

Resum

La Biologia Sintètica és un camp emergent de caràcter interdisciplinar que es fonamenta amb l'aplicació a la enginyeria genètica dels principis de modularitat, abstracció i estandarització. Una nova vessant de la Biologia Sintètica aplicada a les plantes, la Biologia Sintètica Vegetal (BSV), ofereix noves possibilitats de millora de cultius que podrien portar a una millora de la resistència, a una major productivitat, o a un augment de la qualitat nutricional. Tanmateix, per poder arribar a este fi les eines moleculars disponibles en estos moments per a la BSV han d'adaptar-se per convertir-se en modulars, estàndards i més precises. Per això es plantejà com objectiu general d'aquesta Tesi adaptar, expandir i refinar les eines d'ensamblatge d'ADN de la BSV per permetre la incorporació d'especificacions funcionals en la descripció d'elements genètics estàndards (fitobricks) i facilitar la construcció d'estructures multigèniques cada vegada més complexes i precises, incloent eines d'edició genètica.

El punt de partida d'aquesta Tesi fou el mètode d'ensamblatge d'ADN modular GoldenBraid (GB) basat en enzims de restricció tipus IIS. Per optimitzar el procés d'ensamblatge i catalogar la col·lecció de fitobricks generats es desenvolupà una base de dades i un conjunt d'eines software, tal i com es descriu al Capítol 1. El paquet final de software es presentà en format web com GB2.0, fent-se accessible al públic mitjançant la pàgina web www.gbcloning.upv.es. El Capítol 1 també proporciona una descripció detallada del funcionament de GB2.0, exemplificant el seu ús amb l'ensamblatge d'una construcció multigènica per a la producció d'antocians. Amb l'augment en nombre i complexitat de les construccions GB, el següent pas fou el refinament dels estàndards amb la incorporació de la informació experimental associada a cada element genètic (es descriu en el Capítol 2). Per a aquest fi, el paquet de software de GB es reformulà amb una nova versió anomenada GB3.0. Aquesta versió consisteix en un sistema d'ensamblatge auto-contingut i completament traçable on les dades experimentals que descriuen la funcionalitat de cada element genètic es mostren en forma de fulla de dades estàndard. La utilitat de les especificacions tècniques per anticipar el comportament de dispositius biològics compostos s'exemplificà amb la combinació de un interruptor químic i un prototip d'un mòdul de sobreproducció d'antocians equivalent al descrit al Capítol 1. Aquesta combinació va tindre com a resultat un dispositiu de producció d'antocians que respon a dexametasona. A més a més, al Capítol 3 es descriu l'adaptació a la tecnologia GB de les eines d'enginyeria genètica CRISPR/Cas9, així com la seua caracterització funcional. La funcionalitat d'aquestes eines per a l'edició genètica i activació i repressió transcripcional es validà amb el sistema d'expressió transitòria en *N. benthamiana*. Finalment, al Capítol 4 es presenta una implementació pràctica de l'ús de la tecnologia GB per fer millora vegetal de mode precís. La transformació estable en tomaca d'una construcció intragènica que comprén un marcador de selecció intragènica i un regulador de la biosíntesi de flavonoïdes resultà en plantes de tomaca amb un major contingut de flavonols en llurs fruits.

En conjunt, esta Tesi mostra la implementació de dissenys genètics cada vegada més complexos i precisos en plantes utilitzant elements estàndards i eines modulars seguint els principis de la Biologia Sintètica.