



Universidad Miguel Hernández de Elche

**Obtención de combinaciones cuádruples
de alelos mutantes de genes de la familia
CUPULIFORMIS de Arabidopsis**

Alba del Carmen Bonete Lax

Tutores:

José Luis Micol Molina

Lucía Juan Vicente

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2023-2024

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

LUCÍA JUAN VICENTE, contratada 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 Alba del Carmen Bonete Lax 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.

Firmado por LUCÍA
JUAN VICENTE el
día 20/06/2024

Lucía Juan Vicente

JOSE LUIS|
MICOL|
MOLINA



Firmado digitalmente
por JOSE LUIS|MICOL|
MOLINA
Fecha: 2024.06.20
23:48:23 +02'00'

José Luis Micol Molina

Elche, 20 de junio de 2024

I.- RESUMEN

La familia *CUPULIFORMIS* (*CP*) incluye cinco genes, dos de los cuales, *INCURVATA11* (*ICU11*) y *CP2*, codifican componentes de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis* y son desigualmente redundantes. En este Trabajo de Fin de Grado (TFG) hemos continuado intentos anteriores de establecer si *CP3*, *CP4* y *CP5* presentan redundancia funcional, entre sí y/o con *ICU11* y *CP2*. Aunque se habían generado previamente cuádruples mutantes *icu11-5 cp3-1 cp4-5 cp5-1* y *cp2-3 cp3-1 cp4-5 cp5-1*, los alelos *cp3-1* y *4-5* podrían no ser nulos. Además, *CP4* y *CP5* están ligados, lo que dificulta la obtención de dobles mutantes *cp4 cp5* mediante cruzamientos, por lo que, previamente al inicio de este TFG se diseñaron dos ARN guía para mutagenizar *CP4* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Hemos obtenidos triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2* y hemos generado una construcción de CRISPR/Cas9 para mutagenizar *CP4* y la hemos empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *CUPULIFORMIS*, CRISPR/Cas9, GoldenBraid

The *CUPULIFORMIS* (*CP*) family includes five genes, two of which, *INCURVATA11* (*ICU11*) and *CP2*, encode components of the epigenetic machinery of *Arabidopsis* and are unequally redundant. In this End of Degree Thesis (TFG), we have continued previous attempts to determine whether *CP3*, *CP4*, and *CP5* exhibit functional redundancy, either among themselves and/or with *ICU11* and *CP2*. Although quadruple mutants *icu11 5 cp3-1 cp4-5 cp5-1* and *cp2-3 cp3-1 cp4-5 cp5-1* had been previously generated, the *cp3-1* and *4-5* alleles may not be null. Additionally, *CP4* and *CP5* are linked, which complicates obtaining *cp4 cp5* double mutants through crossings. Therefore, prior to the start of this TFG, two guide RNAs were designed to mutagenize *CP4* using CRISPR/Cas9 technology. We have obtained triple mutants: *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2*, and *cp2-3 cp3-2 cp5-2* and we have generated a CRISPR/Cas9 construct to mutagenize *CP4* and used it to transform *Agrobacterium tumefaciens* cells.

Keywords: *Arabidopsis*, *CUPULIFORMIS*, CRISPR, GoldenBraid