

RESUMEN TESIS DOCTORAL MARI CARMEN MARTÍ

La biotecnología de plantas actual y la así llamada agricultura molecular aspiran a convertir las plantas en “biofábricas” sostenibles para producir compuestos de valor como proteínas, metabolitos o nanopartículas de interés farmacéutico o industrial. Los virus de plantas, parásitos intracelulares obligados, constituyen una de las principales causas de enfermedades vegetales induciendo pérdidas devastadoras en los cultivos. A pesar de sus genomas mínimos, tienen la capacidad de secuestrar la maquinaria celular del huésped para producir cantidades elevadas de sus propias proteínas virales. Esta propiedad dio lugar a que surgiera la idea de reconvertir los virus de plantas de enemigos a amigos en herramientas para la biotecnología de plantas como vectores de expresión transitoria y andamios para nanomateriales.

Los carotenoides son metabolitos relevantes debido a sus propiedades nutricionales y beneficiosas para la salud. Los animales no pueden sintetizar carotenoides y, por lo tanto, dependen de su ingesta a través de la dieta para obtenerlos. El primer objetivo de este trabajo fue manipular la ruta de biosíntesis de carotenoides para producir los muy apreciados apocarotenoides de azafrán, siendo estos los productos de la escisión de carotenoides. Para este propósito, se diseñó un vector derivado del virus del grabado del tabaco (TEV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) manipulado para expresar unas enzimas específicas, dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD) de *Crocus sativus* y *Buddleja davidii*. Los análisis metabólicos de los tejidos infectados demostraron que, después de sólo dos semanas, se alcanzaron cantidades notables de crocinas y picrocrocina en plantas adultas de *Nicotiana benthamiana*. Solamente la expresión de CsCCD2L de *C. sativus* impulsada por virus dio como resultado una acumulación en hoja de 0.2% de crocinas y 0.8% de picrocrocina en peso seco. La coexpresión de CsCCD2L con otra enzima carotenogénica, como la fitoeno sintasa de *Pantoea ananatis* (PaCrtB), usando el mismo vector viral aumentó la acumulación de crocinas al 0.35%. Aunque estas cantidades todavía están lejos de las que se acumulan en fuentes naturales, como el estigma del azafrán, este sistema mediado por virus representa el primer sistema heterólogo capaz de producir crocinas.

Los compuestos fenólicos representan otro amplio grupo de metabolitos secundarios en plantas, muy apreciados también por sus propiedades químicas y promotoras de la salud. Los curcuminoides son polifenoles con alta actividad antioxidante que se encuentran naturalmente en el rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*). El segundo objetivo de este trabajo fue establecer un sistema para la producción heteróloga de curcuminoides en *N. benthamiana* utilizando vectores virales. Para ello, se desarrolló un sistema viral doble, basado en TEV y

en el virus X de la patata (PVX; género *Potexvirus*, familia *Alphaflexiviridae*), capaz de coexpresar diferentes enzimas biosintéticas en las mismas células. Este sistema se usó para expresar la dicétido-CoA sintasa 1 (DCS1) y la curcumina sintasa 3 (CURS3) de *C. longa* en plantas de *N. benthamiana*. El análisis metabólico confirmó la producción exitosa de curcuminoides. La cuantificación de curcumina indicó que la inoculación secuencial de ambos vectores virales era más eficiente que la coinoculación (6.5 ± 0.6 frente a 1.9 ± 0.3 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente). Posteriormente se analizó la coexpresión de DCS1 y CURS3 usando un solo vector viral derivado de TEV (TEV Δ N-DCS1-CURS3). Esto dio como resultado una producción más eficiente, ya que condujo a un aumento del doble en la acumulación de curcumina (11.7 ± 1.5 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Un análisis temporal utilizando el vector TEV Δ N-DCS1-CURS3 mostró que se lograba una acumulación máxima de 22 ± 4 $\mu\text{g/g}$ peso seco a los 11 días tras la inoculación.

Las nanopartículas virales (VNP) también han atraído la atención en biotecnología por su uso potencial como componentes básicos para nuevos materiales en nanotecnología y medicina. Los nanoanticuerpos son los dominios variables de los anticuerpos de camélidos de sólo cadena pesada (VHH) que han ganado interés como moléculas terapéuticas debido a su estructura simple, tamaño pequeño y alta especificidad. El último objetivo de este trabajo fue producir VNPs decoradas con un nanoanticuerpo codificadas genéticamente. El virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) y TEV se utilizaron como andamios para producir VNPs decoradas con un nanoanticuerpo contra la proteína verde fluorescente en plantas de calabacín (*Cucurbita pepo*) y *N. benthamiana*, respectivamente. La inclusión de un péptido de procesamiento 2A de picornavirus entre las proteínas fusionadas fue necesaria en las VNP derivadas de ZYMV, lo que resultó en una población de proteínas de cubierta mixta no modificadas y decoradas, pero no en las derivadas de TEV. Se confirmó funcionalmente el ensamblaje y unión de ambas VNPs contra GFP.

En conjunto, el trabajo presentado en esta tesis contribuye al concepto de que los virus de plantas, convenientemente manipulados, pueden convertirse en poderosas herramientas en biotecnología vegetal y agricultura molecular.