamente expandida y fotosintéticamente activa del tercio superior en dos plantas por unidad experimental.

Las variables a evaluar, de acuerdo con la metodología previamente descrita son:

- Contenido relativo de clorofilas
- Conductancia estomática

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

- Fluorescencia de la clorofila a
- Estabilidad de las membranas
- Porcentaje visual de daño
- Evaluación de tuberización y rendimiento.

Los resultados de las mediciones realizadas serán analizados con el uso del paquete estadístico R. Se realizará análisis de varianza y pruebas de comparación pareadas (Tukey p-valor de 0.05).

5.2 METODOLOGÍA - Fase II. Respuesta fisiológica y determinación de la expresión génica en dos genotipos de papa

Se utilizarán 2 genotipos de *S. tuberosum* L. Grupo Phureja de la Colección de Trabajo del Programa de Papa, de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá (UNAL), uno tolerante y uno susceptible al estrés por alta temperatura, seleccionados con base en los resultados obtenidos en la primera fase del proyecto. Los tubérculos para la propagación serán proveídos por el programa de la FCA. Los tubérculos para siembra serán sometidos a una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Posteriormente, se dejarán secar a condiciones ambiente y se almacenarán en canastillas plásticas hasta el momento de la siembra, para asegurar la adecuada brotación.

Las plantas serán fertilizadas de acuerdo con las dosis evaluadas en el Grupo de investigación de papa de la UNAL, con 20 gr por bolsa de un fertilizante compuesto 12-24-12 (N-P-K) en mezcla 1:3 con un complejo de micronutrientes (Agrimins) o una mezcla equivalente. A los 30 días después de emergencia (dde), se realizará una aplicación de fertilizante compuesto con una relación NPK 1-2-2 + EM en una dosis de 10 gr/planta, posteriormente se adicionará suelo para simular el proceso de aporque que se hace en campo. Se aplicarán riegos periódicos, acordes con la condición climática, con el fin de mantener el suelo a capacidad de campo. El manejo fitosanitario de cultivo se realizará de acuerdo con el resultado del monitoreo semanal, empleando los productos registrados y recomendaciones comerciales para el cultivo.

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Las plantas recibirán dos tratamientos en los experimentos propuestos:

1. Tratamiento Control (TC): Las plantas se crecerán en condiciones controladas, en invernadero, únicamente bajo cubierta, con la finalidad de mantener la condición de humedad en el suelo (a capacidad de campo) y limitar el efecto de otro tipo de estrés. Se realizará la instalación de una estación climatológica y se controlará permanentemente el suministro hídrico, la temperatura, HR. Bajo esta condición se desarrollará todo el ciclo de cultivo y se realizaran las evaluaciones en los momentos requeridos para cada fase de la investigación.
2. Tratamiento Estrés Térmico (HS): Las plantas se harán crecer en condiciones semicontroladas, en invernadero. Bajo esta condición se desarrollarán los primeros 20 días después de emergencia. En este momento las plantas serán colocadas a una temperatura de 38°C / 24°C (día/noche) por 48 horas, de acuerdo con los resultados previos comunicados por Acevedo et al (2019), Resultados no publicados y posteriormente serán regresadas al invernadero para terminar su ciclo de cultivo. Para la aplicación de la condición de estrés planteada, las plantas se llevarán a una cámara térmica que garantice condiciones de fotoperiodo y ventilación equivalentes a la condición en invernadero y temperatura de acuerdo con el tratamiento.

La siembra de los tubérculos-semilla se realizará en bolsas plásticas de 10" de ancho por 14" de alto, con un contenido de suelo de aproximadamente siete kilos colocando un tubérculo-semilla por bolsa, a una profundidad de 5 cm. Las bolsas serán establecidas bajo cubierta en el invernadero en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (2605 msnm, temperatura media 14°C y HR 75% promedio anual), en un diseño en bloque completos al azar con tres repeticiones y 10 plantas por unidad experimental.

VARIABLES A EVALUAR

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Las variables serán evaluadas a las 0, 2, 48 horas de tratamiento y en recuperación a las 24 horas después de terminado el tratamiento. Las mediciones se realizarán sobre el foliolo terminal de la cuarta hoja completamente expandida y fotosintéticamente activa del tercio superior.

Variables Fisiológicas

- **Contenido de clorofilas:** El contenido relativo de clorofilas se determinará con un medidor portátil de clorofilas (Konica Minolta SPAD-502 plus, Japón) realizando 5 mediciones por hoja. El valor leído es el promedio de las mediciones realizadas.
- **Fluorescencia de la clorofila:** Las mediciones de la eficiencia cuántica del fotosistema II (F_v/F_m) se realizarán sobre la 4 y 5 hoja expandida de las plantas, siendo sometidas a oscuridad 30 minutos antes de la medición. Se empleará luz actínica con un pulso de 0,8 s de duración y una intensidad de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fluorómetro Junior-PAM de fluorescencia modulada (Walz®, GmbH Effeltrich, Alemania).
- **Estabilidad de las membranas:** La estabilidad de membranas se determinará a partir de la medición de la pérdida de electrolitos (PE), siguiendo el método propuesto por Valentovic et al., (2006). Se tomarán cinco discos de hoja de 1.0 cm de diámetro y se colocarán en un tubo falcón con 10 mL de agua desionizada. La conductividad eléctrica (CE) será registrada con un conductímetro (HI 9835 Hanna® - ICT, SL) a las tres horas de incubación (CE1), luego las muestras se calentarán en baño de maría a 95°C durante 20 min y al alcanzar temperatura ambiente se medirá de nuevo la CE (CE2). La PE se define con base en la ecuación: $PE (\%) = (CE1/CE2) \times 100$.
- **Evaluación de tuberización y rendimiento:** A los 20 días después de finalizado el estrés se realizará muestreo destructivo de tres plantas por unidad experimental, se determinarán los componentes de rendimiento y se cuantificará el efecto de tratamiento comparado con el control. Las unidades experimentales restantes se llevarán hasta el final del ciclo para

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

evaluar el rendimiento obtenido, se realizara análisis comparativo en componentes de rendimiento, numero de tallos, numero de tubérculos y peso total de tubérculo.

- **Análisis de Expresión Génica mediante RNAseq:** Para analizar el transcriptoma de un organismo se requiere extraer y purificar ARN total de buena calidad, libre de contaminantes y con buena integridad, realizar la preparación de las librerías de cADN, amplificación y secuenciación usando la plataforma Illumina. Posteriormente, se llevará a cabo los análisis computacionales: la limpieza de las secuencias, el ensamblaje del transcriptoma de novo y de referencia, los análisis de la expresión diferencial de genes, la anotación estructural y funcional.
- **Extracción de RNA total:** El ARN total se extraerá de foliolos tomados de las plantas perteneciente a dos genotipos contrastantes al estrés alta temperatura a los 20 dde, a las 0, 24 y 48 horas después de someterse al estrés por alta temperatura (38 C /24 C) y a las 24 horas después de finalizar el estrés. En total se extraerán 24 muestras de ARN [2 genotipos x 3 réplicas biológicas x 4 tratamientos]. Para ello, se cortarán los foliolos de la 4 hoja expandida e inmediatamente se congelarán con nitrógeno líquido y se almacenarán a -80 °C. Para la extracción de ARN total el tejido se macerará con nitrógeno líquido y 0,2 gramos de tejido se transferirá a tubos eppendorf de 2 ml, se adicionará 1 ml de buffer de extracción (0.18M Tris-HCl, 0.09M LiCl, 4.5 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.2), y 300 µL de fenol equilibrado con solución TLE (0.2M Tris-HCl, 0.1M LiCl, 5.0 mM EDTA, pH 8.2), se mezclará por inversión durante un min y se incubará a 50°C por 20 min. Se centrifugará a 13000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se transferirá a un tubo limpio y estéril. A continuación, se realizará la limpieza con fenol-cloroformo tres veces, y el ARN se precipitará con un volumen de isopropanol y se incubará a -20 °C por 12 horas. El ARN se precipitará mediante centrifugación a 13000 rpm y posteriormente se lavará tres veces con 500 µL de etanol al 70%. El ARN obtenido se solubilizará en 10 µL de agua libre de RNAsas (Kingston 2010) y se tratarán con ADNasa I, amplification grade (Thermo Fisher ScientificTM, Massachusetts). La concentración y pureza del ARN extraído se evaluará mediante espectrofotómetro NanoDrop (2000, Thermo Fisher ScientificTM,

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Massachusetts). Su integridad se determinará mediante un gel de agarosa al 1% con corrida de 100 voltios durante 20 minutos. El RNA se visualizará mediante el documentador de geles Gel DocTM XR+ (Bio-Rad laboratories Inc, CA) y se almacenará a -80 °C.

- **Elaboración de las librerías de cADN y secuenciación Illumina:** Las muestras de ARN total serán enviadas al centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad de Purdue en Lafayette - EE. UU asegurando cadena de frío mediante el uso de hielo seco. Una vez allí, se cuantificará la calidad del ARN determinando el número de integridad del ARN (RIN) con un Bioanalyzer (Agilent® Technologies, CA), y se prepararán 24 librerías de cADN (2 genotipos: uno tolerante y uno susceptible X 4 tratamientos (38 °C día/24 °C noche) X 3 réplicas biológicas) de cADN con el kit TruSeq RNA (Agilent® Technologies, CA). La secuenciación del cADN se realizará bajo una aproximación de extremos apareados (paired end 2X150 pb) sobre un canal multiplexado del equipo NovaSeq 6000 de la plataforma Illumina (Illumina®, CA).
- **Análisis Computacional:** El control de calidad de las secuencias crudas de datos se evaluará mediante el programa FastQC 0.10.1 (Babraham Institute, Cambridge) antes y después de eliminar las secuencias de los adaptadores y nucleótidos de baja calidad en los extremos 5'-3' usando el programa Trimmomatic 0.36 (Usadel Lab, Aachen). Después de la limpieza de secuencias se realizará el ensamblaje de transcritos De novo por medio del programa Trinity 2.5.1. a partir de todas las librerías generadas; también se utilizará el transcriptoma de referencia ya publicado en NCBI para verificar la calidad del ensamblado. Para cuantificar la expresión de los transcritos se utilizará el programa RSEM (RNA-seq by Expectation-Maximization) y para identificar los transcritos con expresión diferencial entre los estados fisiológicos (con y sin alta temperatura). Para esto se empleará el paquete estadístico DESeq2 (Love, Huber, & Anders, 2014) en ambiente R 2.15.3. (R Studio, Boston). Para visualizar los resultados se realizará un análisis de componentes principales (PCA) y un agrupamiento jerárquico usando el algoritmo K-means entre los

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

perfiles de expresión de los transcritos de los diferentes estados fisiológicos (Heat map). Finalmente, los genes ortólogos y las rutas metabólicas de los genes expresados diferencialmente se identificarán mediante la herramienta BlastX. Estos resultados se visualizarán mediante el programa MEGAN 5, el cual compara las lecturas obtenidas con la base de datos de acceso libre de 2011 de Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). Se evaluará principalmente la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas de choque térmico (HS60, 70, 90, 110), genes relacionados con la síntesis de compuestos antioxidantes, con la composición de la membrana celular y los relacionados con la estabilidad y funcionamiento del fotosistema 2.

- **Análisis Estadístico:** Los resultados de las mediciones realizadas serán analizados con el uso del paquete estadístico R. Se realizará análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple (Tukey p -valor de 0.05). Se determinará en las fases del proyecto los genotipos que presenten respuesta diferencial al estrés por Alta Temperatura.

5.3 ACTORES INVOLUCRADOS

Para el desarrollo de este proyecto se contará con los siguientes actores:

Fondo Nacional Para el Fomento de la Papa: Será el ente financiador y ejecutor de los recursos solicitados para el desarrollo del proyecto. Cumplirá las funciones de interventoría y velará por la correcta ejecución y cumplimiento de los objetivos de este proyecto.

Universidad Nacional de Colombia – FCA Sede Bogotá: Será el responsable de la realización de las labores propias de la investigación, con un alcance que contempla la definición de la metodología, implementación de las parcelas experimentales, realización de análisis de laboratorio, Fisiología Vegetal, Bioinformática y estadísticos a que haya lugar, la disposición de los espacios físicos tales como Invernaderos, Laboratorios de Fisiología Vegetal y Agrobiotecnología, Equipos que se requieran para el correcto desarrollo de este proyecto. De la misma forma, postulará los estudiantes de pregrado y posgrado que cumplan los requisitos

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

necesarios para hacer parte de este proyecto en el desarrollo de los proyectos de grado en pregrado y Tesis Doctoral.

5.4 ESQUEMA OPERATIVO PARA EL PROYECTO

La ejecución de este proyecto contara con un comité operativo conformado por el Director Técnico del FNFP, Un docente de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá FCA responsable del proyecto por parte de la Universidad y el estudiante de Doctorado Vinculado al proyecto. Este comité se reunirá ordinariamente cada dos meses durante el tiempo de ejecución del proyecto.

Las funciones de este comité serán:

- Realizar el seguimiento al cumplimiento del cronograma de ejecución del proyecto.
- Alertar y establece planes de acción cuando se detecten riesgos de alteración del cronograma por cualquier causa.
- Verificar la correcta ejecución de los recursos.
- Identificar y validar, si existiese la necesidad, cualquier cambio en los rubros de ejecución del proyecto y solicitar ante el ejecutor dicha modificación.

Así mismo, este proyecto deberá contar con el comité académico el cual estará conformado por los docentes responsables del proyecto en la Universidad Nacional de Colombia y los estudiantes vinculados. Se establecerá una agenda de reuniones periódicas, cuyo fin es realizar el seguimiento académico de los procesos de investigación y profundizar en los tópicos propios del proyecto.

Dichos comités designarán un secretario, quien será el encargado de la elaboración, socialización y custodia de las actas correspondientes.

	FICHA TÉCNICA		
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62

5.5 DIVULGACIÓN DE LA INFORMACIÓN DEL PROYECTO

La divulgación de los resultados de este proyecto contempla varios componentes, orientados a los diferentes actores en la cadena agroalimentaria de la papa:

Producto de generación de conocimiento:

- Un artículo original sometido a una revista científica. Tema: Comportamiento fisiológico y génico de poblaciones de papa diploide frente al estrés abiótico por alta temperatura.
- Cuatro trabajos de grado de estudiantes de pregrado, socializados en la comunidad académica y disponibles para consulta en medios virtuales.

Productos de apropiación social de conocimiento:

- Un seminario donde se presente una estrategia de comunicación a los agricultores sobre la importancia de las colecciones, su uso y valorización de los recursos genéticos de la papa diploide.
- Una ponencia en un evento científico.

6 IMPACTOS DEL PROYECTO

6.1 IMPACTO SOCIAL

De acuerdo con las estadísticas de la cadena productiva de la papa, alrededor de 100.000 familias en Colombia dependen directamente del cultivo, de la misma forma, se estima que alrededor de otras 350.000 familias dependen indirectamente de este sistema productivo, todos ubicados en las zonas altoandinas del país, constituyendo así el principal sistema de producción agrícola del clima frío. Bajo el escenario proyectado de cambio climático para el país, las zonas de mayor afectación por el incremento en la temperatura, son las ubicadas en las cordilleras colombianas, en las cuales se distribuye la mayor proporción del área de producción de papa,

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

labor que es realizada principalmente por pequeños agricultores (menores a 3 Ha). Este proyecto permitirá ampliar las bases del conocimiento del acervo genético del país en variedades de papa diploides, en particular sobre los rasgos de tolerancia a estrés por alta temperatura, que a la fecha no se han estudiado y que son la base fundamental para realizar mejoramiento genético, buscando la tolerancia a mayores temperaturas y que son fundamentales para la adaptación de los sistemas productivos a las nuevas condiciones ambientales y la búsqueda de la sostenibilidad del sistema productivo. La información obtenida será la base del conocimiento para el desarrollo de variedades mejoradas tolerantes a mayores temperaturas y favorecerá, en el largo plazo, a los productores y sus familias que dependen de este sistema productivo, permitirá contribuir a la seguridad alimentaria de las comunidades en las zonas de producción y finalmente al abastecimiento de la población que sustenta su alimentación en este producto.

6.2 IMPACTO ECONÓMICO

En la actualidad se estima, de acuerdo con Fedepapa, que en Colombia se cultivan alrededor de 125.000 hectáreas anuales de papa en sus diferentes variedades, con una producción total aproximada de 2.700.000 toneladas/año y con un aporte al PIB agrícola, de acuerdo con el Ministerio de Agricultura, del 3.3%. Los incrementos en la temperatura ambiental, derivados del calentamiento global, tienen importantes efectos sobre la producción agrícola, particularmente en papa algunos investigadores han estimado reducciones cercanas a 35% para variedades tetraploides y en el caso de variedades diploides se ha estimado reducciones en la producción del 70% con incrementos de 3°C en la temperatura ambiental. Las estimaciones, bajo escenarios de Cambio Climático, estimados por el IDEAM, muestran incrementos de hasta 5°C en las zonas de producción en Colombia. Bajo esta condición futura, la producción de papa estaría significativamente comprometida ya que se impactaría la viabilidad económica del cultivo dada la baja productividad, reduciría el aporte de este sector al PIB agrícola y se disminuiría significativamente las cantidades de producto disponibles para el consumo, incrementando, por esta vía, su costo y reduciendo el acceso al producto de los sectores que tradicionalmente han basado su dieta en él. La generación de nuevo conocimiento sobre los recursos genéticos con que cuenta el país en su colección de papas diploides, en sus rasgos de tolerancia al estrés por

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

alta temperatura, por medio de este proyecto, constituye la base para los programas de mejoramiento genético orientados a la obtención de variedades tolerantes a mayores temperaturas. Esta es una de las principales estrategias de mitigación de Cambio climático, que contribuirán significativamente a la sostenibilidad del sistema productivo y de la economía derivada del mismo, permitirá en el largo plazo la producción de papa en las zonas aptas para el cultivo, a pesar de la condición de incremento de temperatura y el sustento de las familias que dependen económicamente de este cultivo.

6.3 IMPACTO AMBIENTAL

El incremento en la temperatura ambiental como consecuencia del Calentamiento Global, afectará significativamente las áreas de producción de papa en Colombia llegando a incrementarse, de acuerdo con los pronósticos, hasta 4-5°C en el año 2070. Este incremento en la temperatura obligará a la migración hacia zonas de mayor altitud al sistema productivo de la papa, para mantener la oferta ambiental para las variedades existentes en la actualidad. Este escenario es técnicamente inviable, dadas las condiciones propias de los ecosistemas alto andinos y la necesidad de la protección de los mismos. Este proyecto, al estudiar por primera vez en el país la respuesta de las plantas de papa al estrés por alta temperatura, permitirá identificar genotipos tolerantes, sus mecanismos fisiológicos y la expresión diferencial de genes de estos y construir información fundamental para ser empleada por los programas de mejoramiento genético en el desarrollo de variedades tolerantes a una mayor temperatura ambiental, que se adapten a las nuevas condiciones y permitan la producción en las áreas actualmente empleadas, sin la necesidad de la intervención de nuevas áreas.

6.4 CONTRIBUCIÓN AL SUBSECTOR DE LA PAPA Y AL FNFP

Este proyecto estudia, por primera vez en el país, la colección de papa diploide en sus rasgos de tolerancia al estrés por alta temperatura. Extender la frontera del conocimiento en estos rasgos, aportará una base fundamental para la adaptación de los sistemas de producción a la nueva oferta ambiental condicionada por la actual variabilidad climática y que conduce a una

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

alteración significativa en los patrones climáticos hasta el momento conocidos causando, de acuerdo con las proyecciones realizadas, una pérdida significativa en rendimientos y calidad de las cosechas. El desconocimiento del acervo genético existente para este rasgo, al ser extrapolado al subsector de la producción se traduce en una reducción de la competitividad de los productores, menor oferta de este producto para el abastecimiento de este alimento para el país, la sustitución en el mercado por otros productos y finalmente la reducción de la importancia de este subsector de la producción en el país.

Por tanto, se considera que este es un aporte significativo al conocimiento de los recursos genéticos existentes, particularmente para el grupo phureja y permitirá ampliar las posibilidades de exploración de alternativas para la solución de esta problemática en el Subsector de la producción de papa en el país a mediano y largo plazo.

7 ASPECTOS INSTITUCIONALES

7.1 RELACIÓN DEL PROYECTO CON POLÍTICAS SECTORIALES

Este proyecto se encuentra en concordancia con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible: ODS 2 Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible y ODS 13 Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos. De la misma forma, a nivel de la UN, es concordante con el área estratégica de vicerrectoría Académica: Ciencia y Tecnología para el desarrollo sostenible, biodiversidad protegida. Para ello, se trabajará en alianza de la UNAL-Bogotá y El FNFP, que en conjunto diseñará una estrategia para difundir los resultados obtenidos a organizaciones y productores de papa del Departamento de Cundinamarca, destacado en la producción de papa en el país. Se espera encontrar materiales valiosos con alelos importantes para la producción de materiales mejorados en el mediano plazo, con tolerancia al estrés por altas temperaturas y de esta manera valorizar la diversidad de nuestros recursos genéticos.

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

7.2 PARTICIPACIÓN DE OTRAS ENTIDADES (PÚBLICAS O PRIVADAS) EN EL PROYECTO

8 PRESUPUESTO

FNFP

ÍTEM	VLR UNITARIO	CANTIDAD	UND MEDIDA	VLR TOTAL 2021
SERVICIOS PERSONALES				\$ 35.500.000
Honorarios Estudiante Doctorado	2.000.000	11	meses	\$ 22.000.000
Honorarios Estudiante Pregrado	450.000	30	meses	\$ 13.500.000
GASTOS GENERALES				\$ 11.800.000
DIVULGACIÓN				\$ 11.800.000
Capacitaciones Agricultores				\$ 1.800.000
Socialización con Agricultores y Técnicos FNFP	15.000	120	Capacitación	\$ 1.800.000
Divulgación Proyecto				\$ 10.000.000
Publicaciones de resultados en revistas Indexadas	5.000.000	2	Publicación	\$ 10.000.000
ESTUDIOS Y PROYECTOS				\$ 66.000.000
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA				\$ 66.000.000
Secuenciación de RNA (Transcriptómica)	1.000.000	48	Análisis	\$ 48.000.000
Compra de reactivos Biología Molecular	18.000.000	1	Reactivos	\$ 18.000.000
TOTAL PRESUPUESTO				\$ 113.300.000

FEDEPAPA

ÍTEM	VALOR
SERVICIOS DE PERSONALES	10.029.517
GASTOS GENERALES	4.973.956
TOTAL CONTRAPARTIDA	15.003.472

	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

UNIVERSIDAD NACIONAL

ÍTEM	VLR TOTAL 2021
Servicios Personales	\$ 60.496.128
Profesor carrera docente	\$ 60.496.128
INFRAESTRUCTURA	\$ 80.000.000
Infraestructura	\$ 80.000.000
TOTAL PRESUPUESTO	\$ 140.496.128



	FICHA TÉCNICA			
	VERSIÓN: 03	FECHA: 20-05-2020	CÓDIGO: FNFP-F-FP-35-62	

Carta de compromiso

Hacemos constar que la información contenida en el presente documento y los soportes entregados son confiables y veraces, y estamos dispuestos a suministrar oportunamente cualquier información adicional requerida para la viabilización del proyecto.

GERMAN PALACIO VELEZ
GERENTE GENERAL
PROPONENTE Y EJECUTOR