



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Una contribución a la mejora en la edición
CRISPR/Cas9 y la selección de plantas
editadas en *Arabidopsis thaliana***

Miguel Augusto Melo Medina

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2022-2023

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

ROSA MICOL PONCE, Investigadora postdoctoral 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 Miguel Augusto Melo Medina 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.



María Rosa Ponce Molet



Rosa Micol Ponce

Elche, 14 de junio de 2023

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El objetivo de este TFG ha sido contribuir a la optimización de un protocolo que facilite la edición genómica CRISPR/Cas en el laboratorio. Mediante la tecnología GoldenBraid, hemos ensamblado en un único vector varios de los componentes del sistema, procedentes de diferentes plásmidos. Hemos utilizado el nuevo plásmido para generar construcciones con guías para la edición de la región que codifica el dominio AIM de SMO4 y UTP18 de Arabidopsis. Hemos seleccionado semillas T₁, procedentes de la edición del promotor del gen *ARGONAUTE1 (AGO1)*, empleado el gen *DsRed* como marcador de selección alternativo al uso de marcadores de resistencia en las plantas. La expresión de *DsRed* generó semillas rojas, portadora de los transgenes de interés y distinguibles a simple vista del resto de las semillas no transformadas. Hemos obtenido 11 transformantes e identificado los alelos mutantes que portan, procedentes de la edición. Por tanto, hemos comprobamos la utilidad del sistema GoldenBraid para el encadenamiento de los componentes CRISPR/Cas en un único vector, comprobado la eficacia de la edición y la de la selección de plantas transformantes, basada en la expresión de la proteína DsRed.

Palabras clave: CRISPR/Cas9, *nptII*, *DsRed*, GoldenBraid, *SMO4*, *UTP18*, *AGO1*

The objective of this final degree project (TFG) has been to contribute to the development of a protocol that facilitates CRISPR/Cas genomic editing in our laboratory. Using the GoldenBraid technology, we assembled multiple components of the system from different plasmids into a single vector. We utilized this new plasmid to generate constructs with guides for editing the region encoding the AIM domain of Arabidopsis SMO4 and UTP18 proteins. We also selected T₁ seeds resulting from editing the promoter of the *ARGONAUTE1 (AGO1)* gene, using the *DsRed* gene as an alternative selection marker instead of resistance markers in plants. The DsRed protein produced red seeds carrying the desired transgenes and distinguishable by the naked eye from the rest of the non-transformed seeds. We obtained 11 transformants and identified the mutant alleles they carry because of editing. Therefore, we verified the utility of the GoldenBraid system for linking CRISPR/Cas components in a single vector, as well as the efficacy of editing and the selection of transformed plants based on DsRed protein expression.

Keywords: CRISPR/Cas9, *nptII*, *DsRed*, GoldenBraid, *SMO4*, *UTP18*, *AGO1*