

RESUMEN

En el contexto actual de cambio climático, resulta urgente desarrollar nuevas tecnologías de fitomejoramiento que garanticen el suministro de alimentos a una población en rápido crecimiento. La reciente aparición de herramientas basadas en las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del acrónimo CRISPR en inglés) y sus proteínas asociadas (CRISPR-Cas) ha revolucionado la edición genómica dirigida, resultando muy prometedora tanto para la biología vegetal básica como para la mejora de cultivos. Los sistemas CRISPR-Cas más comunes incluyen una endonucleasa Cas y un ARN guía que determina específicamente la secuencia diana a editar en el genoma. El suministro de los componentes de reacción CRISPR-Cas a una célula vegetal es un paso crucial que influye notablemente en la velocidad y la eficiencia de edición. Los enfoques convencionales se basan en el suministro de dichos componentes mediante tecnologías de transformación o la expresión transitoria en protoplastos, siendo ambos procesos laboriosos que pueden acarrear problemas legales. Alternativamente, estudios recientes han destacado el potencial de virus de ARN para ser utilizados como vectores de expresión transitoria de los componentes de reacción CRISPR-Cas en plantas, también conocido como edición genómica inducida por virus (VIGE en inglés). Puesto que la aplicabilidad de cada vector viral se encuentra limitada por sus propiedades moleculares y un rango específico de plantas huésped, esta Tesis ha tenido como objetivo principal expandir y mejorar las herramientas disponibles para el VIGE.

En primer lugar, diseñamos un vector derivado del Virus X de la patata (PVX; género *Potexvirus*; familia *Alphatetraviridae*) para suministrar múltiples ARNs guía a una línea transformada de *Nicotiana benthamiana* que expresaba constitutivamente la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Mediante el vector derivado de PVX, conseguimos editar genes endógenos de la planta huésped de manera eficiente, produciendo casi un 80% de modificaciones en tejidos de plantas adultas. Curiosamente, PVX permitió la expresión simultánea de matrices de ARNs guía no espaciados, lo cual resultó en la edición de múltiples genes en pocos días. Obtuvimos progenies editadas con una alta tasa de mutaciones bialélicas hereditarias tanto de plantas regeneradas a partir de tejido infectado como de semillas de plantas infectadas; en este último caso, el ARN guía fue previamente fusionado a un módulo de ARN móvil. Dado que PVX no se transmite por semillas, todas las plántulas editadas estaban libres de virus.

A fin de expandir las estrategias basadas en virus de plantas para una edición genómica sin transformación, seguidamente desarrollamos un sistema de dos vectores virales compatibles para el suministro simultáneo de todos los componentes de reacción CRISPR-Cas en la planta. Modificamos el Virus del grabado del tabaco (TEV; género *Potyvirus*; familia *Potyviridae*) para que expresase una nucleasa Cas12a y, en combinación con el envío de ARN guía mediante PVX, logramos la edición sin transformación de una línea de *N. benthamiana* que expresaba constitutivamente la Nib del potyvirus. Además, demostramos que un único vector PVX era capaz de proporcionar la actividad de Nib, así como de suministrar el ARN guía para la edición genómica en plantas silvestres.

En conjunto, el trabajo realizado en esta Tesis contribuye a la expansión de las herramientas actuales para VIGE. La amplia gama de huéspedes que poseen tanto PVX como TEV, particularmente entre solanáceas, postula a ambos virus como candidatos muy prometedores para futuras aplicaciones en genómica funcional y mejora de cultivos.