

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO

PERIODO 1er año

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)

Biotecnología y Biología molecular

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2013

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2014

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01-04-2015

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: UNLP - IBBM

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento: Biología

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 115 y 49 *N°:*

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 2214229777

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Zanetti María Eugenia

Dirección Particular: Calle: 115 y 49 *N°:*

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *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 dediqué a generar el material biológica y llevar adelante la construcción de bibliotecas de pequeños RNAs (sRNAs) de raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con cepas de *Rhizobium 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, se purificó el RNA de bajo peso molecular y se generaron bibliotecas de small RNAs, las cuales se secuenciaron utilizando la tecnología Illumina. Se utilizaron dos réplicas biológicas 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 el segundo año de beca, iniciamos el análisis bioinformático de las lecturas obtenidas por secuenciación masiva. Usando el programa de herramientas para análisis de sRNAs (UEA Workbench toolkit, Stocks et al., 2012), se descartaron las secuencias correspondientes a los adaptadores libres y se aplicaron filtros por tamaño y calidad. Luego, se descartaron las secuencias que corresponden a RNA de transferencia (RNAt) y RNA ribosomales (RNAr), y las secuencias que no mapearon contra el genoma de referencia de *P. vulgaris* (Schmutz et al., 2014). El análisis continuó con la categorización de estos sRNAs usando herramientas del UEA Workbench toolkit que permiten identificar microRNAs (miRNAs), nuevos o conocidos (comparando con la base de datos de miRBase) o tasiRNAs (trans-acting small interference RNAs). Finalmente, la herramienta SiLoCo permitió comparar los perfiles de expresión de los loci de sRNAs entre dos muestras. Este análisis se aplicó para cada réplica biológica comparando la cepa más eficiente contra la menos eficiente, y, contra la condición control.

Este año hemos continuado el análisis funcional de varios miRNAs en la interacción *P. vulgaris* x *R. etli*, para los cuales estudios de expresión previos indican que podrían cumplir algún rol importante durante la asociación simbiótica. Entre ellos se encuentran varias isoformas del miR169 y el miR390. Ensayos de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) nos permitieron analizar la expresión de dicho precursor en distintos órganos y tejidos de *P. vulgaris*, revelando que algunas de las isoformas del miR169 se expresan específicamente en nódulos formados por la cepa más eficiente. Para analizar la función de estos miRNAs utilizamos una estrategia que involucra la obtención de plantas que acumulan altos niveles (sobreexpresión) de dichos miRNAs y el análisis fenotípico asociado a la nodulación (cinéticas de nodulación). 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 fueron recombinados en el vector pK7WGD2,1 y utilizados para la transformación de raíces de poroto mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Además hemos realizado estudios del fenotipo de raíz de estas plantas (medición del largo de raíces principales y secundarias), las cuales sobreexpresan los precursores de dichos miRNAs para determinar el rol eventual de los mismos. Para los experimentos de análisis funcional, los niveles de expresión de los precursores de miRNAs fueron validados por RT-qPCR.

Por otra parte, hemos avanzado el análisis de las bibliotecas de sRNAs determinando miRNAs con expresión diferencial en cada condición y nuevos tasiRNAs específicos que surjan de la interacción con rizobios. Además hemos realizado dos réplicas biológicas adicionales de plantas cuyo raíces fueron colectadas a 24h después de la inoculación. Con estas muestras hemos generado dos bibliotecas de sRNAs suplementarias para incrementar la validez estadística del análisis de los datos.

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.)

Annotation, Phylogeny and Expression Analysis of the Nuclear Factor Y Gene Families in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Carolina Rípodas, Mélisse Castaingts, Joaquín Clúa, Flavio Antonio Blanco, María Eugenia Zanetti. *Frontiers in Plant Science*.

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)

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)

Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, 1 de octubre de 2015. "sRNAs regulatorios en la simbiosis entre poroto y rizobios." Mélisse Castaingts, María Eugenia Zanetti. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT-La Plata, CONICET, 1900-La Plata, Argentina.

Plant Biology Lectures, Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir, 27 a 29 de octubre de 2014.

XV Congreso Latinoamericano, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal en Mar del Plata, del 21 al 24 de septiembre de 2014. Small RNA involved in the preferential symbiotic association between *Phaseolus vulgaris* and *Rhizobium etli*. CASTAINGTS Mélisse, DALLA VIA Virginia, AGUILAR O. Mario, BLANCO A. Flavio, ZANETTI María Eugenia. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT-La Plata, CONICET, 1900-La Plata, Argentina.

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*." Mélisse 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 simbiótico *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)

Curso Fundamentos epistemológicos e históricos de la enseñanza de las ciencias, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. 45 horas totales, aprobación en evaluación.

Responsable: Diego Petrucci, diegope@gmail.com

Curso Bioinformática, Genómica Comparativa y Evolución Molecular, Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dictado en Mar del Plata en febrero de 2015. 80 horas totales (48 h T, 32 h T-P), aprobado con 6- 5UVAC.

Responsable: A. Ten Have, tenhave.arjen@gmail.com

Curso Bases Moleculares de la Interacción Planta Ambiente: Nuevos Paradigmas, Universidad Nacional de La Pampa, Université Paris Diderot Paris 7, dictado en Mar del Plata en septiembre de 2014. 30 horas totales (20 h T, 10 h T-P), aprobado con 9 -1UVAC.

Responsables: M. L. Molas mlmolas@hotmail.com

Curso Transducción de Señales en Plantas, Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, marzo de 2014. 80 horas totales (36 h T, 32 h T-P, 12 h P), aprobado con 8, 4UVAC.

Responsables: A. M. Laxal, C. García-Mata amlaxalt@mdp.edu.ar

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

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

14. TÍTULO 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 simbiótico *Rhizobium etli*.

Respecto a las bibliotecas de sRNAs, el análisis bioinformático de los datos generados de las 4 replicas biológicas 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 después de su análisis estadístico, será validada mediante la técnica RT-qPCR.

En paralelo, seguiremos con la caracterización de la función de los miRNAs candidatos identificados por secuenciación masiva mediante genética reversa. Estudiaremos en detalle el análisis fenotípico (número y tamaño de los nódulos, eventos de infección, etc). Además de validar la expresión de los precursores de miRNAs estudiados, mediremos la acumulación de los miRNAs maduros mediante la técnica de stem-loop RT-PCR (Varkonyi-Gasic et al., 2007). 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 raíces que sobreexpresan los precursores de miRNAs. Por ejemplo, el miR169 cuyo análisis esta en curso, tiene como target putativo NF-YA1. Este factor de transcripción tiene un papel determinante en la nodulación (el RNAi de su transcripto impide la formación de nódulos en respuesta al rizobio), y que sería implicado en la preferencia de las cepas simbióticas de *P. vulgaris* (ensayos de sobreexpresión en curso de validación).

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