

RESUMEN

Los virus de plantas poseen la capacidad de parasitar células vegetales y poner a su disposición la maquinaria celular de la planta para la síntesis de sus propias proteínas. Aprovechando esta capacidad, la ingeniería genética ha dirigido muchos de sus esfuerzos en la modificación del genoma viral para utilizar los virus de plantas como vectores de expresión de proteínas de interés humano. Estas proteínas se almacenan en las plantas huésped que actúan como biofactorías de bajo coste y con elevada seguridad. Los potyvirus son un grupo de virus de plantas ampliamente estudiado y utilizado en biotecnología. Su genoma está formado por un RNA de cadena sencilla que codifica, principalmente, una poliproteína que se procesa para dar aproximadamente 10 proteínas maduras. En diferentes posiciones intercistónicas de los potyvirus se pueden insertar cDNAs que codifican proteínas de interés, las cuales se producen junto al resto de productos de la poliproteína. Si además estos cDNAs se flanquean por secuencias que codifican los sitios de procesamiento específicos de las proteasas virales, las proteínas heterólogas se liberan eficientemente de la poliproteína viral. Así, la inserción de un cDNA correspondiente al factor de transcripción Rosea1 de la ruta de las antocianinas en distintos potyvirus resulta en la biosíntesis de estos compuestos en las células vegetales infectadas. Las antocianinas son compuestos flavonoides coloreados que se pueden observar a simple vista, por lo que la expresión de Rosea1 en el contexto de la infección viral es una herramienta biotecnológica muy útil para seguir la infección de virus de plantas. En esta Tesis se han investigado diferentes aplicaciones biotecnológicas basadas en la expresión del factor de transcripción Rosea1 y la consecuente acumulación de antocianinas en el contexto de la biología de los potyvirus. Primero, se construyó un clon del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, género *Potyvirus*) etiquetado con Rosea1 (ZYMV-Ros1). El ZYMV es capaz de replicarse a nivel local pero no de moverse a larga distancia en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Un análisis de la infección por ZYMV-Ros1 en una serie de plantas transgénicas de *N. benthamiana* silenciadas en distintas RNAsas de tipo Dicer (DCL) permitió profundizar en el conocimiento de los mecanismos defensivos de la planta frente a este virus. Los resultados indicaron que DCL4 está implicada en restringir el movimiento sistémico del virus, ya que en plantas con este gen silenciado el virus es capaz de moverse a larga distancia. Además de su potencial biotecnológico como marcadores de actividades biológicas, las antocianinas son objeto de un gran interés nutricional, y también farmacéutico e incluso industrial, por su gran actividad antioxidante. Un clon viral derivado del virus Y de la patata (PVY; género

Potyvirus) que expresaba Roseal1 (PVY-Ros1) indujo la acumulación de más antocianinas que las que contienen frutas y verduras que son fuente rica de estos valiosos antioxidantes. Este mismo clon PVY-Ros1 también se utilizó para estudiar la transmisión del virus mediante áfidos vectores, observándose como estos provocan frecuentemente el inicio de la infección en el tejido vascular. Este mismo clon viral también permitió mostrar visualmente el efecto antiviral que tienen las nanopartículas de plata en plantas. Por último, en esta Tesis se combinó el factor de transcripción Roseal1 de las antocianinas con distintas proteasas de los potyvirus para crear circuitos lógicos de regulación génica en plantas. Se observó que la fusión de distintas proteínas virales, como la proteína de inclusión nuclear b (NIb) de los potyvirus o fragmentos de ella, al extremo carboxilo terminal de Roseal1 inhibía la actividad del factor de transcripción. Sin embargo, la acumulación de antocianinas se pudo restablecer insertando sitios de reconocimiento de proteasas virales entre ambas partes y coexpresando tales proteasas. La especificidad de corte y la eficiente actividad catalítica de las proteasas de inclusión nuclear a (NIaPro) del virus del grabado del tabaco (TEV; género *Potyvirus*) y del virus de las venas moteadas del tabaco (TVMV; género *Potyvirus*) permitió construir circuitos genéticos basados en regulación postranscripcional que son capaces de realizar algunas operaciones lógicas básicas (YES, OR y AND) en tejidos vegetales.