

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DIRECCIÓN DE PROYECTOS

INFORME FINAL DE PROYECTO

Código del Proyecto:
5401-1510-9301

Nombre del proyecto:
Identificación de factores de transcripción putativos en *Stevia rebaudiana* y *Tagetes patula* como herramienta para posterior uso en la descripción de rutas metabólicas de interés.

Departamento académico responsable:
Escuela de Biología.

Departamentos participantes:
Escuela de Ingeniería en Computación

Programas participantes:
Centro de Investigación en Computación (CIC) del ITCR – Programa e-Science.

Instituciones externas participantes:
Universidad de California (UCDavis) - Seed Biotechnology Center

Investigadora responsable:
MSc. Silvana Alvarenga Vetunolo.

Otros investigadores:
MSc. Giovanni Garro Monge
Dr. Francisco José Torres Rojas
MGP. Adriana Álvarez Figueroa
Licda. Karol Jiménez Quesada
MBA. Karla Valerín Berrocal

Período 2013 - 2014

1. Cumplimiento de objetivos

Cuadro 1. Cumplimiento en el logro de objetivos y actividades.

Objetivo general: Identificar secuencias génicas relacionadas con factores de transcripción putativos en <i>Stevia rebaudiana</i> y <i>Tagetes patula</i>					
Objetivo específico	Actividades	Productos esperados	Fecha propuesta de cumplimiento	% avance	Comentarios
Implementar técnicas estandarizadas de extracción de ARN de alta calidad para la posterior obtención de ADN copia.	<p>Comparar los resultados de extracción de ARN obtenidos con los kit de Qiagen y Macherey-Nagel.</p> <p>Comprar el servicio de extracción de ARN al <i>Seed Biotechnology Center</i> de la UC Davis.</p> <p>Cuantificar la cantidad de ARN extraído con el equipo Nanodrop 2000®</p> <p>Verificar la calidad de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.</p> <p>Recopilar información técnica relacionada con la construcción de programas informáticos para análisis de información biológica.</p> <p>Estudio de los requerimientos de</p>	ARN de alta calidad para ser usado en metodologías de obtención de ADN copia (ADNc)	Enero a agosto 2013	100%	<p>El protocolo de extracción de ARN que se utilizó exitosamente para la obtención de este ácido nucleico fue "RNA isolation from plant tissue or filamentous fungi" del kit NucleoSpin® RNA Plant de Macherey Nagel. Además, se definieron todas las condiciones necesarias para trabajar, indispensables para evitar la degradación de la molécula.</p> <p>Los datos de concentración, densidad óptica y el cálculo del valor de integridad, indicaron que el ARN obtenido mediante esa metodología, era de alta calidad; lo mismo se demostró a través de electroforesis en gel de agarosa.</p> <p>Para este objetivo se concluyó exitosamente la programación de una herramienta informática, que ahora está disponible en la web denominada <i>E-pathway</i>, mediante la cual se logró unificar la búsqueda de información génica que se encuentra ya disponible</p>

	procesamiento informático para el manejo de la información generada en el proyecto.				en las páginas del NCBI (National Center for Biotechnology Information), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y Expasy-Prosit.
Obtener ADN copia para el análisis de secuencias génicas relacionadas con los factores de transcripción en <i>Stevia rebaudiana</i> y <i>Tagetes patula</i>	<p>Realizar extracciones con el kit Ambion® para extracción de ADN copia y secuenciar las muestras mediante compra del servicio a la UNAM o UC Davis.</p> <p>Realizar una pasantía corta para que dos investigadores del proyecto visiten el Seed Biotechnology Center de la UC Davis.</p> <p>Obtener ADN copia utilizando los protocolos del Seed Biotechnology Center de la UC Davis</p> <p>Comparar los resultados obtenidos siguiendo los protocolos del Seed Biotechnology con los generados empleando el kit Ambion® .</p> <p>Proponer alternativas para el manejo y análisis</p>	Secuencias de ADN copia	Julio a diciembre 2013	100%	<p>Se comprobó la exitosa obtención de ADN copia con el Retrotranscript kit marca Ambion®, mediante la amplificación con primers ITS después del proceso de retrotranscripción del ARN de <i>Stevia</i>. Además la capacitación en la Universidad de California en Davis permitió obtener protocolos de retrotranscripción empleando el kit PROMEGA.</p> <p>Ambos protocolos resultaron exitosos para la generación de ADN copia a partir de ARN total, no obstante, se decidió que para efectos del presente proyecto se generaría más información molecular de las especies en estudio, si se obtenía su transcriptoma. Por tanto, se recurrió a la compra de servicios de secuenciación a la empresa AXEQ Technologies; para este fin se enviaron a Korea muestras de ARN total.</p> <p>Una vez obtenidos los archivos de secuenciación (librerías de ADN copia), se trabajó en el diseño de <i>primers</i> específicos para la amplificación de genes reportados para <i>Stevia rebaudiana</i>.</p>

	informático de la información.				Como método alternativo se hicieron análisis de microarreglos para ambas especies.
Implementar técnicas informáticas que permitan delimitar los algoritmos estadísticos para la identificación de factores de transcripción putativos en ambas especies.	<p>Realizar dos pasantías cortas a centros de investigación donde se implementen las herramientas informáticas para análisis de información biológica.</p> <p>Verificar y complementar la recopilación de la información biotecnológica requerida para moldear las pruebas de concepto.</p> <p>Diseñar pruebas estadísticas a través de herramientas informáticas.</p>	Secuencias depuradas y organizadas para comparación con especies modelo.	Enero a setiembre 2014	100%	<p>La pasantía a la Universidad de California en Davis fue suficiente para generar las pautas iniciales en el trabajo con transcriptomas.</p> <p>El análisis de calidad de los fragmentos de ADNc amplificados se realizó con la herramienta FASTQC (Anexo 3); la eliminación de nucleótidos erróneos al inicio y final de los fragmentos se realizó con los programas FASTXTool Kit y con RobiNA (Anexo 4), mientras que los alineamientos contra factores de transcripción descritos para <i>Arabidopsis thaliana</i> y otras especies de la familia <i>Asteraceae</i>, se ejecutó con RobiNA también (Anexo 5).</p>
Desarrollar agrupamientos de las familias de factores de transcripción putativas de ambas especies a partir del análisis de secuencia ADN copia obtenidas.	<p>Hacer uso de las bases de datos y herramientas bioinformáticas existentes, y las pruebas estadísticas diseñadas, para analizar las secuencias de ADN copia y posterior identificación de factores de transcripción.</p> <p>Implementar pruebas</p>	Factores de transcripción putativos identificados.	Abril a noviembre 2014	100%	<p>La predicción de sitios de anclaje de factores de transcripción al ADN, relacionados con la síntesis de glicósidos en <i>Stevia</i> se realizó mediante el análisis de regiones promotoras de genes descritos para esta especie, gracias a la herramienta PLACE.</p> <p>Posteriormente se continuó con la búsqueda de las secuencias de</p>

	estadísticas y de concepto para el procesamiento de la información.				<p>factores de transcripción en <i>A. thaliana</i> ligadas a estos sitios de anclaje.</p> <p>Con la búsqueda anterior se determinó que las familias MYC y MYB de factores de transcripción tenían un rol importante en la síntesis de metabolitos secundarios en <i>S. rebaudiana</i>, por lo que se procedió a la búsqueda de secuencias relacionadas en especies de la familia Asteraceae para alinear contra los transcriptomas de las dos especies medicinales en estudio.</p> <p>Las secuencias de factores de transcripción se alinearon contra los transcriptomas empleando la herramienta RobiNA (Anexo 5).</p>
Comparar la incidencia de los factores de transcripción putativos en ambas especies para su posterior análisis de filogenia.	Comparar la incidencia de los factores de transcripción en ambas especies, y relacionarlo en términos de filogenia, mediante pruebas estadísticas y uso de las bases de datos y herramientas bioinformáticas existentes	Relaciones de filogenia entre las especies	Julio a diciembre 2014	100%	El cumplimiento de este objetivo incluyó la elaboración de árboles filogenéticos empleando las secuencias de factores de transcripción de las familias MYC y MYB reportados en especies de la familia <i>Asteraceae</i> .

2. Cumplimiento del plan de difusión

Cuadro 1. Cumplimiento de la divulgación de los resultados del proyecto.

Nombre de obra	Tipo de obra	Estado	Base de datos de indexación	Nombre de Evento	Comité científico (Sí o No)
Herramientas bioinformáticas para el estudio de compuestos bioactivos en plantas	Exposición académica	-	-	XIV Almuerzo Académico Informal. VIE. ITCR.	No
Herramientas bioinformáticas para el estudio y estimulación de la ruta metabólica de síntesis de glicósidos en <i>Stevia rebaudiana</i>	Ponencia en Congreso	-	-	Biología Habana 2014	Sí

3. Participación Estudiantil

Cuadro 3. Participación estudiantil dentro del proyecto.

Nombre de obra	Tipo de obra (Tesis o práctica)	Autores
Identificación de secuencias genéticas que codifican para factores de transcripción, participante en la ruta metabólica de síntesis de glicósidos en <i>Stevia rebaudiana</i> .	Tesis	Ing. Karol Jimenez Quesada
Participación de estudiantes (asistentes) (ITCR)	Sofía Campos Delgado Pablo Andrés Vargas Rosales	

4. Ejecución Presupuestaria

Cuadro 4. Ejecución de presupuesto aprobado en el proyecto.

Recursos	Monto	Porcentaje (%)
Recursos ejecutados	₡ 5,420,546.33	90.34%
Recursos Comprometidos	₡ 514,888.42	8.58%
Total ejecutado	₡ 5,935,434.75	98.92%
Total asignado	₡ 6 000 000	100%

5. Limitaciones o problemas encontrados:

Al inicio del proyecto se dificultó la obtención de ARN de calidad debido lo fácil que este se degrada. Una vez que se contaba con nitrógeno líquido para la extracción, se determinó que otro factor que estaba incidiendo en la baja calidad del ARN obtenido y su pronta degradación, se debía a la temperatura ambiental, ya que se descompuso el aire acondicionado en el laboratorio, y por falta de presupuesto no pudo ser reemplazado, por lo que se optó por realizar las extracciones en el cuarto de transferencia de cultivo de tejidos, solucionándose el problema de degradación.

Existe la posibilidad de que el factor temperatura haya influido también en la obtención del ADNcopia, ya que este se obtiene a partir del ARN extraído, y esta molécula es muy inestable fuera de la célula, por lo que una alta temperatura en el ambiente, puede hacer que la molécula se degrade y se pierda. Por tanto, la secuenciación del transcriptoma se realizó enviando desde Costa Rica muestras de ARN total, a partir de las cuales se separó el ARN mensajero y se retrotranscribió a ADN copia en Korea. De esta forma se solventó el problema inicial y además se generó más información biológica de la que se había estimado.

Otra limitante que se presentó a lo largo de todo el proyecto fue la falta de un congelador de -70°C , esto porque el que posee el CIB estuvo dañado durante la ejecución del proyecto. Es importante almacenar las muestras a esta baja temperatura para evitar su degradación.

6. Observaciones generales y recomendaciones

Un futuro análisis de expresión génica mediante la secuenciación de ADNc de plantas medicinales, se facilitaría mediante el ensamble de un transcriptoma *de novo* proveniente de una secuenciación completa de al menos 3 repeticiones de ARN proveniente de agrupaciones de muestras biológicas (*pool de genes*), con las cuales generar al menos 3 teras de información en cada repetición.

Pueden realizarse ensayos previos de expresión de genes de interés mediante la técnica de qPCR proponiendo un diseño experimental sólido que facilite la evaluación del cambio en la respuesta de la planta en términos de síntesis de compuestos bioactivos, de acuerdo con diferentes condiciones ambientales.