



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

Construcción de un microARN artificial en *Arabidopsis thaliana*

Adrián Cabezas Fuster

Tutores:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2013/2014

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

ROSA MICOL PONCE, 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 llevada a cabo por el estudiante Adrián Cabezas Fuster como Trabajo de Fin de 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, 4 de julio de 2014.

I.- RESUMEN

El trabajo que se refleja en esta memoria se basa en la utilización de una de las herramientas biotecnológicas más eficaces y universales para la inactivación dirigida de genes en eucariotas, incluida la especie humana: los microARN artificiales (amiARN). Hemos seleccionado como diana de un amiARN un gen de *Arabidopsis thaliana* que no había sido estudiado hasta ahora y cuyos alelos nulos en otras especies causan letalidad temprana. Sus presuntos ortólogos participan en la regulación epigenética de la expresión de los genes de los ARN ribosómicos (ARNr).

Hemos diseñado, construido, clonado, secuenciado y transferido a *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y, por último, *Arabidopsis thaliana*, un transgén que produce un amiARN que silenciará en las plantas el gen de interés. El esqueleto del amiARN se construyó mediante una serie de reacciones de PCR que incluyeron la extensión de extremos solapantes. Para su clonación se empleó la tecnología Gateway, generando un clon de entrada y otro de destino para su expresión en *Arabidopsis thaliana*.

Palabras clave: microARN artificiales, silenciamiento génico, *Arabidopsis thaliana*.

This work is based on one of the most effective and universal biotechnological tools for the inactivation of gene expression in eukaryotes: artificial microRNAs (amiRNAs). We chose as amiRNA target an *Arabidopsis thaliana* gene that had not previously been studied, whose null alleles cause early lethality in other species. The putative human and yeast orthologs of this gene participate in the epigenetic regulation of the expression of genes encoding ribosomal RNAs (rRNAs).

We have designed, constructed, cloned, sequenced and transferred into *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Arabidopsis thaliana* a transgene that produces an amiRNA, which will silence the gene of interest when expressed in plants. The amiRNA skeleton was constructed by means of a series of PCR amplifications, which included the extension of overlapping ends. The Gateway technology was used for the cloning of the amiRNA producing transgene; entry and destination clones were obtained for expression of the transgene in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords; miRNA, amiRNA, gene silencing, *Arabidopsis thaliana*.