

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA CONSERVACIÓN Y GESTIÓN SOSTENIBLE DE RECURSOS VEGETALES

PROPUESTAS DE TRABAJO FIN DE MÁSTER 2018-2019

1. TÍTULO: Desarrollo de nuevas herramientas genéticas en el género *Codium* a partir de datos genómicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: Screening de secuencias repetidas en datos genómicos en la especie *Codium fragile*. Screening de secuencias cloroplásticas en la especie *Codium fragile*. Desarrollo de marcadores genéticos para análisis poblacionales.

TUTORES: Yaisel Juan Borrell Pichs y Gonzalo Machado-Schiaffino

2. TÍTULO: Regulación de la metilación del DNA mediante proteínas de fusión Cas9-DEMETER (*Arabidopsis thaliana*)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La metilación del DNA genómico es un mecanismo epigenético que juega un papel importante en los procesos de diferenciación y desarrollo. Hasta ahora, la metilación del DNA solo se podía regular de forma ectópica a nivel global mediante tratamientos farmacológicos o regulación genética de metilasas. Sin embargo, el reciente desarrollo de las técnicas de edición génica CRISPR-Cas9 combinado con enzimas que regulan la metilación del DNA ofrece una oportunidad única para modular los niveles de 5-metilcitosina en regiones específicas del DNA genómico. En este proyecto fusionaremos la proteína Cas9 con la demetilasa de plantas DEMETER y utilizaremos la proteína de fusión resultante junto con librerías CRISPR para tratar de modular la metilación en regiones específicas del DNA.

TUTOR: Ramón Tejedor (HUCA)

COTUTOR: Mario Fernández Fraga

3. TÍTULO: Estrigolactonas y ramificación en *Pinus pinaster*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La madera y otros subproductos forestales son un importante objeto de estudio debido, entre otros, a su elevado interés comercial, siendo *Pinus pinaster* una de las especies más importantes en la industria del aserrado. El objetivo de este trabajo es la identificación y caracterización de genes implicados en la biosíntesis y/o señalización de estrigolactonas como posibles candidatos a jugar un papel importante en el proceso de ramificación de esta especie.

TUTORES: José Manuel Álvarez Díaz y Ricardo Javier Ordás Fernández

4. TÍTULO: Identificación de transcritos novedales de la especie *Pinus pinaster* a partir de datos de secuenciación masiva ya publicados

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La base de datos SustainPineDB contiene el transcriptoma de la especie *Pinus pinaster*. Aunque en esta base de datos se han identificado más de 20000 secuencias completas, el resto, que es la gran mayoría, se corresponde con secuencias parciales o incompletas. Partiendo de la hipótesis de que muchas de las secuencias parciales son de un mismo transcripto que inicialmente no se

podieron unir, se plantea el objetivo de usar los datos disponibles de secuenciación de ARN con pares de lecturas por fragmento para identificar secuencias parciales que se puedan unir. La validación de los resultados se hará de dos formas. Por un lado, de manera computacional, mediante alineamientos se buscará transcritos de otras especies que soporten la unión propuesta. En caso de que esta primera validación sea positiva se intentará detectar mediante RT-PCR la existencia del transcripto.

TUTORES: Juan Luis Mateo Cerdán y José Manuel Álvarez Díaz

5. TÍTULO: “*Arthrospira maxima*: Optimización del cultivo pre-industrial “outdoor” para la obtención de ficocianina”

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: El objetivo principal será estudiar cómo las condiciones de cultivo de la microalga *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* repercuten en los procesos posteriores de recuperación y purificación de la ficobiliproteína de interés comercial ficocianina. Para ello, se establecerá un diseño experimental sobre los cultivos de *Arthrospira maxima* en base a modificaciones en la formulación del medio nutritivo y de sostén. Los ensayos serán realizados en fotobiorreactores abiertos tipo “raceway”, es decir, en condiciones ambientales “outdoor”. La biomasa adquirida durante la fase de cultivo será sujeta a diferentes condiciones de extracción de la fracción proteica y purificación para la obtención de ficocianina.

TUTORES: Pedro Sánchez Lazo y Víctor Casado Bañares (Neoalgae)

COTUTOR: Luis Valledor González

6. TÍTULO: Estrategias combinadas de fitorremediación y adición de nanopartículas en suelos contaminados con arsénico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: En las últimas décadas para reducir el efecto negativo de los contaminantes del suelo se ha apostado por el uso de tecnologías sostenibles con el medio ambiente. Sin embargo, para incrementar la eficiencia del proceso se está apostando por la combinación de alguna de estas tecnologías como es la fitorremediación en combinación con otras más innovadoras como la aplicación de nanopartículas metálicas. Estas nanopartículas se ha visto que, añadidas al suelo, muestran una gran actividad química con algunos de los contaminantes. Sin embargo, no se conoce apenas su efecto sobre las plantas por lo que el objetivo de este trabajo sería estudiar el comportamiento de diferentes tipos de plantas que crecen en suelos contaminados con arsénico procedentes de la antigua mina de la Soterraña y a los que se añadirán nanopartículas de hierro cerivalente. Se analizará el crecimiento de las plantas, la acumulación y disponibilidad del arsénico, y otros parámetros fisiológicos y bioquímicos que puedan verse implicados. Para desarrollar este trabajo las plantas se cultivarán en invernadero y se utilizarán técnicas bioquímicas así como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (ICP-MS).

TUTORES: Aida González Díaz y Jose Luis Rodríguez Gallego

7. TÍTULO: Determinación del potencial antioxidante de sub-productos de la industria agroalimentaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La industria de conservas vegetales y de elaboración de zumos y bebidas fermentadas genera cada año miles de toneladas de sub-productos con un gran impacto ambiental. Sin embargo, dicho material contiene compuestos de gran valor nutricional como, por ejemplo, polifenoles, carotenoides o

fibras dietéticas. En este trabajo se plantean las siguientes actividades: Extracción de compuestos bioactivos en sub-productos industriales: evaluación de métodos de extracción en términos de sencillez y precisión. Dichos extractos serán posteriormente analizados para determinar concentración de polifenoles y carotenoides totales y capacidad antioxidante a partir de la reacción con radicales libres (DPPH) y la capacidad de reducción de Fe⁺² (FRAP).

TUTORA: Anna Picinelli Lobo (SERIDA)

COTUTORA: M^a Jesús Cañal Villanueva

8. TÍTULO: Diseño de un sistema de desmetilación dirigida en *Arabidopsis thaliana* mediante CRISPR/Cas9: transgénesis y evaluación funcional de distintas subunidades catalíticas desmetilantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: Con el objeto de dirigir desmetilación hacia genes específicos en sistemas vegetales este trabajo plantea adaptar acoplar el centro activo de desmetilasas a la proteína Cas9 para poder dirigir su actividad mediante RNAs guía. Para ello en primer lugar el alumno deberá generar líneas celulares y plantas sobreexpresantes del sistema CRISPR/Cas9-DEMETER y CRISPR/Cas9-TET1. Estas construcciones, donadas por el Dr. Mario F. Fraga, están diseñadas para su expresión en modelos animales, por lo que el alumno deberá adaptarlas para su expresión en sistemas vegetales. Se emplearán plásmidos p-green que permitirán la transformación mediada por *Agrobacterium*. Posteriormente el alumno diseñará ARN guías enfocados a desmetilar de forma dirigida el gen TGG1 y otros genes de interés altamente metilados en *Arabidopsis thaliana* definidos en experimentos previos del grupo de investigación. La eficiencia del sistema se testará mediante el tratamiento con bisulfito sódico del ADN y posterior pirosecuenciación. Con el objeto de poder mejorar la eficiencia del sistema, el alumno evaluará la capacidad catalítica de distintos enzimas desmetilantes de plantas que serán obtenidas mediante análisis de secuencias en las bases de datos públicas.

TUTORES: Mónica Meijón Vidal y Luis Valledor González

9. TÍTULO: Fenoles de bajo peso molecular en castaño (*Castanea sativa* Miller)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: Identificar y cuantificar ciertos fenoles de bajo peso molecular (FBPM) en distintos órganos/tejidos de castaño para valorar esta caracterización como análisis diferencial de los distintos materiales procedentes del castaño en posibles aplicaciones industriales.

Los FBPM se analizarán mediante HPLC, para lo cual se pondrá a punto un método cromatográfico y espectrofotométrico para la identificación y cuantificación de estos compuestos.

TUTOR: José Francisco Fuente Maqueda (SERIDA)

COTUTORA: Candela Cuesta Moliner

10 TÍTULO: Biología y conservación de semillas de especies prioritarias de la flora cantábrica

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La flora cantábrica prioritaria incluye especies protegidas, amenazadas, endémicas e indicadoras de hábitats de interés. El conocimiento sobre su biología de semillas es básico para conservarlas en bancos de germoplasma, utilizarlas en acciones de restauración ecológica, y ponerlas a disposición de la industria de semillas nativas. El TFM profundizará en el conocimiento de la biología de semillas de una selección de especies prioritarias cantábricas mediante experimentos de laboratorio y recopilación bibliográfica de rasgos ecológicos de las plantas.

TUTOR: Eduardo Fernández Pascual
COTUTOR: Tomás Emilio Díaz González

11. TÍTULO: ¿Es el *splicing* alternativo un componente clave en el mantenimiento de la memoria a estrés térmico en *Pinus radiata*?

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: En el actual contexto de cambio climático, comprender a nivel molecular como recuerdan los árboles periodos de estrés térmico para mejorar su respuesta ante estreses posteriores es fundamental. Recientemente, se ha descrito en especies modelo que los mecanismos de *splicing* alternativo, son claves en el mantenimiento de la memoria. En esta línea de investigación el alumno realizará un análisis bioinformático del transcriptoma de *Pinus radiata* en respuesta a estrés térmico. Analizará el tamaño de los transcritos en plantas de *P. radiata* sometidas a estrés por altas temperaturas con el objetivo de identificar el papel del *splicing* alternativo en el mantenimiento de la memoria. Se validarán los resultados obtenidos mediante RT-PCR de genes candidatos con diferentes isoformas.

TUTORAS: María Jesús Cañal Villanueva y Laura Lamelas Penas

12. TÍTULO: Implicación de mecanismos epigenéticos sitio-específicos en la respuesta, adaptación, y memoria al estrés térmico por baja temperatura en *Chlamydomonas reinhardtii*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: El objetivo principal de este trabajo es definir dianas de regulación epigenética en respuesta al estrés térmico por baja temperatura empleando como punto de partida un trabajo del grupo de investigación en el cual se definieron los cambios proteómicos y metabolómicos en respuesta al frío. Estos candidatos permitirán hacer minería de los metilomas de citosina y adenina disponibles para definir aquellas regiones susceptibles de ser reguladas por metilación. La evolución de la metilación se revelará mediante técnicas de secuenciación de bisulfito (mC) e inmunoprecipitación de ADN metilado (mA). Además se empleará inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para testar modificaciones de histonas. La potencial memoria al estrés se evaluará sometiendo un cultivo a estrés y monitorizando diariamente cambios en varios parámetros fisiológicos (fotosintéticos, pigmentos, almidón, etc.) y posteriormente recuperando el cultivo en condiciones óptimas para su crecimiento. Una vez recuperado se volverá a someter a estrés y se evaluará su respuesta a una segunda exposición. En caso de ser positivo el resultado, se extenderá el periodo entre la recuperación y el sometimiento al segundo estrés para evaluar el número de generaciones necesario para que se pierda esta memoria. Durante todo el proceso se monitorizarán de manera sitio específica los genes determinados anteriormente.

TUTOR: Luis Valledor González

13. TÍTULO: Puesta a punto de un protocolo de transformación, en el gametofito del helecho apogámico *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: La transgénesis es una herramienta esencial para abordar estudios sobre función génica. Los helechos son el grupo más diverso de las plantas sin semilla, y su posición filogenética ofrece una oportunidad para investigar sobre aspectos fundamentales en la evolución vegetal, tales como la alternancia de generaciones, la aparición de la semilla o la organización de meristemas. En helechos, al contrario de musgos y hepáticas, el gametofito no es la generación dominante pero sí un organismo independiente del esporofito, adecuado para usarlo como diana de transgénesis. El objetivo del trabajo será la puesta a punto de un protocolo simple y reproducible de transformación del gametofito de la especie apogámica *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* mediada por *Agrobacterium*.

TUTORES: Elena M^a Fernández González y José Manuel Álvarez Díaz

14. TÍTULO: Evaluación de la Floración y la Calidad del Polen de Variedades de Manzana de Sidra de la “Denominación de Origen Protegida Sidra de Asturias”

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: Dada la autoincompatibilidad de la mayor parte de las variedades de manzanos, es necesario incluir en la misma plantación variedades compatibles con el objetivo de que se produzca una polinización cruzada y poder alcanzar un adecuado cuajado de fruta (Delaplane and Mayer, 2000). En este trabajo se evaluarán varios caracteres relacionados con la determinación de la compatibilidad polinizadora y el potencial polinizador de diversas variedades: fenología de las variedades, número de flores, número de granos de polen, viabilidad de polen y germinación de granos de polen. Se estudiarán un total de 40 variedades y se evaluará cuál de estas variedades presenta un buen potencial como polinizador, agrupándolas por épocas de floración de cara a poder emparejar variedades en una misma plantación. El trabajo experimental se llevará a cabo en los meses de abril y mayo.

TUTOR: Enrique Dapena de la Fuente (SERIDA).

COTUTORA: M^a Jesús Cañal Villanueva

15. TÍTULO: Análisis comparativo de los resultados obtenidos en la determinación del potencial ecológico en embalses de la cuenca cantábrica mediante el empleo de la métrica “biovolumen fitoplanctónico” calculada vs bibliográfica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍAS: El biovolumen fitoplanctónico es una de las cuatro métricas utilizadas en la determinación del Índice de Potencial Ecológico de embalses (IPE), cuyo Ratio de Calidad Ecológica RCE hace media con el RCE de clorofila. Dada la importancia de la métrica en el valor final del IPE, las diferencias observadas en cuanto a la variabilidad del biovolumen para la misma especie en muestras diferentes y considerando que el protocolo oficial del Ministerio para la Transición Ecológica ([MFIT-2013](#)) plantea como mejor opción la utilización de datos bibliográficos procedentes de TAXAGUA, se pretende conocer el grado de desviación de los resultados a partir de la determinación real del biovolumen tras la medición directa en varias muestras obtenidas en embalses de la cuenca Cantábrica.

TUTORES: Javier Granero Castro y Beatriz Villazán Peñalosa (TAXUS)

COTUTORA: M^a Jesús Cañal Villanueva