

RESUMEN TESIS RUBÉN MATEOS FERNÁNDEZ

Las plantas constituyen poderosas plataformas para biosintetizar compuestos de interés para el ser humano. Mediante la ingeniería metabólica y la biología sintética, se puede producir en estas biofactorías y de manera heteróloga compuestos de gran valor para el ser humano, desde moléculas de interés industrial, médico o de uso en agricultura. Entre estos últimos, se encuentran las feromonas sexuales de insectos.

En la actualidad, los daños ocasionados por plagas de insectos en los cultivos vegetales suponen enormes pérdidas económicas cada año. Para el control de dichas plagas, como alternativa a los pesticidas, el uso de semioquímicos, entre los cuales destacan las feromonas sexuales de insectos, se plantean como una solución de gran utilidad y mayor sostenibilidad. Sin embargo, la producción de dichos compuestos mayoritariamente tiene lugar mediante síntesis química, la cual genera productos químicos derivados que no son del todo respetuosos con el medio ambiente. Por tanto, se necesitan alternativas de síntesis para lograr una mayor sostenibilidad en el proceso.

Las rutas biosintéticas de las feromonas sexuales de polilla se encuentran mejor descritas actualmente, conociéndose gran parte de los genes responsables de dicha síntesis. Recientemente, en un trabajo publicado por nuestro grupo (Mateos-Fernández et al., 2021) se obtuvieron plantas transgénicas estables de *Nicotiana benthamiana*, las denominadas ‘SexyPlant’, productoras y emisoras de los compuestos volátiles y biológicamente activos como feromona Z11-16OH, Z11-16OAc y Z11-16Ald. Esto se consiguió tras introducir la ruta biosintética de varios compuestos feromona comunes a varias especies de polilla, reconstituida en *N. benthamiana* gracias a genes originarios de polilla y de plantas y aprovechando parte de su metabolismo endógeno de ácidos grasos. Sin embargo, se detectaron varios problemas de toxicidad asociados a la acumulación de dichos compuestos y a la alteración de la ruta metabólica de los ácidos grasos de la planta.

En el primer capítulo, ofrecemos alternativas a dichos problemas de toxicidad no deseados ocasionados en la ‘SexyPlant’. Para ello, en primer lugar, ofrecemos un abanico de acetiltransferasas alternativas a las planteadas en las primeras versiones de la ‘SexyPlant’, que mejoren la conversión del compuesto feromona Z11-16OH en Z11-16OAc, y con diferentes eficiencias. Por otro lado, exploramos la activación de dicha ruta biosintética, demostrando la posibilidad de regularla no solo de manera transitoria, sino también en plantas transgénicas estables, gracias al uso de reguladores transcripcionales basados en CRISPR (dead Cas9 activadora, concretamente dCasEV2.1) y al empleo combinado de promotores sintéticos. Así, generamos líneas estables, las denominadas “GuidedPathway” y “NonGuidedPathway”, con dos configuraciones génicas diferentes que acumulan biomasa y no producen ni emiten feromonas sexuales de polilla hasta que no se activan específicamente con los elementos genéticos ortogonales adecuados. Aunque el rendimiento de producción es menor que en las plantas constitutivas ‘SexyPlant’, en este capítulo demostramos la posibilidad de activar la ruta biosintética y exploramos los cuellos de botella del sistema.

En el segundo capítulo, nos centramos en la producción heteróloga en plantas de otra familia de compuestos, los monoterpenoides irregulares. Un gran porcentaje de estas moléculas resultan de enorme interés al constituir las feromonas sexuales

de las especies de insecto de la superfamilia Coccoidea (cochinillas, entre otras). En este capítulo exploramos el potencial de producción heteróloga de monoterpenoides irregulares en *N. benthamiana* y *N. tabacum*. Sin embargo, la ruta biosintética que lleva a dichas moléculas resulta en estos momentos desconocida, al no estar identificados los genes implicados en dicha biosíntesis. Para nuestro trabajo, expresamos genes de origen vegetal con actividad parecida. Introdujimos tanto en tabaco como en *N. benthamiana* los genes de la crisantemil difosfato sintasa (CPPS) de *Tanacetum cinerariifolium* y de la lavandulil difosfato sintasa (LPPS) de *Lavandula x intermedia*, para demostrar, en primer lugar, su producción transitoria. En segundo lugar, conseguimos la expresión estable de dichos genes, consiguiendo líneas transgénicas estables. Caracterizamos la producción y emisión de dichos compuestos volátiles en distintos tipos de tejido (vegetativo y reproductivo) así como en diferentes estadios de desarrollo de las hojas. Con ello, pudimos determinar que las hojas juveniles eran el tejido más productivo. Por otro lado, conseguimos acercarnos a nuestro objetivo de producir feromonas sexuales de Coccoidea combinando la expresión de *LiLPPS* con la de una acetiltransferasa de la misma especie, *LiAAT4*. Gracias a ello, conseguimos producir y emitir cantidades relativamente altas de lavandulil acetato, el cual constituye en sí mismo uno de los compuestos de la mezcla feromonal de la cochinilla *Dysmicoccus grassii* y de la feromona de agregación del trip *Frankliniella occidentalis*, así como un demostrado larvicida de mosquitos. La emisión producida por dichas plantas “biodispensadoras” consigue la considerable eficiencia de hasta 0,63 mg de lavandulil acetato al día, permitiéndonos estimar la necesidad de entre 200 y 500 de estas plantas por hectárea para equiparar el control conseguido por dispositivos liberadores de feromonas comerciales.

En resumen, esta tesis proporciona diferentes estrategias para abordar la producción de feromonas sexuales de insectos y compuestos volátiles asociados en biofactorías vegetales, explorando los límites de dicha biosíntesis.