

**Oferta Trabajo Fin de Master (TFM):**

Tutor/es: Ana Mª González y Marta Santalla

e-mail tutor/es: amgonzalez@mbg.csic.es, msantalla@mbg.csic.es

Centro/Institución/Empresa: Grupo de Genética del Desarrollo de Plantas (DEVOLEG). Misión Biológica de Galicia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC)

Título: Plataforma tilling para la identificación de mutantes en judía, *Phaseolus vulgaris*

Breve resumen del trabajo (< 100 palabras):

La secuenciación del genoma de *Phaseolus vulgaris* L. ha permitido desarrollar estrategias de genómica funcional que hasta años recientes eran casi impensables, como estrategias de Genética reversa. Entre estas, la denominada TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes), combina la eficiencia de mutágenos químicos, como el EMS, con un método de alta resolución que permite la identificación de polimorfismos en un solo nucleótido mediante el análisis de las curvas de fusión de ADN (High Resolution-Melting o HRM). En este trabajo se pondrá a punto una plataforma TILLING de judía, para la que será necesario extraer ADN de una población compuesta por 2688 familias M2. La cuantificación de todos esos ADN permitrá la creación de conjuntos, o pools, en los que, mediante amplificación y análisis de las curvas de fusión de ADN, se realizará un rápido rastreo de cualquier mutación. La funcionalidad del método se comprobará detectando un mutante, previamente caracterizado, incluido como control positivo. Los objetivos de este trabajo serán: (1) Colaborar en la puesta a punto de una plataforma TILLING para la identificación de mutaciones puntuales en poblaciones de judía mutagenizadas con EMS. (2) Uso de la plataforma TILLING para un programa de Genética reversa e identificar mutantes en un gen de función desconocida. Esta información puede suponer una gran aportación a la genómica funcional de judía, ya que permitirá la identificación de polimorfismos en genes concretos sin necesidad de estudios genéticos previos, de forma rápida y eficiente.

Actividades a desarrollar:

1. Generación de la colección de mutantes, extracción del DNA y construcción de “pools”. El Grupo dispone de una amplia colección de mutantes de judía, cuyas semillas fueron sometidas a tratamientos con EMS y a partir de ellas se generaron las correspondientes poblaciones M1. Las plantas de estas poblaciones fueron autofecundadas para disponer de semillas M2 o familias M2 que serán las utilizadas en la plataforma TILLING. Como primer paso de la plataforma TILLING, se tomarán 12-16 semillas de 2688 familias de una población M2 para la extracción y cuantificación de ADN genómico. Se realizarán conjuntos de ADN o pools con el ADN de las distintas familias, puesto que el número de familias que se analizan es elevado, y la construcción de pools acelera el proceso de búsqueda
2. Amplificación del gen o fragmento del gen de interés mediante PCR. Una vez generados los pools y los superpools, se amplificará mediante PCR un fragmento de un gen de función conocida utilizando como molde el ADN de cada uno de los superpools, y cebadores de secuencia conocida y específicos de los genes analizados. Los productos de la amplificación serán sometidos a HRM.
3. Análisis de las mutaciones y asociación mutación-fenotipo. Una vez localizada la familia que porta la mutación para el gen en cuestión, el siguiente paso es caracterizar la mutación, para lo cual será necesario secuenciar el fragmento de ADN. La secuencia nucleotídica que presenta el polimorfismo será comparada mediante un alineamiento con la secuencia nucleotídica de plantas no mutagenizadas para la identificación de la posición y del tipo de polimorfismo.