

## **INFORME CIENTIFICO DE BECA**

Legajo N°:

**BECA DE ESTUDIO** 2° año

**PERIODO** Abril 2014

**1. APELLIDO:** CASTAINGTS

**NOMBRES:** MELISSE

**Dirección Particular: Calle:** N°:

**Localidad:** La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

**Dirección electrónica (donde desea recibir información):** melisse.castaingts@gmail.com

**2. TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Identificación y caracterización de pequeños RNAs regulatorios en la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y su par simbióticos *Rhizobium etli*.

**3. OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

**BECA DE ESTUDIO: 1° AÑO:** *Fecha de iniciación:* abril 2013

**2° AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1° AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**2° AÑO:** *Fecha de iniciación:*

**4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

*Universidad y/o Centro:* Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

*Facultad:* Facultad de Ciencias Exactas

*Departamento:* Ciencias Biologicas

*Cátedra:*

*Otros:* Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)

*Dirección: Calle:* 49 esq 115 *N°:*

*Localidad:* La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 221 4229777

**5. DIRECTOR DE BECA**

*Apellido y Nombres:* ZANETTI MARIA EUGENIA

*Dirección Particular: Calle:* N°:

*Localidad:* Villa Elisa *CP:* 1824 *Tel:*

*Dirección electrónica:* ezanetti@biol.unlp.edu.ar

**6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.** (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Durante el primer año de beca, me he dedicado a la generación de bibliotecas de pequeños RNAs (sRNAs) de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con cepas de *R. etli* de alta y baja eficiencia en la nodulación. Para ello, se generaron tres réplicas biológicas de tejido de raíces de *P. vulgaris* de la variedad mesoamericana NAG12, que fue colectado 24 horas después de la inoculación con los rizobios. A partir de dicho tejido se aisló el RNA total y se purificó el RNA de bajo peso molecular mediante separación electroforesis en geles de acrilamida. A partir de este RNA de bajo peso molecular se generaron bibliotecas utilizando el kit TruSeq Small RNA preparation kit, según recomendaciones del proveedor (Illumina). Se generaron bibliotecas a partir de las dos de las tres réplicas biológicas y de las tres condiciones ensayadas: raíces inoculadas con el medio de cultivo sin bacteria (condición control), inoculadas con SC15 (bacteria la más eficiente) y 55N1 (menos eficiente) obteniéndose un total de seis bibliotecas. En cada biblioteca se utilizaron diferentes adaptadores indexados (bar coded) que permiten luego poollear las bibliotecas y realizar la secuenciación en una misma línea abaratando así el costo de secuenciación. La concentración e integridad de las bibliotecas fueron analizadas mediante electroforesis capilar utilizando un Agilent 2100 Bioanalyzer. Los resultados obtenidos indicaron que las bibliotecas contenían una alta concentración de cDNAs y buena calidad (presencia de un único pico) sin productos revelarse de degradación. Las bibliotecas se poollearon y fueron enviadas a secuenciar al servicio HTS de University of California Riverside, USA. Dichas muestras han sido recibidas en el mencionado servicio y están a la espera para su pronta secuenciación en un secuenciador HiSeq2000. Para ello, se realizarán corridas que arrojan lecturas simples (single reads) de 50 pares bases.

Por otra parte hemos iniciado un proyecto que apunta a analizar la función de varios microRNAs (miRNAs), para los cuales estudios de expresión previos indican que podrían cumplir algún rol importante durante la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios. Entre ellos se encuentran varias isoformas del miR169 y el miR390. Ensayos de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) nos permitieron analizar la expresión de dichos precursores en distintos órganos y tejidos de *P. vulgaris*, revelando que algunas de las isoformas de miR169 se expresan específicamente en nódulos formados por la cepa más eficiente. Para analizar la función de estos miRNAs se utilizará una estrategia que involucra la obtención de plantas que acumulan altos niveles (sobrexpresión) de dichos miRNAs y el análisis fenotípico asociado a la nodulación (ver plan de trabajo presentado originalmente). Utilizando cDNAs como molde, se amplificaron los precursores de miR169 y miR390, los cuales fueron clonados en el vector pENTRY/D/TOPO. Dichos clones fueron enviados a secuenciación y luego de confirmar su identidad, los mismos serán recombinados en el vector pK2GW7 y luego utilizados para la transformación de raíces de poroto mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

En paralelo, se evaluó la expresión de distintos miembros de las tres subunidades (A, B y C) de factores de transcripción Nuclear Factor Y, los cuales son estudiados desde hace varios años en nuestro laboratorio. Se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de 9 miembros de la familia NF-YA, 16 miembros de la familia NF-YB y 7 miembros de la familia NF-YC. Los resultados obtenidos forman parte de un manuscrito en preparación, el cual será enviado próximamente a publicación: Carolina Rípodas, Mélişe Castaingts, Flavio Blanco and María Eugenia Zanetti. The NF-Y family of transcription factors of *Phaseolus vulgaris*: annotation, phylogenetic and expression analysis.

**7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.**

**7.1. PUBLICACIONES.** Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la

publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

**7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA.** (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

**7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

**7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.** (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Carolina Rípodas, Méliisse Castaingts, Flavio Blanco and María Eugenia Zanetti. The NF-Y family of transcription factors of *Phaseolus vulgaris*: annotation, phylogenetic and expression analysis. En preparación para ser enviado en marzo de 2014 a Plos One.

**7.5. COMUNICACIONES.** (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

**7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN.** (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

**8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS.** (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

**8.1. DOCENCIA**

**8.2. DIVULGACIÓN**

**8.3. OTROS**

**9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS.** (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Plant Biology Lectures, Buenos Aires, 28 al 30 de octubre de 2013

XV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología " A 60 años de la descripción de la estructura del ADN", Chascomus (Buenos Aires), 4 al 6 de diciembre de 2013

Presentación de un poster: "Regulatory small RNAs involved in the symbiosis between *Phaseolus vulgaris* and *Rhizobium etli*." Méliisse Castaingts, Carolina Rípodas, O. Mario Aguilar, Flavio Blanco y María Eugenia Zanetti.

Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, 19 y 20 de septiembre de 2013. "Identificación y caracterización de pequeños RNAs regulatorios en la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y su par simbióticos

Rhizobium etli." Mélisse Castaingts, Carolina Rípodas, O. Mario Aguilar, Flavio Blanco y María Eugenia Zanetti.

**10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

**11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO**

**12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO**

**13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES** (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

**14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA** (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Identificación y caracterización de pequeños RNAs regulatorios en la interacción simbiótica entre Phaseolus vulgaris y su par simbióticos Rhizobium etli.

Respeto a las bibliotecas de pequeños RNAs (sRNAs) generadas, una vez obtenidos los datos de secuenciación se realizará el análisis bioinformático de los datos generados. Para ello se realizará una secuencia de pasos que incluye: 1) remoción de las secuencias adaptadoras y la asignación de cada secuencia a cada biblioteca en base al índice de cada adaptador 2) generación de una base de datos con secuencias únicas (no redundantes) para cada biblioteca indicando el número de veces que dicha secuencia está representada en la biblioteca 3) remover las secuencias de baja complejidad y los productos de ligación de adaptadores 4) mapeo de las secuencias únicas en el genoma de P. vulgaris y 5) anotación y cuantificación de las secuencias en cada biblioteca. Esto nos permitirán identificar sRNAs que se acumulan diferencialmente en las raíces de P. vulgaris en respuesta a la inoculación con cepas de alta y baja eficiencia. La acumulación diferencial de los sRNAs, y en particular de los miRNAs identificados será validada mediante la técnica RT-qPCR.

Además, la función de los miRNAs candidatos identificados por secuenciación masiva será caracterizada por genética reversa mediante la producción de plantas compuestas cuyas raíces sobreexpresan los precursores de dichos miRNAs. El análisis fenotípico (número y tamaño de los nódulos, eventos de infección, etc) y de expresión de estas raíces transgénicas en condición de inoculación nos indicará la función de los candidatos identificados. Teniendo en cuenta que los sRNAs actúan como reguladores de la expresión génica al nivel post transcripcional, realizaremos la búsqueda de los RNAs mensajeros blancos de los sRNAs validados, y analizaremos su expresión en las distintas condiciones expuestas en este plan de trabajo.

---

### Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

---

**Nota:** El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....  
Firma del Director

.....  
Firma del Becario