



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Construcción de microARN artificiales
para silenciar grupos de parálogos
en *Arabidopsis thaliana***

Beatriz Andreo Jiménez
Trabajo de fin de Máster
Elche, 2009

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor llevada a cabo por la Licenciada Beatriz Andreo Jiménez como trabajo final del Máster en Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

María Rosa Ponce Molet

José Luis Micol Molina

Elche, 22 de junio de 2009.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

El trabajo que se refleja en esta memoria se enmarca en un proyecto más ambicioso, que se está llevando a cabo en los laboratorios de María Rosa Ponce y José Luis Micol y tiene como objetivo la obtención de una colección de 350 líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, en cada una de las cuales se inhibirá la expresión de un grupo de genes de factores de transcripción sospechosos de ser redundantes. Esta colección será una herramienta de silenciamiento génico particularmente útil para el análisis funcional de los genes que codifican factores de transcripción, muchos de los cuales no pueden ser estudiados mediante abordajes mutacionales clásicos, ya que sus alelos nulos no manifiestan fenotipo mutante alguno a causa de la redundancia funcional entre parálogos.

Hemos optado por la construcción de microARN artificiales (amiARN) como herramienta para la inactivación simultánea de varios parálogos, por su capacidad de silenciar simultáneamente y con gran especificidad grupos de genes relacionados estructuralmente.

Hemos empleado las herramientas desarrolladas por el grupo de D. Weigel (Instituto Max Planck de Biología del desarrollo, Tübingen, Alemania) para el diseño de los amiARN e introducido modificaciones en su protocolo, que nos han permitido optimizar la síntesis de estas moléculas.

Hemos optado por la utilización de la polimerasa *Phusion* para las amplificaciones mediante PCR, por su fidelidad y robustez, y por la tecnología *Gateway* para la generación de las construcciones, por su efectividad y versatilidad.

Hemos simplificado y acortado el procedimiento de transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens*, prescindiendo del tampón de infiltración.

Nuestros resultados relativos a los genes que hemos elegido como controles, *GLABRA1* y *AGAMOUS*, confirman la validez de nuestro método: hemos obtenido fenocopias de los alelos de insuficiencia de función de *GL1* y *AG* en las plantas transgénicas a las que hemos transferido construcciones productoras de amiR-GL1-1 y amiR-AG-1, dos amiARN diseñados para inhibir específicamente la traducción de los ARNm de los genes *GL1* y *AG*, respectivamente.