

Resumen

La mejora genética vegetal tiene como objetivo la obtención de plantas con rasgos mejorados o características novedosas que podrían ayudar a superar los objetivos de sostenibilidad. Para este fin, la biotecnología vegetal necesita incorporar nuevas herramientas de ingeniería genética que combinen una mayor precisión con una mayor capacidad de mejora. Las herramientas de edición genética recientemente descubiertas basadas en la tecnología CRISPR/Cas9 han abierto el camino para modificar los genomas de las plantas con una precisión sin precedentes. Por otro lado, los nuevos enfoques de biología sintética basados en la modularidad y la estandarización de los elementos genéticos han permitido la construcción de dispositivos genéticos cada vez más complejos y refinados aplicados a la mejora genética vegetal. Con el objetivo final de expandir la caja de herramientas biotecnológicas para la mejora vegetal, esta tesis describe el desarrollo y la adaptación de dos nuevas herramientas: una nueva endonucleasa específica de sitio (SSN) y un interruptor genético modular para la regulación de la expresión transgénica.

En una primera parte, esta tesis describe la adaptación de CRISPR/Cas12a para la expresión en plantas y compara la eficiencia de las variantes de *Acidaminococcus* (As) y *Lachnospiraceae* (Lb) Cas12a con *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) descritos anteriormente en ocho loci de *Nicotiana benthamiana* usando expresión transitoria. LbCas12a mostró la actividad de mutagénesis promedio más alta en los loci analizados. Esta actividad también se confirmó en experimentos de transformación estable realizados en tres plantas modelo diferentes, a saber, *N. benthamiana*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*. Para este último, los efectos mutagénicos colaterales fueron analizados en líneas segregantes sin la endonucleasa Cas12a, mediante secuenciación del genoma descartándose efectos indiscriminados. En conjunto, los

resultados muestran que LbCas12a es una alternativa viable a SpCas9 para la edición genética en plantas.

En una segunda parte, este trabajo describe un interruptor genético reversible destinado a controlar la expresión génica en plantas con mayor precisión que los sistemas inducibles tradicionales. Este interruptor, basado en el sistema de recombinación del fago PhiC31, fue construido como un dispositivo modular hecho de partes de ADN estándar y diseñado para controlar el estado transcripcional (encendido o apagado) de dos genes de interés mediante la inversión alternativa de un elemento regulador central de ADN. El estado del interruptor puede ser operado externa y reversiblemente por la acción de los actuadores de recombinación y su cinética, memoria y reversibilidad fueron ampliamente caracterizados en experimentos de transformación transitoria y estable en *N. benthamiana*.

En conjunto, esta tesis muestra el diseño y la caracterización funcional de herramientas para la ingeniería del genómica y biología sintética de plantas que ahora ha sido completada con el sistema de edición genética CRISPR/Cas12a y un interruptor genético reversible y biestable basado en el sistema de recombinación del fago PhiC31.