



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

RECTORADO

RESOLUCIÓN N° 101-2022-R

Lambayeque, 15 de febrero de 2022

VISTO:

El Oficio N° 069-2022-VRINV, de fecha 10 de febrero del 2022, presentado por el Vicerrector de Investigación de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Dr. Mauro Adriel Ríos Villacorta, sobre la Ampliación del Cronograma del Proyecto de Investigación denominado "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019" (Expediente N° 622-2022-SG).

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 18° de la Constitución Política del Perú, señala que cada universidad es autónoma en su régimen normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico; y que las universidades se rigen por sus propios estatutos en el marco de la Constitución y de las leyes.

Que, el artículo 8° de la Ley N° 30220, Ley Universitaria, y el artículo 9° del Estatuto de la Universidad, establecen que el Estado reconoce la autonomía universitaria, la misma que es inherente a las universidades y se ejerce de conformidad con lo establecido en la Constitución, la ley universitaria y las demás normas aplicables.

Que, mediante Resolución N° 223-2019-VRINV, de fecha de 02 de diciembre del 2019, se aprobó los resultados del Concurso de Financiación de Proyectos Unidisciplinarios para estudiantes de la UNPRG, donde resultó como uno de los ganadores el Proyecto de Investigación denominado "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019".

Que, mediante Resolución N° 756-2020-R, de fecha 12 de octubre del 2020, se resolvió ratificar, con eficacia anticipada, la Resolución N° 223-2019-VRINV, de fecha 02 de diciembre del 2019, en el extremo que da como ganadores del Concurso de Financiación de Proyectos Unidisciplinarios para estudiantes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, a los estudiantes que han obtenido los primeros puestos, cuyo responsable es la Oficina General de Promoción de las Investigaciones VRINV. Asimismo, se resolvió otorgar la cantidad de S/5000.00 Soles a los ganadores del Concurso de Financiación de Proyectos Unidisciplinarios para estudiantes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Que, mediante Resolución N° 107-2020-R, de fecha 27 de enero del 2020, se ratificó la Resolución N° 228-2019-VRINV, de fecha 12 de diciembre del 2019, que amplía la Resolución N° 223-2019-VRINV, de fecha 02 de diciembre del 2019, en el sentido de incorporar a los equipos ganadores del Concurso de Financiación de Proyectos Unidisciplinarios para estudiantes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que han obtenido los primeros puestos.

Que, mediante Resolución N° 025-2020-R-E, de fecha 28 de diciembre del 2020, se resuelve ampliar la Resolución N° 756-2020-R, de fecha 12 de octubre del 2020, en el sentido de precisar el nombre del responsable que se hará cargo de la subvención, a fin de cubrir los gastos que les demande la ejecución de los proyectos de investigación.

Que, mediante escrito, de fecha 04 de febrero del 2022, la Bachiller Julissa Alejandra Barturén Sandoval, responsable del Proyecto de investigación "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019", solicita la ampliación del cronograma del citado Proyecto de investigación debido a la demora en el desembolso del dinero correspondiente por parte de la entidad financiadora (UNPRG) y al estado de emergencia que afronta nuestro país a causa de la COVID-19, el cual ha generado que muchos trámites se vean afectados, dificultando el desembolso del financiamiento y, por ende, la compra de insumos y reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto. Al respecto, precisa la recurrente que, mediante Resolución N° 243-2021-DGA-UNPRG/VIRTUAL, de fecha 21 de noviembre del 2021, se aprobó el reconocimiento del adeudo y el pago respectivo a los ganadores de la subvención por trabajos de investigación unidisciplinarios, por lo que el desembolso del dinero por parte de la entidad financiadora (UNPRG) recién se realizó el día 14 de diciembre del 2021. Así las cosas, la recurrente solicita la aprobación de la ampliación del plazo de ejecución del Proyecto de investigación



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

RECTORADO

RESOLUCIÓN N° 101-2022-R

Lambayeque, 15 de febrero de 2022

denominado "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019", considerando que esta demora en el cumplimiento de lo programado son motivos extraordinarios de fuerza mayor que escapan a la responsabilidad del equipo ejecutor del proyecto.

Que, mediante Oficio N° 061-2022-VRINV, de fecha 04 de febrero del 2021, el Vicerrector de Investigación de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, atendiendo a la solicitud de ampliación del cronograma del Proyecto de investigación denominado "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019", le solicita al Director del Instituto de Investigación, Dr. Ernesto Karlo Celi Arévalo, emita su informe y opinión al respecto.

Que, mediante Oficio N° 011-2022-UNPRG/IV/EKCA, de fecha 09 de febrero del 2022, el Director del Instituto de Investigación, Ernesto Karlo Celi Arévalo, atendiendo a lo solicitado por la Bachiller Julissa Alejandra Barturén Sandoval, manifiesta que resulta pertinente atender a lo solicitado por el Semillero de Investigación Detectives del ADN, en cuanto a la ampliación del cronograma de ejecución del Proyecto de investigación "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019", ya que las razones presentadas son atendibles.

Que, mediante Oficio N° 069-2022-VRINV, de fecha 10 de febrero del 2022, el Vicerrector de Investigaciones de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Dr. Mauro Adriel Ríos Villacorta, solicita se emita el acto resolutorio de ampliación del Cronograma de Ejecución del Proyecto de investigación "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad Perú – 2019", hasta el mes de diciembre del 2022.

Que, en uso de las atribuciones conferidas al Rector, en el artículo 62.1 de la Ley Universitaria y el artículo 24.1 del Estatuto de la Universidad.

SE RESUELVE:

Artículo 1°: Aprobar la ampliación del Cronograma de Ejecución del Proyecto de Investigación ganador denominado "Genotificación de *Diatraea Saccharalis Fabricius* utilizando los microsatélites Dsc2, Dsc13, Dsc14 en cultivo de *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar) de las Regiones Lambayeque y La libertad, Perú – 2019", hasta el mes de diciembre del 2022, de acuerdo al anexo que se adjunta y forma parte de la presente Resolución.

Artículo 2°: Dar a conocer la presente resolución al Vicerrector Académico, de Investigación, Dirección General de Administración, Oficina de Planificación, Planeamiento y Presupuesto, Unidad de Recursos Humanos, Oficina General de Asesoría Jurídica, interesado, Órgano de Control Institucional, interesado y demás instancias correspondientes.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE



Dr. FREDDY WIDMAR HERNÁNDEZ RENGIFO
Secretario General (e)



Dr. ENRIQUE WILFREDO CÁRPENA VELÁSQUEZ
Rector



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



1. AUTORES

Detectives del ADN

2. TÍTULO DEL PROYECTO

Genotipificación de *Diatraea saccharalis Fabricius* usando los microsátélites *Dsc2*, *Dsc13*, *Dsc14* en cultivo de *Saccharum officinarum L.* (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad, Perú - 2019.

3. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Síntesis de la situación problemática

La caña de azúcar es considerada uno de los principales cultivos agroindustriales en el Perú, el cual genera un aporte importante al valor bruto de la producción agropecuaria y en especial en el subsector agrícola (MINAGRI, 2013). El cultivo cuenta con varias zonas productivas en los departamentos de Lambayeque (Pomalca, Olmos, Pucalá, Cayaltí y Tumbán); La Libertad (Casa Grande, Cartavio y Laredo); Ancash (San Jacinto); Lima (Andahuasi, El ingenio y Paramonga) y Arequipa (Chucarapi). (MINAGRI, 2013)

Dentro de las plagas registradas para el cultivo de caña de azúcar se encuentra *Diatraea saccharalis Fabricius*, una de las plagas de mayor importancia en el cultivo, debido a la persistente infección y disminución drástica de la producción de sacarosa. En la Libertad se ha reportado pérdidas estimadas por cada 1% de infestación de 0.04 a 0.005 Kg/t de azúcar recuperable. (Villacorta, 2015)

El control de la infección se ha venido dando a través de la ejecución de un manejo integrado de plagas (Santisteban, 2015); que requiere información más detallada sobre la estructura y dinámica de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius*, Esta información se obtiene en forma eficiente mediante la utilización de marcadores moleculares (Espinoza, Fuentes-Contreras, & Ramirez., 2007), Entre ellos tenemos los microsátélites y RADPs.

En el Perú son escasos los antecedentes de estudios que emplean marcadores microsátélites para la genotipificación de *Diatraea saccharalis Fabricius*. Este es el motivo principal para la ejecución del presente trabajo, tomando como base el trabajo de (Pavinato, y otros, 2013) realizado en Brasil, en el que se reporta locus microsátélites específicos para *Diatraea saccharalis*.

La finalidad del presente proyecto es genotipificar *Diatraea Saccharalis Fabricius* para los distintos genotipos de larva de polilla que infectan la caña de azúcar, base para estudios específicos de determinados plaguicidas.

3.2. Formulación del problema de investigación

¿Cuáles son los genotipos de las poblaciones de *Diatraea Saccharalis Fabricius* en los cultivos de *Saccharum officinarum L.* (Caña de Azúcar) de las regiones de Lambayeque y La Libertad?

3.3. Objetivos

Objetivo General

Genotipificar poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* del cultivo de *Saccharum officinarum L.* (Caña de Azúcar) usando tres microsatélites *Dsc2*, *Dsc13*, *Dsc14*, de las regiones Lambayeque y La Libertad.

Objetivos Específicos

- Determinar los alelos y sus frecuencias de los alelos de los microsatélites *Dsc2*, *Dsc13* y *Dsc14*.
- Determinar la variación genética entre y dentro de las poblaciones de *Diatraea saccharalis Fabricius* en el cultivo de *Saccharum officinarum L.* (Caña de Azúcar) de las regiones Lambayeque y La Libertad.

4. ANTECEDENTES Y BASES TEORICAS

4.1. Antecedentes

La Biología Molecular durante los últimos años ha tenido un gran apogeo con respecto a la caracterización y variabilidad molecular en plagas claves de cultivos, una de ellas es *Diatraea Saccharalis*, plaga de gran importancia económica en el cultivo de caña de azúcar.

(Neto, Barros, Morais, & Loreto., 2017) analizando la secuencia intergénica de los ARN 5.8S y 28S en el espacio transitorio (ITS 2) de *Diatraea Saccharalis* y *Diatraea Flavipennella*, encontró ocho secuencias de microsatélites diferentes, de las cuales tres de ellas (CA, CAG y TCG) son específicas en *Diatraea Saccharalis*.

(Pavinato, y otros, 2013), describe 16 loci de microsatélites, de los cuales 12 marcadores fueron polimórficos (*Dsc1*, *Dsc2*, *Dsc3*, *Dsc7*, *Dsc9*, *Dsc10*, *Dsc11*, *Dsc13*, *Dsc14*, *Dsc16*, *Dsc19* y *Dsc20*), variando el número de alelos entre 2 a 7 para *Diatraea Saccharalis*.

(Weiwei, y otros, 2011) describe el genoma mitocondrial de *Diatraea Saccharalis*, constituido por 13 genes codificantes de proteínas, 2 genes de rRNA y 22 genes de tRNA, sumando un total de 15,490 pb.

A su vez el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia en colaboración con (Goyes., 2008), ejecutaron un proyecto en el Valle geográfico del río Cauca, en el cual utilizaron ADN mitocondrial y caracteres de genitalia interna para la determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Diatraea Saccharalis*.

4.2. Bases teóricas

4.2.1. *Diatraea saccharalis*

4.2.1.1. Ciclo biológico (Laverde & Orozco, 2014)

Huevo

Miden alrededor de 1 mm de largo, son ovalados aplanados, al tercer día de haber sido puestos muestran una coloración amarillenta; se colocan en masas de aproximadamente 30 huevos o más.

Larva

Cuando está desarrollada mide de 25 a 30 mm. Pueden existir franjas longitudinales a lo largo del dorso de color variable pero más claras que las de otras especies.

Pupa

Es de color oscuro. Presenta dos protuberancias en forma de cuerpos cortos en la cabeza y en el extremo caudal presentan un conjunto de espinas en forma de dientes de 20 mm.

Adulto

Son de color amarillento siendo los machos algo más oscuros. Su expansión alar es de 30 mm y cuando están en reposo las alas se pliegan sobre el cuerpo a manera de un techo de dos aguas y los palpos labiales presentan una mayor densidad de setas que en otras especies.

4.2.2. MICROSATÉLITES

Son secuencias de ADN compuestas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases (Cortés, 2004). Estos marcadores se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud y se distribuyen tanto en regiones codificantes como no codificantes, por lo tanto, son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane, Bargelloni, & Patarnello, 2002)

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Metodología

5.1.1. Recolección del material biológico en campo

Los muestreos de larvas de *Diatraea saccharalis* se realizarán en campos industriales y semi-industriales de caña de azúcar en las regiones La Libertad (Laredo y Casa Grande) y Lambayeque (Tumán).

5.1.2. Características de las larvas

30 larvas de III al IV estadio de *Diatraea saccharalis* por cada lugar de muestreo. Se deberá verificar que no se encuentren parasitadas por *Paratheresia claripalpis* o infectadas con *Nosema sp.* y de esta manera asegurar la pureza del ADN que será extraído.

5.1.3. Extracción de ADN

El ADN genómico se extraerá según lo expuesto por (Heideman, Munhoz, Pattaro Júnior, & Fernandez, 2010). las muestras serán maceradas en nitrógeno líquido, luego se agregará 200 ul de buffer de homogenización. Las proteínas serán retiradas agregando un volumen de 40uL de Proteinasa K. Esto se incubará por 1 hora a 60 °C. El ADN será extraído y purificado.

5.1.4. Secuencia de cebadores

Se usarán los siguientes locus microsatélites descritos por (Pavinato, y otros, 2013).

Locus	Acceso a GenBank	Primera secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Repeat motif	Ta (°C)	(bp)	N _A
Dsc2	GF111061	F:GCGGTGCCTCTTTGTCATA R:TTGACCAACTACTGCAAGACG	(CA) ₁₉	60	188–230	6
Dsc13	GF111053	F:CGTGGACTAACCCATAGAAGAT R:GGTTTAGCAGAACTGGCATA	(GT) ₁₈	54	220–270	7
Dsc14	GF111991	F:CTATTCTCCGTTCCGCTGAT R:GAATGAGATTATGTGTTATGTGTATGC	(AC) ₁₆	60	84 – 104	6

F=secuencias de cebadores directos; R=secuencias de cebadores inversos; Ta= temperatura de incubación; N_A= número de alelos.

5.1.5. Preparación del gel de poliacrilamida al 4%

Se mezclará en un beacker 4mL de solución de acrilamida al 4% y 6 mL de agua destilada, con 4 mL de TBE 5X y 6 mL de agua destilada, se agregará 25 uL de tetrametiletilenediamina (TEMED) y 250 uL de persulfato de amonio (APS) al 10%, esto será diluido y se agregará en placas; se colocará el peine para generar los pocios. Luego de esto se dejará reposar por 20 minutos para la polimerización, luego de esto, se extraerá el peine y se implementará en la cámara de electroforesis agregando TBE 1X en la cubeta superior e inferior y se dejará cargar por 10 minutos a 80 volt.

5.1.6. Tinción y visualización

Se preparará solución fijadora, para colocar las placas de corrido. Luego se preparará solución de tinción, en la cual permanecerá por 7 min. Se procederá a la lavar 3 veces para luego agregar solución de revelado por 20 minutos, para finalmente agregar 100 mL de solución fijadora. Por último, se visualizará en un trasluminador de luz blanca para obtener los perfiles electroforéticos como resultado.

5.1.7. Análisis estadístico

Para el análisis de diversidad genética se construirá una matriz de presencia y ausencia de bandas con tamaños iguales, cada una con identificación individual. La variación entre los individuos

será estimada usando el método de Nei. Este análisis se realizará en el programa POPGENE 1.32 (Yeh, Yang, & Boyle, 1999)

5.2. Población:

Individuos de *Diatraea Saccharalis* de los departamentos de Lambayeque y La Libertad.

5.3. Muestra:

30 larvas de III al IV estadio de *Diatraea saccharalis* por cada lugar de muestreo.

5.4. Técnica:

La técnica a utilizar será la observación, los datos serán recolectados a partir de la información obtenida de los resultados de las pruebas moleculares.

5.5. Equipos y Materiales:

Micropipetas, termociclador, centrífuga, baño maría, autoclave y refrigerador

Pipetas de 1mL y 10 mL, tubos para PCR, Tips de 10 ul, Tips de 100 ul, algodón, papel secante, alcohol, guantes, mascarillas.

6. ACTIVIDADES Y RECURSOS

6.1. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	2019			2022											
	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
FASE DE PLANEAMIENTO															
Revisión bibliográfica y Elaboración del Proyecto	X	X													
Presentación y Aprobación del Proyecto		X	X												
FASE DE EJECUCIÓN															
Recolección y procesamiento de muestras				X	X										
Registro de datos					X	X	X								
Análisis estadístico de los datos								X	X						
FASE DE COMUNICACIÓN															
Análisis e interpretación									X	X	X				
Elaboración de informe final												X	X		
Presentación de Informe Final														X	
Elaboración de artículo de investigación														X	
Presentación de artículo de investigación															X

6.2. PRESUPUESTO

Cantidad	Producto	Marca	Presentación	Precio S/.
Material de Laboratorio				
10	Pipetas de 1ml, 10 mL	Marienfeld	Unidad	45.00
1000	Tubos para PCR		Unidad	160.40

2000	Tips de 10 ul y 100ul		Unidad	76.00
3	Microsatelites		Unidad	900.00
1	Kit de extraccion de DNA		Unidad	700.00
1	Kit PCR		Unidad	337.00
1	dNTPs		Unidad	255
2	Taq-polimerasa x 500U		Unidad	1,585
100	Acrilamida y Bisacrilamida		g	420.00
1	Agua Ultra Pura		l	480.00
1	Agua bidestilada		l	20.00
Material de Impresión				250.00
Publicaciones				350.00
TOTAL				5,578.40

7. REFERENCIAS:

- Cortés, M. L. (2004). Análisis de la Variabilidad Genética en Razas Equinas Autóctonas Españolas detectada mediante microsatélites. *Biblioteca de la Universidad Complutense*, 49-70.
- Espinoza, J. L., Fuentes-Contreras, E., & Ramirez., W. B. (2007). Utilización de Microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile Central. *Agricultura Técnica*, 244-257.
- Goyes., P. C. (2008). *Caracterización morfológica y molecular de especies de Diatraea spp. (Lepidoptera: Crambidae)*. Santiago de Cali, Colombia.
- Heideman, C., Munhoz, R., Pattaro Júnior, J., & Fernandez, M. (2010). Genetic diversity analysis with RAPD linked to sex identification in the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. *Genetics and Molecular Research* 9 (4), 2343-2348.
- Laverde, L. A., & Orozco, G. A. (2014). Los barrenadores de la caña de azúcar, *Diatraea* spp., en el valle del río Cauca. *Cenicaña*, 24-27.
- MINAGRI. (2013). Principales aspectos de la Cadena Agropecuaria. Obtenido de www.minag.gob.pe
- Neto, M. S., Barros, R. P., Morais, M. A., & Loreto., V. Q. (2017). ITS2 as a molecular marker for the identification of *Diatraea saccharalis* and *D. flavipennella* and possible infection with *Cotesia* spp. *Genetica and Molecular reserch : GMR*, 7.
- Pavinato, V., Silva-Brandão, K., Monteiro, M., Zucchi, M., Pinheiro, J., & Dias, F. y. (2013). Development and characterization of microsatellite loci for genetic studies of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Genetics and Molecular Research*.
- Santisteban, E. M. (2015). "Manejo agronómico de *Saccharum officinarum* L., en Santiago de Cao, Ascope- La Libertad".

- Vásquez, A. V. (2012). Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de Caña de Azúcar . *Agrobanco. UNALM.*
- Villacorta, L. D. (2015). Pérdida de azúcar por daño de *Diatraea saccharalis* Fabricius y hongos patógenos en caña azúcar, variedades H 32 8560 y México 73-523, Casa Grande, La Libertad, 2014. *Biblioteca digital.*
- Weiwei, L., Xiuyue, Z., Zhenxin, F., Bisong, Y., Fangneng, H., & Emily, K. y. (2011). Structural Characteristics and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *DNA and Cell Biology Vol. 30, No. 1.*
- Yeh, F., Yang, R., & Boyle, T. (1999). POPGENE Version 1.32: Microsoft Window- Based Freeware for Population Genetics Analysis. University of Alberta, Edmonton.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology 11*, 1-16.