



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Mutagénesis mediante CRISPR/Cas
de genes de las familias de factores de
transcripción CCAAT-HAP5, C2H2, NAC y
C2C2-CO-like de Arabidopsis**

Álvaro Valdés Penalva

Tutores:

José Luis Micol Molina

Alejandro Ruiz Bayón

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2020-2021

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

ALEJANDRO RUIZ BAYÓN, Contratado predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Álvaro Valdés Penalva como Trabajo de Fin del Grado en Biotecnología. 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.

José Luis Micol Molina

Alejandro Ruiz Bayón

Elche, 31 de agosto de 2021.

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En un estudio anterior, realizado en el laboratorio de María Rosa Ponce, se usaron microARN artificiales (amiARN) para inhibir simultáneamente la traducción de los ARN mensajeros de varios genes de algunas familias de factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana*. Se obtuvieron así líneas transgénicas que manifestaron alteraciones morfológicas en las hojas de la roseta, rasgos fenotípicos que se consideraron indicadores de la implicación de los genes silenciados postranscripcionalmente por los amiARN en la morfogénesis foliar. En este Trabajo de Fin de Grado se ha iniciado un análisis mutacional de dichos genes. Hemos diseñado 62 ARN guías (ARNg) para la obtención de mutantes múltiples mediante la tecnología CRISPR/Cas, a fin de silenciar hasta 13, 13, 5 y 31 miembros de las familias CCAAT-HAP5, C2H2, NAC y C2C2-CO-like de factores de transcripción, respectivamente. Hemos obtenido moléculas bicatenarias de ADN que contienen secuencias complementarias a dichos ARNg y hemos iniciado el proceso de su domesticación y ensamblaje multipartito en vectores de destino del sistema GoldenBraid, que permite la síntesis simultánea de varios ARNg.

Palabras clave: factores de transcripción, CRISPR/Cas9, GoldenBraid, *Arabidopsis thaliana*.

In a previous study, performed at the laboratory of María Rosa Ponce, artificial microRNAs (amiRNAs) were used to simultaneously inhibit the translation of the messenger RNAs of several genes of some transcription factor families in *Arabidopsis thaliana*. Transgenic lines were obtained in this way that exhibited morphological alterations in their rosette leaves, phenotypic traits that were considered evidence of the implication in leaf morphogenesis of the genes post-transcriptionally silenced by the amiRNAs. In this End of Degree Assignment, we initiated a mutational analysis of such genes. We designed 62 guide RNAs (gRNAs) to obtain multiple mutants by CRISPR/Cas technology, to simultaneously silence up to 13, 13, 5 and 31 members of the CCAAT-HAP5, C2H2, NAC and C2C2-CO-like families of transcription factors, respectively. We obtained double stranded DNA molecules harboring sequences complementary to such gRNAs, and initiated the process of their domestication and multipartite assembly into destination vectors of the GoldenBraid system, which allows the simultaneous synthesis of several gRNAs.

Keywords: transcription factors, CRISPR/Cas9, GoldenBraid, *Arabidopsis thaliana*.