

Trabajos Fin de Máster ofertados por el IBMCP 2023

Índice

Dpto. de Biotecnología y Mejora Vegetal de Especies Cultivadas	Desarrollo de estrategias de RNAi de última generación basadas en pequeños RNAs artificiales. Alberto Carbonell (acarbonell@ibmcp.upv.es)	pág 1	
	Cultivating Color and Health: Metabolic Engineering of Valuable Apocarotenoids in Tomato Callus and Fruit Antonio Granell Richart (agranell@ibmcp.upv.es; mlobgom@ibmcp.upv.es)	pág 2	
	Mapeo de alta resolución de un gen implicado en la morfología de fruto de melón proveniente de un melón silvestre Antonio Monforte (amonforte@ibmcp.upv.es)	pág 3	
	Mutagénesis insercional en tomate. Vicente Moreno y Alejandro Atarés (vmoreno@ibmcp.upv.es; aatares@ibmcp.upv.es)	pág 4	
	Unraveling mechanisms for enhanced recombinant protein production in CRISPR/Cas-edited tobacco biofactories Diego Orzáez and Marta Vázquez (dorzaez@ibmcp.upv.es; marvazvi@ibmcp.upv.es)	pág 5	
	Aprendiendo cómo los tomates producen sus carotenoides para obtener cultivos mejorados nutricionalmente. Manuel Rodríguez-Concepción (manuelrc@ibmcp.upv.es)	pág 6	
Dpto. de Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas	Bases genéticas de la producción de biomasa en condiciones de cambio climático. Javier Agustí (jagusti@ibmcp.upv.es)	pág 7	
	Comer en tiempos revueltos: Identificación de factores en el control del final de la floración. Vicente Balanzá (vbalanza@ibmcp.upv.es)	pág 8	
	Estudio de los elementos reguladores en <i>cis</i> responsables de modular la traducción en respuesta a etileno. Javier Brumós (jbrumos@ibmcp.upv.es)	pág 9	
	Función de las proteínas con dominios VQ en las respuestas al óxido nítrico (NO) y a la transición hipoxia-normoxia. Mari Cruz Castillo y José León (jleon@ibmcp.upv.es)	pág 10	
	Evolution of temperature sensing by phytochromes in plants. Bruno Catarino y Miguel A. Blázquez (bcatari@ibmcp.upv.es)	pág 11	
	Impacto de la cromatina en procesos de regeneración in vitro en plantas. Javier Gallego Bartolomé (jagalbar@ibmcp.upv.es)	pág 12	
	Caracterización de plantas de tomate con polen termotolerante. Estudio de su respuesta a condiciones de estrés por calor Concha Gómez Mena (cgomez@ibmcp.upv.es)	pág 13	
	Estudio de la función de las proteínas DELLA en el control del tamaño de las semillas. Diseñando semillas más grandes. María Dolores Gómez, Miguel A. Pérez-Amador y Pablo Tornero (mdgomez@ibmcp.upv.es, mpereza@ibmcp.upv.es)	pág 14	
	When growing longer is not an option: comparison between plant model systems to understand divergent strategies to vegetation shade. Jaume Martínez and Marta Díaz (jaume.martinez@ibmcp.upv.es)	pág 15	
	Regulación hormonal de la función del meristemo apical de Arabidopsis thaliana Paz Merelo (pmerelo@ibmcp.upv.es)	pág 16	
	Desvelando la función de enzimas aldo-ceto reductasas vegetales mediante el modelo Marchantia polymorpha. Anselm Morell y Miguel A. Blázquez (anmog15@ibmcp.upv.es)	pág 17	
	Caracterización molecular de las vías de incorporación de señales lumínicas al reloj circadiano en plantas. María A. Nohales (manozaf@ibmcp.upv.es)	pág 18	
	Estudio de la conservación evolutiva de la señalización sistémica en respuesta a las heridas en plantas. Maite Sanmartín y Sonia Boscá (maite.sanmartin@ibmcp.upv.es; sboscasj@ibmcp.upv.es)	pág 19	
	Análisis de la actividad de la población apical de células madre en condiciones de estrés salino Antonio Serrano Mislata (antserra@ibmcp.upv.es)	pág 20	
	Desarrollo de fármacos contra la sequía utilizando la ruta del ABA y agonistas de sus receptores Pedro Rodríguez (prodriguez@ibmcp.upv.es)	pág 21	
	Dpto. de Biología del Estrés en Plantas	Nuevos mecanismos basados en miRNAs que regulan KAT1, el principal canal de K ⁺ en las células oclusivas. Nuria Andrés-Colás y Lynne Yenush (nuanco@btc.upv.es)	pág 22
		La modificación N6-metiladenosina (m6A) del RNA como mecanismo regulador en la biología de los virus RNA de plantas. Frederic Aparicio y Vicente Pallas (vpallas@ibmcp.upv.es)	pág 23
		Nuevas estrategias antivirales y de regulación génica basadas en RNAs circulares y catalíticos. Marcos de la Peña Rivero (rivero@ibmcp.upv.es)	pág 24
		Moduladores de la traducción en respuesta a estrés. Alejandro Ferrando y Borja Belda-Palazón (aferrando@ibmcp.upv.es; bbelda@ibmcp.upv.es)	pág 25
		Regulación del eje SnRK1-TOR por acción de MAPKs en respuesta a ABA. Alejandro Ferrando y Borja Belda-Palazón (aferrando@ibmcp.upv.es; bbelda@ibmcp.upv.es)	pág 26
		Estudio de la influencia de los flavonoides en la calidad de las semillas. Jose Gadea y Regina Niñoles (jgadeav@ibmcp.upv.es; renioro@upvnet.upv.es)	pág 27
Análisis de supresores virales del silenciamiento por RNA. Carmen Hernández (cahernan@ibmcp.upv.es)		pág 28	
Estudio de genes y metabolitos implicados en la resistencia de las plantas de tomate frente a patógenos. M ^a Pilar López-Gresa y Purificación Lisón (mplopez@ceqa.upv.es; plison@ibmcp.upv.es)		pág 29	
Proximity labeling of protein complexes with TurboID. Jorge Lozano-Juste (lojujo@ibmcp.upv.es)		pág 30	

Trabajos Fin de Máster ofertados por el IBMCP 2023

Listado detallado

Departamento de Biotecnología y Mejora Vegetal de Especies Cultivadas

Investigador: Alberto Carbonell

Proyecto: Desarrollo de estrategias de RNAi de última generación basadas en pequeños RNAs artificiales.

El silenciamiento génico o RNA de interferencia (RNAi) mediado por pequeños RNAs artificiales (art-sRNAs) es una valiosa herramienta biotecnológica para regular la expresión génica y que facilita la obtención de plantas mejor adaptadas a los cambios medioambientales o más resistentes a patógenos. Consiste en diseñar art-sRNAs de 21 nucleótidos, altamente específicos y con secuencia complementaria a la del transcrito del gen diana, y expresarlos en plantas para inducir el corte de dichos transcritos y silenciar el gen correspondiente (ver Figura).

Nuestro laboratorio ha desarrollado una serie de herramientas bioinformáticas y moleculares que incluyen unos nuevos vectores de expresión de última generación que permiten el clonado ultrarápido de diversos art-sRNAs, como son los microRNAs artificiales (amiRNAs) o los tasiRNAs sintéticos (syn-tasiRNAs), y su sobreexpresión de manera transitoria o en plantas transgénicas. A pesar del éxito de estas herramientas, la necesidad de integrar las secuencias precursoras de los art-sRNAs en el genoma de la planta limita su uso comercial debido a la estricta legislación europea que regula los organismos modificados genéticamente.

En este proyecto vamos a desarrollar diferentes aproximaciones "GMO-free" para suministrar art-sRNAs a las plantas, como son i) la aplicación exógena (e.g. mediante spray) de precursores de art-sRNAs producidos eficientemente en bacterias, ii) la producción de art-sRNAs a partir de vectores virales sistémicos, y iii) la expresión de art-sRNAs a partir de genes endógenos de sRNAs previamente editados con sistemas CRISPR/Cas. La eficacia de las distintas estrategias se medirá por el grado de silenciamiento inducido tanto de genes endógenos de la planta como de diversos virus vegetales. Estamos convencidos de que el desarrollo de estas nuevas metodologías no transgénicas para suministrar art-sRNAs a las plantas facilitará la obtención de cultivos más productivos en el contexto actual de cambio climático.

Durante la ejecución de este proyecto el estudiante aprenderá múltiples técnicas de biología molecular, bioquímica y fenotipado de plantas, y es de esperar que el trabajo realizado pueda continuarse en el marco de una tesis doctoral.

Información de contacto: acarbonell@ibmcp.upv.es

<https://www.albertocarbonelllab.com/>

<https://ibmcp.upv.es/grupos-investigacion/biotecnologia-de-pequenos-rnas-de-planta/>

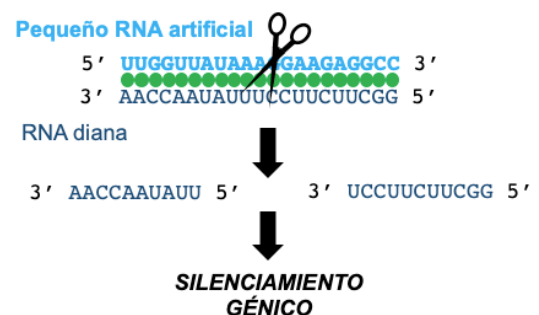


Figura. Silenciamiento génico mediado por art-sRNAs.

Investigador: Antonio Granell Richart

Proyecto: Cultivating Color and Health: Metabolic Engineering of Valuable Apocarotenoids in Tomato Callus and Fruit

Carotenoids and their cleavage products, known as apocarotenoids, are valuable compounds produced by plants and fungi but not by most animals. They possess numerous health-promoting properties and serve as a significant source of natural colorants. Crocins and bixin are the apocarotenoids responsible for the color of saffron and achiote, respectively. The price of saffron can exceed €10,000 per kilogram, and its yield is being adversely affected by climate change. For these reasons, there is a growing interest in producing saffron apocarotenoids in heterologous platforms.

In our laboratory, we have successfully generated transgenic tomatoes that accumulate crocins and other saffron apocarotenoids in their fruit. The primary objective of this MSc thesis is to comprehensively characterize how the metabolism of tomato is influenced by the production of saffron apocarotenoids. The student will prepare the constructions for the project using the Golden Braig strategy and perform *Agrobacterium*-mediated transformations to obtain tomato callus cultures that accumulate these compounds, subsequently regenerating transgenic tomato lines.

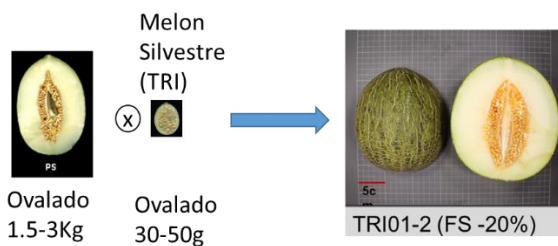
Additionally, the student will actively participate in ongoing projects related to the accumulation of crocin and bixin in tomato fruit to gain a holistic understanding of the entire process.

Información de contacto: agranell@ibmcp.upv.es, mlobgom@ibmcp.upv.es

Investigador Antonio Monforte

Proyecto: Mapeo de alta resolución de un gen implicado en la morfología de fruto de melón proveniente de un melón silvestre

En nuestro laboratorio realizamos cruzamientos entre melones silvestres y cultivados para identificar genes implicados en la domesticación y “descubrir” genes ocultos en el germoplasma silvestre que pueden ser interesantes para la mejora y comprender mejor diversos aspectos de la biología de la especie. Una de las líneas que llevamos es el estudio de la evolución de la morfología del fruto. Los melones silvestres son pequeños (35-50 gramos) y ligeramente ovalados. Después de la domesticación se produjo la diversificación varietal, con lo que actualmente existen variedades con muy diversas formas (desde achatados hasta muy alargados) y tamaños (desde pocos centenares de gramos hasta más de 5 kg) de fruto. Toda esta variación proviene de los melones silvestres, cuyos genes se han diversificado por mejora intuitiva de los agricultores tradicionales, generando toda la diversidad actual. A partir de cruzamientos entre un melón silvestres y una variedad Piel de Sapo, hemos desarrollado líneas (Líneas de Introgresión o ILs) que contienen un único (y diferente cada una de ellas) fragmento cromosómico silvestre en el genoma de Piel de Sapo. Estas ILs muestran una gran variabilidad en formas y tamaño de fruto. En el presente proyecto nos centramos en la IL TRI01-2 (contiene un fragmento silvestre en el cromosoma 1) que produce melones tipo Piel de Sapo redondos. Así, este fragmento cromosómico incluye genes implicados en la forma del fruto que podrían estar implicados en la diversificación del cultivo. El objetivo de este proyecto es generar un mapa de alta resolución de este fragmento cromosómico para localizar con precisión la posición del gen implicado en la morfología y buscar genes candidatos. Además se hará un estudio de desarrollo del fruto para determinar en que momento se fijan las diferencias en forma. En este proyecto el estudiante se formará en manejo de plantas en invernadero, cruces dirigidos, marcadores moleculares, mapas genéticos, análisis de QTLs, aplicaciones genómicas en mejora.



Información de contacto: amonforte@ibmcp.upv.es

Investigador: Vicente Moreno y Alejandro Atarés

Proyecto: Mutagénesis insercional en tomate.

En este trabajo utilizaremos la mutagénesis insercional como herramienta para la identificación de genes clave implicados en el desarrollo del fruto de tomate, así como alguno de los genes que determinan la tolerancia al estrés salino e hídrico, tanto en tomate (moderadamente tolerante a la sal) como en diversas especies silvestres relacionadas (accesiones muy tolerantes al estrés hídrico y salino). Con esta estrategia, los genes quedan etiquetados por el T-DNA, lo que facilita considerablemente el proceso de clonación. En nuestro grupo disponemos de una amplia colección de líneas de inserción y de mutantes previamente identificados con los que poder abordar el trabajo planteado.

Información de contacto: vmoreno@ibmcp.upv.es; aatares@ibmcp.upv.es

Investigador: Diego Orzáez and Marta Vázquez

Proyecto: *Unraveling mechanisms for enhanced recombinant protein production in CRISPR/Cas-edited tobacco biofactories*

The Plant Genomics and Biotechnology lab applies synthetic biology, genomics, and biotechnology to engineer plants for the synthesis of high added-value products like recombinant proteins or metabolites. We work towards this objective from three different fronts: (i) gene editing to fine-tune the plant chassis to the added-value product synthesis, (ii) developing diverse strategies for regulating gene expression to control gene activation, and (iii) eventually, by transient and stable gene transformation, we obtain added-value products in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* plants. Our staple tool is an in-house-developed cloning system, GoldenBraid, that brings the modularization and standardization principles of synthetic biology.

Within the frame of the EU Horizon 2020 Newcotiana project, we have developed using CRISPR/Cas, new tobacco varieties unable to flower under standard agronomic conditions and with extended juvenility. These traits that result in increased biomass and biosafety, make them ideal candidates for biofactories. A patent of these lines is currently under consideration. Moreover, transient expression assays showed an improved recombinant protein production capacity in the juvenile lines and a transcriptomic analysis revealed low-levels of AGO4 in them. AGO4 is involved in the regulation of gene silencing mediated by epigenetic modifications of chromatin and in particular in DNA methylation. This observation led to the formulation of the hypothesis that the higher yields of recombinant protein in juvenile plants is due to a lower capacity for DNA methylation of the transgenes introduced transiently by agroinfiltration and therefore a lower capacity to repress their expression. It is known that transcriptional silencing based on DNA methylation is one of the main mechanisms by which plants defend themselves against infection by DNA viruses of the geminivirus family. This opened the possibility that the extended juvenility of these lines had effects on the yield of geminivirus-mediated recombinant production.

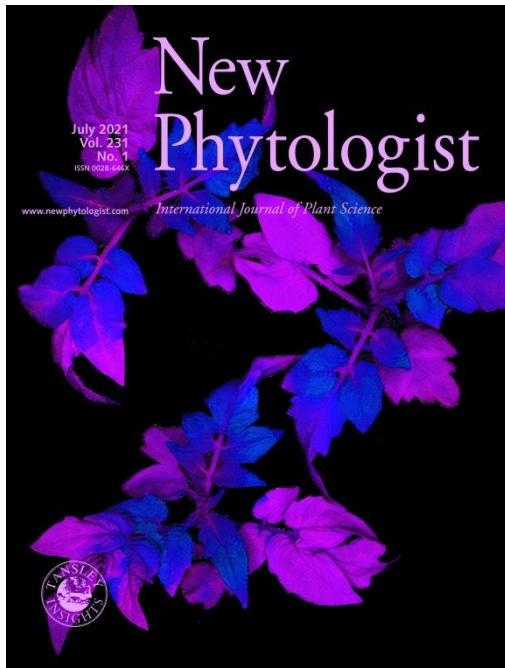
This master's thesis proposal aims to investigate the molecular mechanisms behind the increased production of recombinant proteins in CRISPR/Cas-edited tobacco juvenile plants. By exploring the potential impact of extended juvenility and reduced AGO4 levels on geminivirus-mediated recombinant protein production through transient expression assays, RT-qPCRs and methylation studies, this project will provide valuable insights into improving plant biofactories.

Contact information: dorzaez@ibmcp.upv.es; marvazvi@ibmcp.upv.es

Investigador: Manuel Rodríguez-Concepción

Proyecto: Aprendiendo cómo los tomates producen sus carotenoides para obtener cultivos mejorados nutricionalmente.

Las plantas usan carotenoides como fotoprotectores en hojas y como pigmentos en flores y frutos. Aunque los animales no producen carotenoides, necesitan ingerirlos para producir



pigmentos visuales y vitamina A. Una dieta rica en carotenoides aporta también beneficios para la salud de la piel, el sistema inmune, la actividad cardiovascular, y la capacidad cognitiva. Una forma de mejorar nuestra ingesta de carotenoides es mediante la biofortificación de cultivos, es decir, aumentando el contenido de estos compuestos saludables en frutas y verduras. El tomate (*Solanum lycopersicum*) acumula carotenoides durante la maduración del fruto, lo que le aporta el típico color rojo. La producción de carotenoides en tomate podría optimizarse si los precursores de estos compuestos se canalizasen más eficientemente hacia la síntesis de carotenoides. Por ello estamos estudiando como interaccionan las familias de enzimas que producen estos precursores (GGPPS) con los que los usan para hacer carotenoides (PSY). Hemos generado líneas CRISPR-Cas9 de tomate que carecen de algunos de estos enzimas individuales.

Los resultados ya publicados (ver imagen) indican que las interacciones físicas entre distintas isoformas de GGPPS y PSY son clave para la canalización. Para entender mejor que combinaciones de enzimas dirigen la ruta hacia carotenoides en distintas condiciones, hemos generado dobles mutantes. El TFM consistirá en la caracterización de estos dobles mutantes a nivel molecular (RT qPCR), metabólico (HPLC y GC MS) y fisiológico.

Información de contacto: manuelrc@ibmcp.upv.es

Departamento de Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas

Investigador: Javier Agustí

Proyecto: Bases genéticas de la producción de biomasa en condiciones de cambio climático.

La biomasa vegetal es una de las mayores fuentes de energía renovable a nivel mundial y su utilización de forma sostenible reduce drásticamente las emisiones globales de CO₂. Sin embargo, el efecto del cambio climático sobre los procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas hace que la producción de biomasa se vea seriamente reducida. Utilizando aproximaciones genómicas, bioinformáticas y moleculares, nuestro grupo ha identificado variantes genéticas naturales en genes reguladores de la producción de biomasa que han sido fijadas durante la evolución y que sólo se encuentran en los genomas de plantas que habitan en regiones secas y cálidas. La hipótesis de partida de este proyecto es que aquellas plantas que poseen éstas variantes genéticas son capaces de producir más biomasa en condiciones de altas temperatura y/o sequía, por lo que éstas variantes serían de gran valor biotecnológico. El estudiante que se incorpore a nuestro grupo testará esta hipótesis caracterizando funcionalmente las variantes genéticas naturales identificadas, con el objetivo de determinar su potencial para la producción de biomasa en altas temperaturas y/o sequía y, por tanto, para mejorar nuestra capacidad de producción de biomasa vegetal en condiciones de cambio climático.

Información de contacto: jagusti@ibmcp.upv.es

<https://jagusti.wixsite.com/agustilab>

<http://plasticity.ibmcp.csic.es/>

Investigadores: Vicente Balanzà

Proyecto: Comer en tiempos revueltos: Identificación de factores en el control del final de la floración.

Según Naciones Unidas, la población mundial ha estado aumentando de forma gradual hasta la actualidad y se espera que alcancemos los 9700 millones de personas en el 2050 (2100 millones más que en la actualidad). Hasta la fecha se ha asegurado la alimentación de esta población mediante el incremento de la producción agraria mundial, mejorando los rendimientos de nuestros cultivos, pero en gran medida también aumentando la superficie destinada a la agricultura y la ganadería. Lamentablemente, la superficie cultivable en el planeta es limitada, y las consecuencias del cambio climático (aumento de la temperatura, sequía, erosión, ...) están ya provocando la pérdida de miles de hectáreas cultivables. Ante este escenario, el desarrollo de plantas más productivas y mejor adaptadas a las nuevas condiciones climáticas son una prioridad para la comunidad científica.

La producción de flores/frutos/semillas de los cultivos utilizados depende en gran medida de la actividad de los meristemas inflorescentes que las plantas desarrollan durante la etapa reproductiva, y en consecuencia, del tiempo que dura esta actividad. Sorprendentemente, los factores que controlan la duración de la etapa reproductiva apenas se han estudiado. Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es la identificación y caracterización de los mecanismos moleculares que controlan este proceso teniendo como propósito final la mejora de plantas de interés agronómico: retrasar el final de la floración supone incrementar el número de flores/frutos/semillas producidos, incrementando el rendimiento de las explotaciones agrarias.

En plantas, el final de la etapa reproductiva está controlado principalmente por dos mecanismos. Uno de ellos ha sido recientemente descrito por nuestro grupo, identificando una ruta génica dependiente de la edad que controla la actividad del meristemo inflorescente al final de la floración: La ruta FRUITFULL-APETALA2 (FUL-AP2) (Balanzà et al. 2018). El otro mecanismo está controlado y depende del número de semillas producido por la planta. Aunque este mecanismo se conoce desde hace más de un siglo, las bases moleculares que lo gobiernan todavía son desconocidas. Se ha propuesto que el control del final de la floración ejercido por las semillas dependería, entre otros factores, a la existencia de una posible "hormona de la muerte". Esta hormona de la muerte sería una señal móvil generada en las semillas que afectaría al funcionamiento del meristemo inflorescente y que una vez alcanzados unos niveles determinados desencadenaría el final de la floración suprimiendo la actividad meristemática.

Una hipótesis que barajamos en el laboratorio es que la producción o la actividad de esta "hormona de la muerte" podría estar fuertemente influenciada por factores ambientales como la sequía, la luz o la temperatura, y que se prevé que cambiaran considerablemente en los próximos años. Actualmente hemos identificado diferentes candidatos que podrían estar funcionando como la descrita "hormona de la muerte" generada por las semillas, entre los que se encuentran pequeñas proteínas móviles y miRNAs. De este modo, el TFM que proponemos consiste en la caracterización fenotípica y molecular de mutantes para estos candidatos en diferentes condiciones de crecimiento, como en presencia o ausencia de semillas, en respuesta a diferentes rangos de temperatura o diferentes grados de sequía. Estos análisis se combinarán con el estudio de sus patrones de expresión mediante hibridación *in situ* y análisis de marcadores moleculares (tinciones GUS, microscopía confocal). Por último, se analizará como estos posibles candidatos interactúan o se integran a nivel de la ruta FUL-AP2, mediante la generación de combinaciones de mutantes y el análisis de líneas marcadoras.

Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S. *et al.* Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nat Commun* **9**, 565 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03067-5>

Información de contacto: vbalanza@ibmcp.upv.es

Investigador: Javier Brumós.

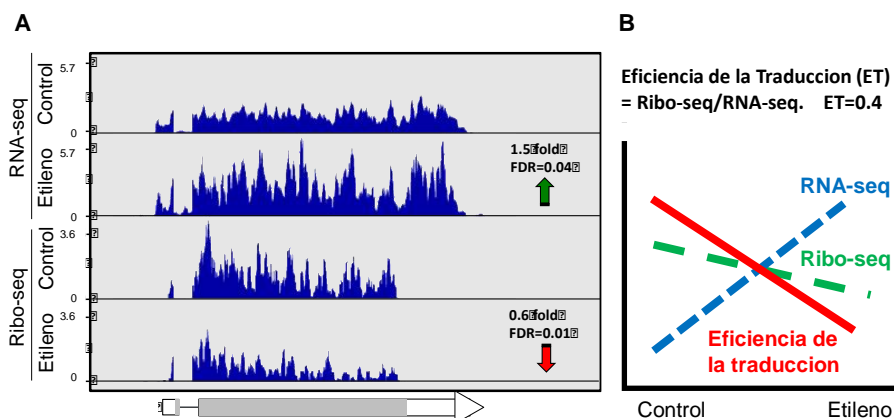
Proyecto: Estudio de los elementos reguladores en *cis* responsables de modular la traducción en respuesta a etileno.

El etileno es una hormona vegetal clave en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés, además promueve la maduración, senescencia y ablandamiento de los cultivos hortícolas y es uno de los principales determinantes de la calidad y vida útil de frutas y hortalizas. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de cómo el etileno regula la maduración de los frutos puede tener aplicaciones directas en el sector agroalimentario.

El etileno producido por el fruto durante la maduración tiene un claro impacto en la regulación de la expresión génica. Esta regulación ha sido estudiada principalmente a nivel transcripcional en las últimas décadas. Mientras otros niveles de regulación, como los cambios en la eficiencia de la traducción durante la maduración, apenas han sido explorados. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que un conjunto de RNA mensajeros están regulados a nivel traduccional durante la maduración del fruto. Para identificar esos transcritos regulados a nivel traduccional, usamos la tecnología Ribo-seq que permite analizar los niveles de traducción de cualquier RNA mensajero con una altísima resolución de hasta un simple codón.

Las regiones 3' no traducidas (3'UTR) de ciertos RNA mensajeros han sido identificadas como elementos reguladores en *cis* necesarios y suficientes para regular la traducción de estos transcritos en presencia de etileno. En este Trabajo de Fin de Máster, se estudiarán los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la traducción conferida por estos 3'UTRs en respuesta a etileno y, por tanto, durante la maduración del fruto. En primer lugar, se llevará a cabo un estudio filogenético para examinar las regiones conservadas presentes en los 3'UTRs y su evolución en varias familias del reino vegetal de interés agrícola. En segundo lugar, usando algoritmos de predicción, se modelarán las estructuras secundarias adoptadas por las secuencias de RNA de estos 3'UTR en busca de estructuras conservadas que puedan tener importancia biológica. Por último, las regiones más interesantes de estos 3'UTRs serán seleccionadas y testadas en planta para confirmar la conservación de su función en la regulación de la traducción en respuesta a etileno y durante la maduración en distintas especies vegetales.

Los resultados de este estudio nos permitirán identificar y optimizar el empleo de módulos reguladores de la traducción, los cuales son una herramienta muy prometedora en las áreas de la biotecnología vegetal y de la biología sintética con potenciales aplicaciones a sistemas agrícolas.



A) Resultados de secuenciación de RNA-seq y Ribo-seq en ausencia y presencia de etileno. Independientemente de la inducción de este gen a nivel transcripcional (1.5) por etileno, se observa una clara represión de su traducción (0.6) en respuesta a etileno. **B)** La eficiencia de la traducción de este transcrito baja al 40% en etileno comparada con la eficiencia en condiciones control.

Información de contacto: jbrumos@ibmcp.upv.es; www.brumos.org

Investigadores: Mari Cruz Castillo y José León

Proyecto: Función de las proteínas con dominios VQ en las respuestas al óxido nítrico (NO) y a la transición hipoxia-normoxia.

Las plantas y sus diferentes órganos experimentan cambios en los niveles de oxígeno a los que están expuestas debido a efectos ambientales pero también a procesos de desarrollo. En condiciones de bajos niveles de oxígeno (hipoxia) hay una sobreproducción de óxido nítrico (NO) debido a la utilización de nitrito en lugar de oxígeno como aceptor de electrones de la cadena mitocondrial. Cuando tras hipoxia la planta se re-oxigena y alcanza los niveles de oxígeno normales (normoxia) se desencadenan diversas respuestas muchas de las cuales están relacionadas con eventos oxidativos y con la función reguladora de factores de transcripción y de proteínas que modulan la función de estos factores, entre las que se encuentran algunas de las proteínas de la familia de proteínas con dominios VQ. Derivado del trabajo que venimos realizando en el proyecto en curso, hemos identificado que de los 34 genes de Arabidopsis (Jing and Lin, *Plant Physiol.* 2015) que codifican proteínas con motivos VQ, hay 10 que se regulan en la transición hipoxia-normoxia y 12 que se regulan por NO, siendo 8 de ellos regulados por ambos factores.

El Trabajo de Fin de Máster que planteamos está enfocado a la caracterización de la función de las 8 proteínas con motivo VQ que se regulan por los niveles de oxígeno y NO. Para ello, haremos uso de una estrategia de genética reversa basada en la caracterización de mutantes de inserción de T-DNA en los loci correspondientes. Generaremos combinaciones de dobles y triples mutantes en los casos en los que se considere necesario para evitar los efectos de la redundancia funcional. Los mutantes simples y múltiples se caracterizarán en términos de producción endógena y sensibilidad a NO y en tolerancia y respuesta a variaciones en los niveles de oxígeno. Los experimentos de hipoxia y reoxigenación se llevarán a cabo en un dispositivo en el que podemos controlar los niveles de oxígeno a los que estarán expuestas las plantas y para los que tenemos también optimizados una serie de genes marcadores tanto para la fase de hipoxia como para la posterior re-oxigenación.

Información de contacto: jleon@ibmcp.upv.es

Investigador: Bruno Catarino y Miguel A. Blázquez

Proyecto: Evolution of temperature sensing by phytochromes in plants.

Plants can integrate light and temperature cues into development to finely adjust to their environment. One of the key mechanisms by which these two signals are integrated has been solved in the angiosperm *Arabidopsis thaliana*, and it involves the dual function of phytochrome B (phyB) as a light receptor and a temperature sensor. However, it is still unclear whether this thermosensing activity is intrinsic to all phytochromes on Earth, or it is a recent innovation in evolution. If it is a recent innovation, it would mean that certain land plants (like the bryophyte *Marchantia polymorpha*) and algae use alternative mechanisms to achieve temperature and light integration.

To answer this question, we propose the following activities: (1) to compare the behaviour of *Arabidopsis* and *Marchantia phy* mutants grown under different conditions of light and temperature; (2) to substitute *Arabidopsis PhyB* by the *Marchantia Phy*, and see if it can perform the role of a thermosensor; (3) to substitute the *Marchantia Phy* by *Arabidopsis PhyB*, to see if the thermal properties of *AtPhyB* can be exported to other contexts.

The student would learn different methods of plant transformations (namely for *A. thaliana* and for *M. polymorpha*), gain experience with molecular cloning and other molecular techniques, perform biochemical assays, and confocal microscope imaging. Concomitantly, the student would be part of a vibrant group with people studying different aspects of plant signalling and development. Please see our webpage for more information about the lab.

Información de contacto: bcatari@ibmcp.upv.es

<http://plasticity.ibmcp.csic.es/>

Investigador: Javier Gallego Bartolomé

Proyecto: Impacto de la cromatina en procesos de regeneración *in vitro* en plantas.

Las células vegetales tienen la extraordinaria capacidad de reparar o reemplazar tejidos dañados basándose en la pluripotencia de sus células. Esto se logra mediante la reprogramación de las células somáticas a un estado indiferenciado, lo que resulta en la formación de masas celulares llamadas callos, a partir de las cuales pueden producirse nuevos órganos como raíces, brotes y embriones. Este proceso de formación de callos y regeneración de plantas tiene un gran valor económico, ya que se utiliza ampliamente como enfoque biotecnológico para propagar plantas ornamentales y cultivos.

Resultados preliminares del laboratorio sugieren que diversas familias de remodeladores de la cromatina tienen un fuerte impacto en los procesos de formación de callo y regeneración de tallos en la planta modelo *Arabidopsis*. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median estos efectos se conocen. Además, se desconoce si esta regulación es relevante en otras plantas evolutivamente alejadas de *Arabidopsis*, como tomate o *Marchantia*.

El objetivo de este TFM es generar mutantes inducibles de varios remodeladores de la cromatina en tomate y *Marchantia* para estudiar que efecto tienen en los procesos de formación de callo y regeneración de tallos. En primer lugar, se generarán los mutantes de los remodeladores de cromatina mediante CRISPR y, posteriormente, se evaluará su capacidad para formar callos y regenerar tallos. Según los resultados obtenidos, se llevarán a cabo una serie de experimentos para caracterizar a nivel molecular el posible impacto de los diferentes remodeladores en las distintas etapas del proceso de formación de callo y regeneración de tallo. Estos experimentos implican el uso de una amplia variedad de técnicas de biología molecular y cultivo *in vitro* que serán muy valiosas para la formación completa del estudiante. Entre ellas, podemos destacar la clonación de plásmidos, el uso de CRISPR para generar mutantes, el cultivo *in vitro* de tomate y *Marchantia*, el análisis de expresión mediante qRT-PCR y el análisis de la cromatina mediante digestiones con MNase.

Información de contacto: jagalbar@ibmcp.upv.es

Investigadores: Concha Gómez Mena

Proyecto: Caracterización de plantas de tomate con polen termotolerante. Estudio de su respuesta a condiciones de estrés por calor.

El desarrollo del polen en plantas es un proceso posmeiótico que da lugar a granos de polen maduros a partir de microesporas. El estrés por calor es uno de los factores limitantes más importantes en la producción de los cultivos.

El estrés por calor afecta en gran medida a las capas celulares que rodean a los microsporocitos y se han informado de anomalías en el desarrollo del tapetum causadas por el estrés por calor en muchas especies. El tapetum es muy rico en mitocondrias en comparación con los tejidos vegetativos. Bajo estrés por calor, el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en este tejido puede causar daño oxidativo y muerte celular y en último término esterilidad masculina. El mantenimiento del estado redox celular es un mecanismo eficiente para minimizar el daño por estrés de calor. Las peroxidasa contribuyen a la eliminación de especies reactivas de oxígeno ejerciendo una acción protectora celular.

En el proyecto del TFM se caracterizarán plantas de tomate que expresan una enzima ascorbato peroxidasa bajo un promotor inducible por calor. Se analizará la mejora de la viabilidad del polen en diferentes condiciones de estrés y el efecto en la producción de frutos y semillas respecto a plantas control. Los resultados generados por este proyecto tienen un enorme potencial al ser obtenidos en un cultivo y como estrategia para obtener plantas más resistente y mejor adaptas al cambio climático.

La participación en este proyecto implica la utilización de técnicas de Biología Molecular, microscopía y cultivo in vitro.

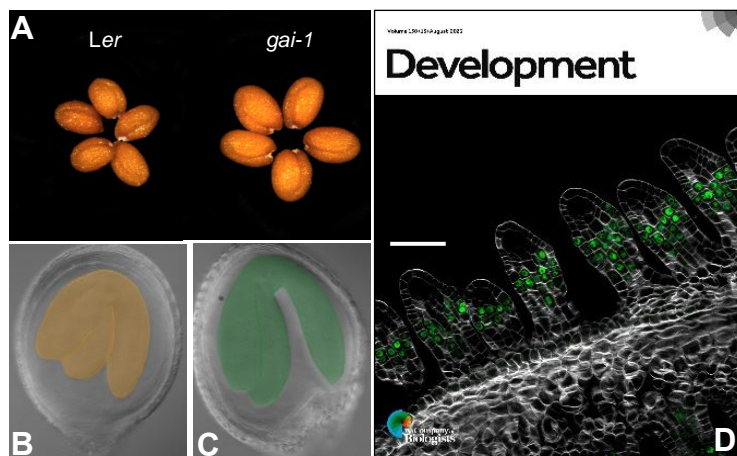
Información de contacto: cgomez@ibmcp.upv.es

Investigadores: María Dolores Gómez, Miguel A. Pérez-Amador, y Pablo Tornero.

Proyecto: Estudio de la función de las proteínas DELLA en el control del tamaño de las semillas.
Diseñando semillas más grandes.

Según la FAO, uno de los mayores desafíos a los que nos enfrentamos es conseguir un aumento en el rendimiento de los cultivos agrícolas con el fin de alcanzar los requerimientos alimentarios de una población en constante crecimiento. Además, este objetivo es aún más complejo si tenemos en cuenta las variaciones producidas por el cambio climático. Para lograrlo es fundamental entender las bases moleculares que determinan **la producción y calidad de las semillas** ya que éstas son la base principal de la nutrición humana, en particular, las semillas de cereales y legumbres.

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que regulan multitud de procesos fisiológicos tales como germinación, elongación del tallo, floración, y fructificación. Estudios genéticos y moleculares han permitido identificar los elementos que participan en la cascada de percepción y señalización de GAs, siendo los más relevantes las proteínas DELLA. Las DELLA son proteínas represoras de la señalización por GAs, regulando el crecimiento y la diferenciación promovida por éstas. A nivel molecular, estas proteínas son reguladores transcripcionales que actúan como activadores o represores mediante la interacción con otros factores transcripcionales. Nuestro grupo ha demostrado la implicación de las proteínas DELLA como **reguladoras positivas del tamaño de las semillas**, de forma que mutante dominante DELLA producen semillas de mayor tamaño. Ahora, nuestro objetivo es conocer cómo las DELLA regulan a nivel molecular el tamaño de las semillas en *Arabidopsis*, con el fin de utilizar este conocimiento para incrementar el rendimiento de especies de interés agronómico como *Brassica napus* (colza) y *Camelina sativa*.



A, semillas maduras de una planta WT (*Ler*) y de una planta DELLA dominante (*gai-1*). **B** y **C**, semillas aclaradas WT (**B**) y *gai-1* (**C**). **D**, expresión de ANT-GFP en primordios de óvulos.

El proyecto de Trabajo Fin de Máster se integrará en estas tareas experimentales: a) identificación y caracterización de los genes dianas de las proteínas DELLA durante el desarrollo de las semillas y b) edición genética mediante CRISPR de genes reguladores del tamaño de las semillas en *Brassica napus* y *Camelina sativa*.

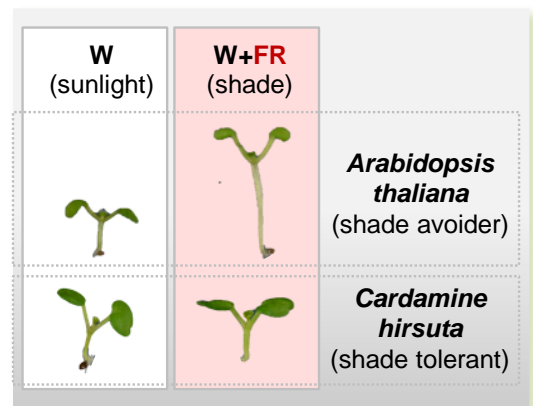
Información de contacto: mdgomez@ibmcp.upv.es, mpereza@ibmcp.upv.es
(<https://ibmcp.webs.upv.es/grupos-investigacion/senalizacion-hormonal-del-desarrollo-de-frutos-y-semillas/>)

Investigador: Jaume Martínez y Marta Díaz

Proyecto: *When growing longer is not an option: comparison between plant model systems to understand divergent strategies to vegetation shade.*

In many plant ecosystems, such as forests or agricultural communities, the **proximity of vegetation** can shade and limit the availability of light for photosynthesis. To deal with this situation, plants have adopted two alternative developmental strategies: avoiding or tolerating plant shade. **Shade-avoider species**, such as the model plant *Arabidopsis thaliana*, activate a set of acclimatization responses with a strong impact on plant development, such as promoting stem (or hypocotyl) elongation, promoting flowering or adjusting photosynthesis to grow in low light levels. In contrast, **shade-tolerant species** lack the characteristic stem elongation response to "escape" the unfavorable shade conditions, and are well adapted to growing in low light levels. This is the case for *Cardamine hirsuta*, a close relative of *A. thaliana* amenable to comparative molecular and genetic analyses.

Whereas the regulation of shade-avoidance is quite well understood, much less is known about the regulation of shade-tolerance at the molecular and genetic level. Using molecular and genetic approaches, we have shown that the lack of shade-induced hypocotyl elongation in *C. hirsuta* is caused, at least, by the enhancement of hypocotyl elongation suppression mechanisms by components already known to act in *A. thaliana* (e.g., example, phyA and HFR1). Since both adaptive strategies share genetic components, it is necessary to understand (1) how the different components act in the reference species of *A. thaliana*,



and next (2) what molecular, genetic and mechanistic aspects differ between the components of the two species that ultimately result in divergent responses (flight or tolerance) to plant shade. Within this frame of knowledge, the proposed TFM will aim to understand better how *A. thaliana* regulates shade avoidance and how the differences with *C. hirsuta* will help a plant to get a shade avoider or a shade tolerant strategy.

Información de contacto: jaume.martinez@ibmcp.upv.es

<https://ibmcp.upv.es/research-groups/light-and-shade-regulation-of-plant-development/>

Investigadores: Paz Merelo

Título: Regulación hormonal de la función del meristemo apical de *Arabidopsis thaliana*

El meristemo apical (o SAM, del inglés *shoot apical meristem*) es la fuente de células madre (o células meristemáticas) responsable de la formación de las partes aéreas de la planta, como hojas, tallos o flores. Desde un punto de vista agronómico, el correcto funcionamiento del SAM constituye una diana importante en programas de mejora de cultivos ya que determina aspectos fundamentales relacionados con la producción como la arquitectura de la planta o la tasa de formación de flores y, en consecuencia, de frutos y semillas. Por tanto, entender las bases moleculares de la regulación de la actividad del meristemo es crucial para modular la cosecha final.

Gran parte de los estudios sobre el control hormonal de la actividad del SAM se han centrado en las citoquininas (CKs) y auxinas. Sin embargo, se conoce poco sobre la función de otras hormonas y sólo unos cuantos trabajos han proporcionado nuevas claves sobre la interacción hormonal en el SAM. Los resultados preliminares obtenidos en el laboratorio señalan a la hormona ácido abscísico (ABA) como potencial nuevo regulador de la función del SAM.

Los objetivos generales de este Trabajo Fin de Máster consistirán en (1) estudiar si, además de las CKs y auxinas, el ABA podría regular también la función del SAM, y (2) ampliar nuestro conocimiento sobre las rutas genéticas que actúan aguas abajo de estas hormonas.

Para ello, el/la estudiante empleará técnicas de biología molecular, genética y microscopía confocal. Se generarán líneas reporteras fluorescentes relacionadas con rutas hormonales y con la regulación del SAM y se monitorizará el SAM de las líneas resultantes mediante "live imaging" (Figura). Además, el/la estudiante aprenderá a procesar imágenes 3D utilizando softwares que permiten cuantificar expresión génica y otros parámetros morfodinámicos del SAM. También, se llevarán a cabo análisis fenotípicos en mutantes con la actividad del SAM afectada, en mutantes relacionados con ABA o tras tratamientos hormonales y se evaluarán diferentes marcadores fluorescentes asociados al SAM en dichos fondos mutantes o tras estos tratamientos.

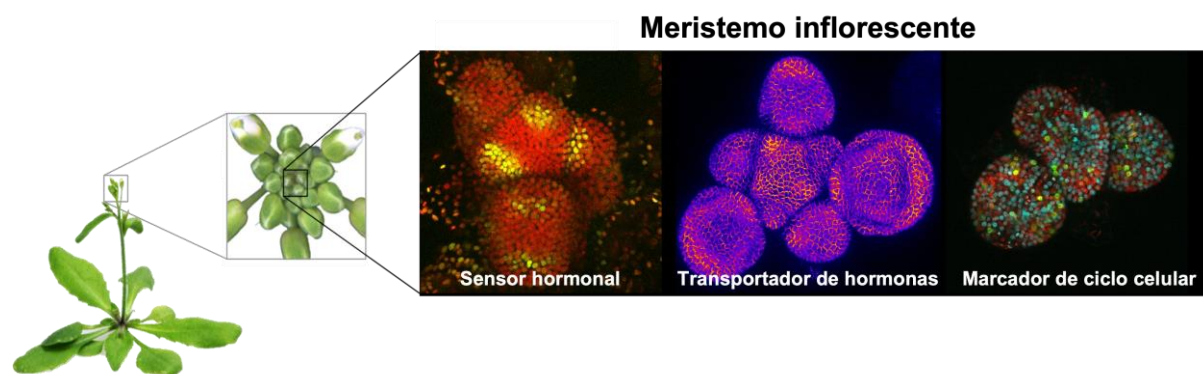


Figura. Imagen de microscopía confocal del meristemo apical (o meristemo inflorescente) de *Arabidopsis thaliana*. La señal fluorescente observada en cada panel corresponde a un sensor de hormonas (rojo y amarillo), un transportador de hormonas (magenta) y un triple marcador de distintas etapas del ciclo celular (rojo, azul y verde).

Información de contacto: pmerelo@ibmcp.upv.es ; twitter @PazMerelo

Investigador: Anselm Morell y Miguel A. Blázquez

Proyecto: Desvelando la función de enzimas aldo-ceto reductasas vegetales mediante el modelo *Marchantia polymorpha*.

Las aldo-ceto reductasas (AKRs) son un amplio grupo de enzimas presente en casi todos los organismos y cuyo centro catalítico presenta tal flexibilidad que permite acoger una enorme variedad de sustratos. Esta característica explica por qué las AKRs se implican en funciones fisiológicas tan diversas, desde la detoxificación de fármacos y otras sustancias tóxicas a la biosíntesis de hormonas sexuales en humanos, donde se han caracterizado con detalle debido a su interés farmacológico. No obstante, las funciones fisiológicas de estas enzimas en plantas todavía se desconocen; los pocos estudios hasta la fecha principalmente han descrito cómo la sobreexpresión de AKRs en diferentes especies vegetales confiere protección frente a estreses abióticos.

El objetivo de este TFM será caracterizar funcionalmente aquellas proteínas de la especie *Marchantia polymorpha* que presentan una alta homología de secuencia con las AKRs más relevantes en humanos y *Arabidopsis thaliana*. Para ello seguiremos dos líneas de trabajo paralelas:

- Generar mediante CRISPR/Cas9 líneas de *Marchantia polymorpha* knock-out (KO) para los diferentes genes de AKRs y analizar sus características fenotípicas.
- Producir en la bacteria *Escherichia coli* formas recombinantes de las diferentes AKRs de *Marchantia polymorpha* para su purificación y posterior análisis funcional mediante ensayos enzimáticos *in vitro*.

Información de contacto: anmog15@ibmcp.upv.es
<http://plasticity.ibmcp.csic.es/>

Investigador: Maria A. Nohales

Proyecto: Caracterización molecular de las vías de incorporación de señales lumínicas al reloj circadiano en plantas

La rotación de la tierra sobre su propio eje ha promovido la evolución del reloj circadiano como un mecanismo molecular que permite a los organismos alinear su fisiología y comportamiento con las condiciones ambientales que de manera predecible fluctúan a lo largo de las 24 horas del día (por ejemplo, luz y temperatura). Desde una perspectiva ecológica, se entiende que el comportamiento anticipatorio que estos osciladores endógenos confieren a los organismos proporciona una ventaja adaptativa, ya que permite una gestión más eficiente de los recursos disponibles. La influencia del reloj circadiano sobre el desarrollo de las plantas es ubicua y múltiples procesos, incluidos rasgos de interés agronómico como el crecimiento, las respuestas al estrés y las transiciones de desarrollo, están coordinados por él. Sin embargo, a pesar de la omnipresente influencia del reloj circadiano en el desarrollo y la fisiología de las plantas, todavía se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que subyacen a la función del oscilador central, así como a su conexión con las vías de entrada (i.e. las señales ambientales que ponen en hora al reloj interno) y salida (i.e. los procesos fisiológicos regulados por el reloj). En este contexto, la presente propuesta de Trabajo de Fin de Máster busca caracterizar los mecanismos moleculares por los cuales las señales de luz son percibidas e incorporadas por el reloj al amanecer, un aspecto clave en la sincronización de este mecanismo endógeno con el ambiente. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

- (i) Caracterizar el efecto de la pérdida de función de distintos factores de transcripción candidatos sobre la expresión de genes clave del reloj (como *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*) al amanecer y en respuesta a distintas condiciones de luz.
- (ii) Generar líneas transgénicas que expresen una versión catalíticamente inactiva de la proteína Cas9 dirigida a los promotores de *CCA1* y *LHY*. Estas líneas se emplearán para realizar inmunoprecipitaciones seguidas por espectrometría de masas específicas de locus con el fin de identificar reguladores de la expresión de *CCA1* y *LHY* al amanecer y en respuesta a distintas condiciones de luz.
- (iii) Investigar el mecanismo molecular de la función de GIGANTEA (GI), una proteína del reloj clave en la incorporación de señales lumínicas, como regulador transcripcional. Concretamente, se investigarán el/los factor/es que recluta/n a GI a la cromatina, concretamente en el contexto de las regiones promotoras de los genes *CCA1* y *LHY*. Para ello se combinarán abordajes moleculares (ensayos de doble híbrido, inmunoprecipitaciones, ChIP-qPCR, bioluminiscencia), genéticos y fenotípicos.

Información de contacto: manozaf@ibmcp.upv.es

Investigadores: Maite Sanmartín y Sonia Bosca

Proyecto: Estudio de la conservación evolutiva de la señalización sistémica en respuesta a las heridas en plantas.

Las plantas han desarrollado complejas rutas de señalización para responder a los ataques externos y asegurar su supervivencia. En plantas vasculares, estas respuestas se activan no solo de manera local, sino también en tejidos distales para poder defenderse frente a ataques posteriores. Para establecer estas respuestas sistémicas se ha demostrado que son esenciales los cambios en los potenciales de membrana y los incrementos en los niveles de calcio, que van acompañados de la producción de hormonas, y que se transmiten a los tejidos distales para activar las respuestas al daño. La generación de estas señales sistémicas depende de la actividad de los canales iónicos de tipo Receptor de Glutamato (GLR), que se expresan en el sistema vascular, y es por ello, que la transmisión de las señales sistémicas en respuesta a heridas ocurre principalmente a través de tejidos vasculares. Sin embargo, **se desconoce cómo responden las plantas no vasculares a las heridas y si activan respuestas sistémicas.**

Para abordar estas preguntas, estamos utilizando la hepática *Marchantia polymorpha*, una especie no vascular, modelo para estudios evolutivos (Fig. 1A). El trabajo que estamos llevando a cabo en el laboratorio ha permitido demostrar que, en *Marchantia*, se generan señales eléctricas e incrementos en los niveles de calcio en respuesta a las heridas, que se propagan desde los tejidos dañados a los tejidos no dañados (Fig. 1B). Además, hemos iniciado el análisis funcional de *MpGLR*, el único GLR codificado en el genoma de *Marchantia*, y resultados preliminares indican que la actividad de este canal es necesaria para modular los cambios en los niveles de calcio en respuesta a la heridas.

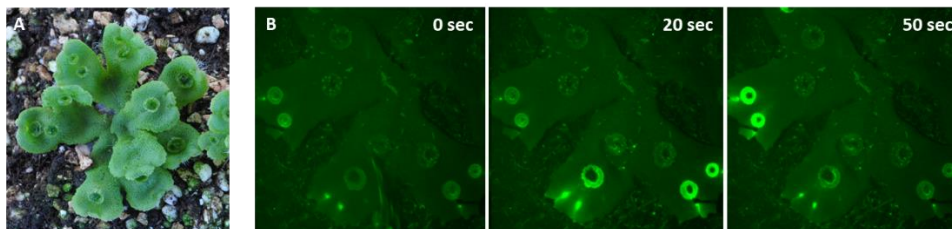


Figura 1. A) Talo de 30 días de *Marchantia polymorpha*. **B)** Transmisión de las ondas de calcio en los tejidos distales en respuesta a una herida en *Marchantia*. Los niveles de calcio se visualizan gracias a la activación del sensor GCaMP3 que portan plantas transgénicas generadas en el laboratorio. Panel izquierdo: planta herida; panel central: respuesta a los 20 segundos donde se observa la onda de calcio en los tejidos próximos a la herida; panel derecho: activación del sensor en respuesta al incremento de calcio en tejidos sistémicos.

El proyecto de Trabajo de Fin de Master tiene como objetivo **continuar la caracterización de la respuesta a las heridas en plantas no vasculares.** Para ello, se analizará la respuesta génica en respuesta a herida en tejidos dañados y sistémicos y se determinará su conservación evolutiva. Además, se definirán los factores que regulan la actividad de los canales GLR y se investigarán las interrelaciones con otros factores implicados en la activación de las rutas de señalización sistémica en respuesta a las heridas, lo que permitirá comprender de manera global la evolución de la señalización a las heridas y determinar si la adquisición del sistema vascular fue una innovación evolutiva esencial para articular una transmisión sistémica eficaz. Con este proyecto se pretende que el estudiante adquiera una sólida formación en biología molecular y celular, gracias a las distintas aproximaciones propuestas, y desarrolle un pensamiento científico crítico que le será de gran ayuda en su futuro profesional.

Información de contacto: maite.sanmartin@ibmcp.upv.es; sboscasj@ibmcp.upv.es

Investigador: Antonio Serrano Mislata

Proyecto: Análisis de la actividad de la población apical de células madre en condiciones de estrés salino

Todos los órganos de la parte aérea de las plantas derivan de una estructura en el ápice de la inflorescencia llamada el meristemo apical del tallo (SAM, de “*shoot apical meristem*” en inglés). El SAM proporciona un entorno apropiado para la actividad de la población apical de células madre. Como estas células se dividen, crecen e incorporan a nuevos órganos determina la formación de flores y frutos y, por tanto, la productividad de los cultivos.

La alta salinidad de los suelos es uno de los factores de estrés abiótico (ambiental) más devastadores para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las respuestas de las plantas frente a estrés han sido estudiadas generalmente en órganos de fácil acceso y, por ejemplo, se ha descrito que niveles altos de sal restringen el número de divisiones celulares en hojas y raíces. Sin embargo, el impacto del estrés salino en la actividad celular de órganos más complejos de manipular como el SAM no se ha analizado. Los avances recientes en técnicas de microscopía y análisis de imagen han abierto la posibilidad de llevar a cabo este tipo de estudios.

El objetivo principal de esta propuesta de TFM es optimizar ensayos de estrés salino en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y estudiar la actividad molecular y celular del SAM bajo estas condiciones. Para ello, se utilizará una combinación de técnicas transcriptómicas y de microscopía confocal de fluorescencia. Las respuestas defensivas de la población apical de células madre es un aspecto clave pero poco explorado de la interacción entre plantas y medio ambiente que, además, tiene un potencial interés biotecnológico para el desarrollo de cultivos más productivos en el contexto actual de cambio climático.

Información de contacto: antserra@ibmcp.upv.es
<http://plasticity.ibmcp.csic.es/>

Investigador: Pedro Rodríguez

Proyecto: Desarrollo de fármacos contra la sequía utilizando la ruta del ABA y agonistas de sus receptors

Las plantas pueden protegerse contra el estrés abiótico, en particular la sequía, mediante la acción de la hormona ácido abscísico (ABA), la cual coordina las respuestas adaptativas a la sequía para mejorar la supervivencia y la productividad de las plantas en situaciones de estrés hídrico. Los reservorios de agua dulce están comprometidos y dado que la agricultura representa alrededor del 70% del consumo total de agua, se requiere la optimización de la producción de cultivos para reducir el uso de agua. Se han implementado varias estrategias basadas en la activación de los receptores del ABA y el reforzamiento de la señalización del ABA. Entre ellos, la generación de compuestos agroquímicos que imitan la acción de ABA, así como enfoques genéticos destinados a activar constitutivamente la respuesta de la planta mediada por ABA, bien mediante la sobreexpresión de los receptores del ABA o la inactivación de los represores proteínas fosfatasa tipo-2C. Las estructuras proteicas de los receptores ABA de los cultivos podrían requerir modificaciones para mejorar el reconocimiento por parte de los ligandos químicos, que a su vez pueden optimizarse mediante la información estructural. Recientemente, aprovechando los enfoques basados en la estructura de los receptores y la química orgánica, hemos combinado enfoques químicos y genéticos para inducir de manera eficiente la señalización de ABA en la planta modelo *A. thaliana* (Lozano-Juste et al., 2023). Hemos generado un receptor de ABA personalizado y una nueva molécula agonista (iSB09), cuya combinación podría mejorar la eficiencia del uso del agua en la agricultura. La combinación de un receptor de ABA customizado y un compuesto químico diseñado racionalmente para encajar en su cavidad proporcionan varias ventajas con respecto al tiempo y la modulación de la respuesta ABA. Nuestro objetivo es transferir esta tecnología al trigo y al tomate, y el estudiante tomará parte en este proyecto junto al equipo de trabajo de nuestro laboratorio. El plan de investigación implicará la expresión del receptor PYL1_5m en trigo/tomate y la caracterización fisiológica y molecular de la respuesta del trigo al déficit hídrico después de la pulverización con iSB09. Mediremos los parámetros fotosintéticos y de transpiración, también la regulación de la expresión génica y la apertura estomática inducida por iSB09. El proyecto también incluye estudios de estructura para optimizar el ligando y análisis de la activación de la ruta del ABA.

Contact information: prodriguez@ibmcp.upv.es

Departamento de Biología del Estrés en Plantas

Investigadoras: Nuria Andrés-Colás y Lynne Yenush

Proyecto: Nuevos mecanismos basados en miRNAs que regulan KAT1, el principal canal de K⁺ en las células oclusivas.

La escasez de agua es un desafío importante para la agricultura mundial, ya que causa grandes pérdidas económicas y amenaza el suministro mundial de alimentos. En las plantas, el agua se pierde a través de los estomas, poros microscópicos en la epidermis de las hojas que permiten la absorción de CO₂ para impulsar la fotosíntesis. La apertura estomática está controlada por dos células oclusivas que flanquean el poro. Los flujos de K⁺ son determinantes centrales de los movimientos estomáticos y objetivos prometedores para diseñar la tolerancia a la sequía. En este proyecto, investigamos estrategias para optimizar la eficiencia del uso del agua de las plantas basadas en la identificación y caracterización de nuevos mecanismos reguladores del principal canal rectificador de entrada de K⁺ en las células oclusivas, KAT1. Estudios anteriores en nuestro laboratorio mostraron que el ARNm de KAT1-YFP, expresado bajo control de un promotor constitutivo y ubicuo (35S), se acumula exclusivamente en las células oclusivas cuando se sobreexpresa en líneas transgénicas de Arabidopsis. Comprobaremos si estos resultados se deben a una regulación mediada por miARN.

Para lograr estos objetivos, emplearemos varios sistemas modelo, incluida la expresión transitoria y estable en Arabidopsis y *N. benthamiana*. Hemos seleccionado miARNs nativos que muestra potencial para reconocer a KAT1 y generado construcciones para su sobreexpresión. Estas construcciones de miARN se coexpresarán transitoriamente junto con nuestra construcción 35S::KAT1-YFP_35S::HA-RFP en *N. benthamiana* mediante transformación mediada por *A. tumefaciens*. Para confirmar aún más cualquier regulación observada de KAT1 por un miARN, se generarán versiones mutadas de 35S::KAT1-YFP en el correspondiente sitio complementario de unión de miARN (versiones de KAT1 resistentes a miARN que no afectan a la traducción de KAT1), y se coexpresarán junto con el miARN correspondiente en hojas de *N. benthamiana*. Además, para corroborar la regulación específica de KAT1 por los miARN en células epidérmicas, se utilizará la misma versión mutada de 35S::KAT1-YFP para la expresión estable en Arabidopsis.

Información de contacto: nuanco@btc.upv.es

Investigadores: Frederic Aparicio y Vicente Pallás

Proyecto: La modificación N6-metiladenosina (m6A) del RNA como mecanismo regulador en la biología de los virus RNA de plantas.

Los virus de plantas constituyen una grave amenaza para la seguridad alimentaria y la economía. Debido a su naturaleza biotrófica, los virus necesitan tejido vivo para su multiplicación, por lo que el proceso de infección de estos patógenos debe involucrar numerosas interacciones entre los componentes del virus y el hospedador. Por otro lado, las plantas han desarrollado diversos mecanismos defensivos tales como la adquisición de genes de resistencia o el silenciamiento de RNA. En los últimos años en nuestro laboratorio hemos identificado la metilación N6-metiladenosina (m6A) en el RNA como otro mecanismo de control que regula el ciclo viral de los virus de plantas.

En las células, esta modificación está regulada mediante proteínas *escritoras* (metiltransferasas), *borradoras* (desmetilasas) y *lectoras*, de modo que modulan la función de los ARNm a diferentes niveles tales como el corte y empalme de exones, estabilidad, degradación y traducción del mismo.

Nuestros estudios han permitido identificar una desmetilasa (Martinez-Perez et al., 2017; PNAS 114: 10755–10760) y algunas proteínas lectoras implicadas en el proceso infectivo del virus del mosaico de la alfalfa (Martinez-Perez et al., 2023; EMBO J. e113378). De hecho, la alteración de los niveles de cualquiera de estas proteínas tiene un profundo impacto en el ciclo del virus. El trabajo de Master que ofertamos se integrará dentro de nuestro objetivo global dirigido a seguir profundizando en los mecanismos moleculares que gobiernan este proceso e identificar nuevos componentes de la maquinaria m6A implicada en la infección viral. El reto final es comprender la relevancia biológica de la modificación de m6A en la patogénesis viral de modo que el conocimiento adquirido pueda ser útil para desarrollar nuevas y novedosas estrategias para controlar los virus de las plantas.

Información de contacto: vpallas@ibmcp.upv.es

Investigador: Marcos de la Peña Rivero

Proyecto: Nuevas estrategias antivirales y de regulación génica basadas en RNAs circulares y catalíticos.

Los DNAs circulares son una forma habitual de este ácido nucleico, dando lugar a la mayoría de genomas de organismos procariotas, de orgánulos o de bacteriófagos. Sin embargo, el RNA circular ha sido considerado como una macromolécula inusual hasta muy recientemente. En nuestro laboratorio hemos descrito diversos transposones de plantas y animales que se expresan como RNAs circulares a través dominios autocatalíticos o ribozimas. Más recientemente, hemos descubierto novedosas familias de virus y otros agentes subvirales de RNA circular en multitud de muestras medioambientales de todo el planeta, confirmando la ubicuidad de este tipo de macromolécula. En el contexto de una pandemia ocasionada por un virus de RNA como el SARS-CoV2, el desarrollo de nuevas estrategias para luchar contra esta y futuras enfermedades virales es inevitable. En este TFM se avanzará en el desarrollo de herramientas biotecnológicas basadas en RNAs circulares con ribozimas dirigidos contra virus de RNA, así como contra RNAs mensajeros de genes endógenos. Utilizando aproximaciones *in vitro*, se estudiarán diversas construcciones de RNA circular diseñado contra dianas de interés. Posteriormente, dichas construcciones se trasladarán a sistemas vegetales modelo (*N. benthamiana* y *A. thaliana*) mediante transformación genética, así como en ensayos de transfección en cultivos celulares. Todos estos trabajos, además de su interés básico y aplicado, permitirán al estudiante llegar a dominar las técnicas multidisciplinares empleadas en nuestro laboratorio, en las que fundamentalmente se combinan las aproximaciones bioinformáticas y genómicas con la biología molecular y estructural de ácidos nucleicos.

Información de contacto: rivero@ibmcp.upv.es

Investigadores: Alejandro Ferrando y Borja Belda-Palazón

Proyecto: Moduladores de la traducción en respuesta a estrés.

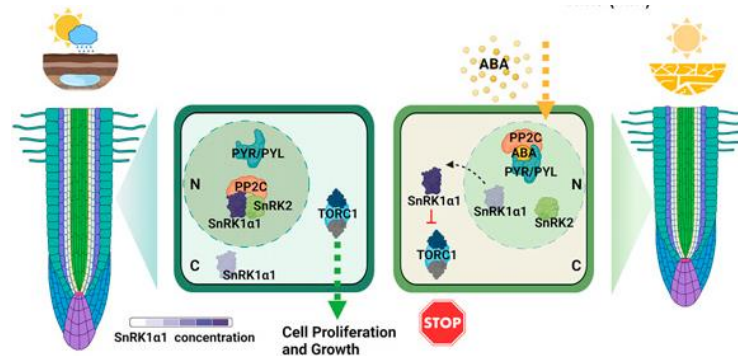
La regulación de la proteostasis (homeostasis de proteínas) en plantas es un mecanismo clave de la capacidad de las mismas para la tolerancia a diversos tipos de estrés ambiental. Entre los distintos pasos reguladores de la proteostasis, la biosíntesis de proteínas juega un papel fundamental para determinar los niveles de proteínas funcionales. En nuestro laboratorio (<https://ibmcp.upv.es/grupos-investigacion/proteostasis-y-estres-en-plantas/>), hemos caracterizado previamente las funciones del factor de traducción eIF5A mediante estudios de desactivación génica condicional, descubriendo nuevas funciones para dicho factor conservado en eucariotas. La implicación de eIF5A en procesos de desarrollo y respuesta a estrés lo convierten en una posible diana biotecnológica para obtener plantas resistentes a diversos tipos de estrés si somos capaces de generar versiones de ganancia de función. Con este objetivo, hemos obtenido versiones mutantes del factor eIF5A2 en residuos reguladores y hemos generado plantas transgénicas sobre-productoras de dichas versiones mutantes. El objetivo actual es caracterizar estas plantas transgénicas homocigotas evaluando sus fenotipos, a nivel fisiológico y molecular, frente a distintos tipos de estrés ambiental. Además estudios recientes en colaboración con otros grupos de investigación, han puesto de manifiesto la interacción física de eIF5A con proteínas implicadas en el proceso de autofagia, cuya implicación biológica queda por aclarar y será también el objetivo de este Trabajo Fin de Master. Este proyecto permitirá que el/la estudiante adquiera experiencia con diferentes técnicas de genética molecular, biología molecular y celular de plantas y se integre en un grupo de investigación que le permita iniciarse en su carrera investigadora.

Información de contacto: aferrando@ibmcp.upv.es; bbelda@ibmcp.upv.es

Proyecto: Regulación del eje SnRK1-TOR por acción de MAPKs en respuesta a ABA.

Investigadores: Alejandro Ferrando y Borja Belda-Palazón

Nuestro laboratorio trata de entender cómo la homeostasis de las proteínas en las plantas regula las compensaciones entre el crecimiento y la adaptación a múltiples condiciones de estrés ambiental, como la baja disponibilidad de nutrientes y la escasez de agua. En concreto nos centramos en el eje de regulación modulado por las proteínas SnRK1 y TOR. Estas quinasas son reguladores maestros que ejercen un papel importante en la regulación de la transcripción, la traducción y el metabolismo energético, aunque los detalles de los mecanismos moleculares subyacentes aún están por descubrir. En este sentido, recientemente hemos demostrado que los cambios dependientes de SnRK2 en la localización subcelular de SnRK1 son cruciales para inhibir a TOR y, en consecuencia, el crecimiento de la raíz en respuesta a ABA (Belda-Palazón et al. 2020 y 2022). Nuestros próximos pasos de investigación se centran en la elucidación del mecanismo molecular exacto que rodea la translocación nucleocitoplasmática de SnRK1 y su acción inhibitoria sobre TOR en respuesta a ABA. Basándonos en nuestras observaciones preliminares, planteamos la hipótesis de que este mecanismo de regulación podría estar mediado por la acción adicional de uno o varios miembros de la familia de las MAPK.



Información de contacto: aferrando@ibmcp.upv.es; bbelda@ibmcp.upv.es

Investigador: Jose Gadea y Regina Niñosles

Proyecto: Estudio de la influencia de los flavonoides en la calidad de las semillas.

Las semillas constituyen el principal modo de propagación de las plantas y suponen, por sí mismas, una esencial fuente de alimento, por lo que el estudio de factores que determinen su calidad tiene no sólo importancia para el mantenimiento de la biodiversidad sino también interés agronómico. Por ejemplo, las semillas van perdiendo gradualmente viabilidad durante el almacenamiento y las empresas productoras de semillas demandan mecanismos para retrasar ese “envejecimiento”, que depende tanto de factores ambientales como genéticos. Lo mismo ocurre con otros aspectos de calidad de la semilla, como su tamaño o velocidad germinativa.

En este laboratorio hemos estudiado en los últimos años algunos factores genéticos que determinan la calidad de la semilla e identificado varios mutantes de *Arabidopsis* que presentan una longevidad alterada. Entre otros, el mutante *tt7* tiene afectado un enzima de biosíntesis de flavonoides, y presenta una extrema sensibilidad al envejecimiento. Su caracterización ha mostrado que la sobreacumulación de un flavonoide (Kaempferol-3-ramnósido) provoca un desarrollo anormal de la cubierta de la semilla. Por lo tanto, corrobora que la testa de la semilla juega un papel muy relevante en el mantenimiento de su viabilidad ya que actúa de barrera frente a agresiones externas.

En este Trabajo Final de Máster se continuará con la caracterización funcional de este mutante *tt7* tratando de determinar cómo influyen los flavonoides en el desarrollo de la semilla, tratando de responder a preguntas como: ¿Cuál es el mecanismo por el cual el kaempferol 3-ramnósido altera el desarrollo de la testa? ¿Qué efectos tiene este flavonoide en el desarrollo del embrión? ¿Cuál es la influencia de los factores ambientales sobre los flavonoides y la calidad de semillas? Por lo tanto, en este trabajo se investigará mediante técnicas moleculares la influencia de los flavonoides, componentes clave de las semillas, en la calidad de las mismas, con el fin último de ofrecer semillas más vigorosas y capaces de mantenerse viables por más tiempo.

Información de contacto: jgadeav@ibmcp.upv.es; renioro@upvnet.upv.es

Investigador: Carmen Hernández

Proyecto: Análisis de supresores virales del silenciamiento por RNA.

Los virus son parásitos intracelulares obligados que, dada su limitada capacidad codificante, necesitan utilizar numerosos recursos del hospedador para completar su ciclo infeccioso. El hospedador por su parte activa una serie de respuestas defensivas para frenar o limitar el avance de la infección viral. En plantas, una de las respuestas antivirales más eficientes está basada en el proceso de silenciamiento por RNA que es disparado por RNAs de doble cadena virales y que, en última instancia, conduce a la degradación del RNA del virus invasor. Los virus han desarrollado estrategias para contrarrestar este proceso entre las que destaca la producción de proteínas que actúan como supresores de la ruta de silenciamiento (VSRs), al interferir con distintas etapas de la misma. Estos VSRs están siendo objeto de intensa investigación, no sólo por su papel clave en el ciclo biológico de los virus, sino también porque están sirviendo como herramientas para desentrañar rutas de silenciamiento endógenas de la plantas (implicadas tanto en lucha antiviral como en regulación génica), porque constituyen dianas atractivas para el control de virosis y porque, además, presentan gran potencial biotecnológico. El objetivo del trabajo será seguir avanzando en el estudio del modo de acción de VSRs utilizando técnicas de Biología molecular y celular muy diversas, entre las que se incluyen PCR, clonación de DNA, purificación de DNA/RNA, electroforesis de ácidos nucleicos, análisis Northern y/o Western, microscopia confocal, manejo de virus, transformación de bacterias, agroinfiltración de plantas, etc.

Información de contacto: cahernan@ibmcp.upv.es

Investigadores: M^a Pilar López-Gresa y Purificación Lisón

Proyecto: Estudio de genes y metabolitos implicados en la resistencia de las plantas de tomate frente a patógenos.

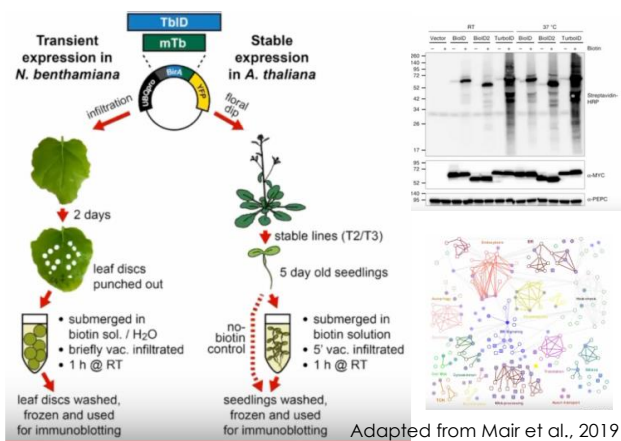
A lo largo de la evolución, las plantas han ido desarrollando sistemas de defensa frente a diversas agresiones abióticas y bióticas por parte de su entorno. Estos sistemas defensivos incluyen tanto barreras constitutivas como defensas inducibles. En respuesta a las señales de estrés, las plantas sintetizan proteínas de defensa y compuestos químicos de diversa naturaleza. Estos compuestos pueden ejercer funciones defensivas directas, esto es, actuando como antioxidantes, antibacterianos o antifúngicos, o actuar como metabolitos defensivos indirectos, señalizando la respuesta defensiva. Algunos compuestos volátiles (VOCs) y otros, tales como los alcaloides y compuestos fenólicos de mayor polaridad y peso molecular, pertenecen a este grupo de compuestos defensivos. Empleando diferentes interacciones planta-patógeno tales como tomate-*Pseudomonas syringae*, tomate-*Fusarium oxysporum*, tomate-Virus del mosaico del tomate y tomate-Viroide de la Exocortis de los Cítricos, en nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar componentes proteicos y metabólicos que constituyen dicha respuesta de defensa en tomate. Nuestro objetivo general es contribuir al conocimiento del sistema defensivo de las plantas y obtener plantas más resistentes a las agresiones externas, así como encontrar compuestos naturales asociados a la respuesta defensiva con interés biotecnológico.

Información de contacto: mplopez@cega.upv.es; plison@ibmcp.upv.es

Investigador: Jorge Lozano-Juste

Proyecto: Proximity labeling of protein complexes with TurboID.

Abiotic stresses severely impact plant growth, productivity, and the nutritional quality of crops. One innovative approach to identify stress-responsive proteins and unraveling their underlying molecular mechanisms is Biotin-based Proximity Labeling. A groundbreaking development in the field of Proximity Labeling is TurboID, a biotin ligase that has emerged through directed evolution. TurboID offers several distinct advantages over traditional protein-labeling enzymes, such as its non-toxic nature, time-saving capabilities, and remarkable catalytic efficiency. This technique has proven particularly effective in detecting transient or weak protein interactions, as well as revealing spatially or temporally restricted local proteomes within living cells. In this project, we will compare affinity purification (AP-MS) and proximity labelling (TurboID) in the identification of protein complexes. The candidate will apply molecular biology to clone different TurboID fusions and will generate transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing these fusions. In a next step, we will isolate biotinylated protein complexes and identify them by quantitative proteomics. In parallel, using a transgenic line generated by our group we will carry



out affinity purification using GFP-nanobodies and subject the purified proteins to proteomic identification. We will compare the identified proteins by these two methods to determine the efficiency of TurboID-proximity labelling compared to affinity purification. We expect to identify a new set of protein partners forming part of protein complexes in the plant cell. This newly identified proteins will contribute to our understanding of the plant stress response and will help to elucidate novel approaches to increase plant resilience to climate change with small molecules.

Información de contacto: lojujo@ibmcp.upv.es