

RESUMEN

La Biología Sintética de Plantas es un campo en rápida expansión, con un gran potencial para potenciar la producción de compuestos en plantas. Las plantas pueden actuar como biofactorías sostenibles y económicas para la producción de moléculas de alto valor; sin embargo, la producción continua a menudo genera problemas de toxicidad para la propia planta y bajos rendimientos. Un objetivo clave en este ámbito es lograr un control preciso e inducible sobre la expresión génica mediante circuitos genéticos sintéticos que incluyen sensores y procesadores modulares. Esta tesis se centra en el desarrollo de un sensor de cobre y procesadores basados en geminivirus, diseñados como componentes modulares para circuitos sintéticos en *Nicotiana benthamiana*, una planta modelo con gran potencial para transformaciones génicas tanto transitorias como estables.

El primer capítulo de esta tesis presenta un sistema de expresión génica inducible por cobre, diseñado para permitir una regulación precisa dependiente de sulfato de cobre (CuSO_4). Este sistema incluye un elemento sensor compuesto por un factor de transcripción que se une al cobre, CUP2, fusionado al dominio de activación Gal4 y un promotor sintético con sitios de unión al cobre (CBS) ubicado antes de un promotor mínimo. El sensor de cobre se utilizó exitosamente para controlar un activador transcripcional programable basado en CRISPR/dCas9 (dCasEV2.1) en *N. benthamiana*. Este sensor, combinado con el procesador dCasEV2.1 (CS/dCasEV2.1), confirió un control robusto de la expresión génica, con mínima actividad basal y fuerte activación en respuesta a cobre, ofreciendo una herramienta robusta para la activación específica de genes endógenos. Este sistema tiene un gran potencial para la regulación dirigida de genes en Biología Sintética de Plantas, especialmente en aplicaciones que requieren activación bajo demanda y baja expresión de fondo.

El segundo capítulo se centra en el desarrollo de un circuito de amplificación génica regulado por cobre, denominado CuBe, en referencia al ion cobre (Cu^{2+}) y al virus del enanismo amarillo del frijol (BeYDV). CuBe combina el sensor de cobre con un vector replicativo derivado específicamente del geminivirus BeYDV y sus correspondientes proteínas asociadas a replicación (Rep/RepA). Esta combinación permite la activación inducida por cobre del replicón y la posterior expresión de proteínas recombinantes en *N. benthamiana*. Diseñado para lograr una baja expresión basal y alta inducibilidad, CuBe facilita la producción controlada de proteínas de interés farmacéutico, como anticuerpos. Se generaron líneas transgénicas estables con CuBe, confirmando su funcionalidad a largo plazo y robustez con métodos alternativos de aplicación de cobre, como en post-cosecha e hidroponía. Este sistema destaca el potencial de los circuitos regulados por cobre para aplicaciones escalables de Agricultura Molecular en condiciones controladas.

El tercer capítulo amplía el uso de sistemas basados en geminivirus investigando y optimizando varios vectores geminivirales (derivados de BeYDV, TYLCV y BCTV) para aplicaciones en biotecnología vegetal. Utilizando un sistema reportero de bioluminiscencia autosostenida, este estudio caracteriza la dinámica y los niveles de expresión basal de diferentes configuraciones de vectores, evaluando su eficacia para la expresión transitoria de una enzima recombinante ligada a la bioluminiscencia. Estos análisis proporcionaron información sobre los puntos fuertes y las limitaciones de cada vector para aplicaciones específicas, como la expresión de múltiples genes, lo que enriquece el conjunto de herramientas geminivirales disponibles para la Biología Sintética de Plantas.

En conclusión, esta tesis ofrece herramientas innovadoras para la Biología Sintética de Plantas, con importantes aplicaciones en agricultura molecular y biocomputación basada en plantas. Al integrar sistemas inducibles con diseños de vectores optimizados, este trabajo establece una base sólida para futuros avances en circuitos genéticos sintéticos ajustados a aplicaciones biotecnológicas vegetales que requieren una expresión génica controlada y adaptable.