

La Biología Sintética es un campo emergente de carácter interdisciplinar que se fundamenta en la aplicación de los principios ingenieriles de modularidad, abstracción y estandarización a la ingeniería genética. Una nueva vertiente de la Biología Sintética aplicada a las plantas, la Biología Sintética Vegetal (BSV), ofrece nuevas posibilidades de mejora de cultivos que podrían llevar a una mejora de la resistencia, a una mayor productividad, o a un aumento de la calidad nutricional. Sin embargo, para alcanzar este fin las herramientas moleculares disponibles en estos momentos para BSV deben ser adaptadas para convertirse en modulares, estándares y más precisas. Por ello se planteó como objetivo general de esta Tesis adaptar, expandir y refinar las herramientas de ensamblaje de DNA de la BSV para permitir la incorporación de especificaciones funcionales en la descripción de elementos genéticos estándar (fitobricks) y facilitar la construcción de estructuras multigénicas cada vez más complejas y precisas, incluyendo herramientas de editado genético.

El punto de partida de esta Tesis fue el método de ensamblaje modular de ADN GoldenBraid (GB) basado en enzimas de restricción tipo IIS. Para optimizar el proceso de ensamblaje y catalogar la colección de fitobricks generados se desarrollaron una base de datos y un conjunto de herramientas software, tal y como se describe en el Capítulo 1. El paquete final de software se presentó en formato web como GB2.0, haciéndolo accesible al público a través de www.gbcloning.upv.es. El Capítulo 1 también proporciona una descripción detallada del funcionamiento de GB2.0 ejemplificando su uso con el ensamblaje de una construcción multigénica para la producción de antocianinas. Con el aumento en número y complejidad de las construcciones GB, el siguiente paso necesario fue el refinamiento de los estándar con la incorporación de la información experimental asociada a cada elemento genético (se describe en el Capítulo 2). Para este fin, el paquete de software de GB se reformuló en una nueva versión (GB3.0), un sistema de ensamblaje auto-contenido y completamente trazable en el que los datos experimentales que describen la funcionalidad de cada elemento genético se muestran en forma de una hoja de datos estándar. La utilidad de las especificaciones técnicas para anticipar el comportamiento de dispositivos biológicos compuestos se ejemplificó con la combinación de un interruptor químico y un prototipo de un módulo de sobreproducción de antocianinas equivalente al descrito en el Capítulo 1, resultando en un dispositivo de producción de antocianinas con respuesta a dexametasona. Además, en el Capítulo 3 se describe la adaptación a la tecnología GB de las herramientas de ingeniería genética CRISPR/Cas9, así como su caracterización funcional. La funcionalidad de estas herramientas para editado génico y activación y represión transcripcional se validó con el sistema de expresión transitoria en *N.benthamiana*. Finalmente, el Capítulo 4 presenta una implementación práctica del uso de la tecnología GB para hacer mejora vegetal de manera precisa. La transformación estable en tomate de una construcción intragénica que comprendía un marcador de selección intragénico y un regulador de la biosíntesis de flavonoides resultó en frutos con un mayor contenido de flavonoles.

En conjunto, esta Tesis muestra la implementación de diseños genéticos cada vez más complejos y precisos en plantas utilizando elementos estándar y herramientas modulares siguiendo los principios de la Biología Sintética.