

## RESUMEN

El empleo de organismos vivos como biofactorías ha ganado una atención significativa en la industria debido a la creciente demanda de sistemas de producción sostenible y la escasez de recursos. Entre sus muchas aplicaciones, las biofactorías pueden ser diseñadas para producir feromonas de insectos, las cuales sirven como alternativa ecológica a los pesticidas para el control de plagas en la agricultura. Como prueba de este concepto, en esta tesis doctoral se caracterizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* modificadas genéticamente con una ruta multigénica para producir las feromonas de polillas (Z)-11-hexadecenol (Z11-16OH) y (Z)-11-hexadecenil acetato (Z11-16OAc). Las plantas transgénicas resultantes produjeron cantidades moderadas de ambas feromonas (111.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW y 11.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW para Z11-16OH y Z11-16OAc, respectivamente), y tasas de emisión diarias de  $\sim 10$  ng  $\text{g}^{-1}$  FW para cada feromona.

La producción de feromonas en estas plantas, sin embargo, afectó significativamente a su desarrollo, probablemente debido a la sustancial carga metabólica y la posible toxicidad de estos productos derivados de lípidos. Una estrategia para superar estas anomalías en el desarrollo es diseñar un sistema de expresión condicional de los transgenes, permitiendo a las plantas crecer con normalidad antes de inducir la producción de feromonas. Para lograr este objetivo, en esta tesis desarrollamos un conjunto de promotores sintéticos personalizables, llamados GB\_SynP, que pueden ser activados con dCasEV2.1, un activador transcripcional potente y programable desarrollado recientemente para la inducción de genes en plantas. Estos promotores GB\_SynP permitieron una regulación precisa de transgenes individuales y múltiples, con unos niveles de transcripción robustos y modulables en el estado “encendido” (presencia de dCasEV2.1 portando la correspondiente guía de ARN), y una expresión mínima o indetectable en el estado “apagado”.

Con el fin de implementar un sistema de expresión condicional para producir feromonas en plantas, se generó una nueva ruta multigénica para la biosíntesis de feromonas de polilla bajo el control de los promotores GB\_SynP. Paralelamente, el activador dCasEV2.1 se reguló transcripcionalmente mediante el módulo CUP2:GAL4 sensible a sulfato de cobre, un inductor químico ampliamente utilizado en la agricultura. La funcionalidad de este sistema se probó mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*, lo que resultó en unos rendimientos estimados de 32.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW and 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW para Z11-16OH y Z11-16OAc, respectivamente, en el estado “encendido”, y unos niveles insignificantes en ausencia de cobre. Sin embargo, la expresión en estable de esta ruta de producción de feromonas regulada por cobre en *N. benthamiana* resultó en unos niveles de expresión de los transgenes significativamente reducidos, lo cual se tradujo en una marcada disminución en la producción de feromonas. Esto supone que el sistema en su forma actual resulte inviable como biofactoría de feromonas en términos prácticos. La consiguiente optimización de este sistema debe centrarse en mejorar la cascada de activación, en el uso de especies de plantas alternativas con mayor biomasa, y/o en incrementar las tasas de emisión en planta.

Como alternativa a la producción de feromonas en plantas, la intercambiabilidad de piezas génicas entre plantas y hongos filamentosos podría también aprovecharse para crear biofactorías fúngicas de feromonas. En este sentido, nuestro grupo de investigación adaptó previamente el sistema GoldenBraid a hongos filamentosos, al que llamamos FungalBraid. En esta tesis ampliamos la colección de FungalBraid incorporando 27 piezas nuevas que incluyen diferentes marcadores de selección y varios promotores constitutivos e inducibles, todos los cuales se caracterizaron funcionalmente en *Penicillium digitatum* y *P. chrysogenum*. Además, logramos expresar con éxito los promotores GB\_SynP desarrollados para plantas en *P. digitatum*,

en combinación con un vector no integrativo derivado de pAMA18 que expresa un sistema de dCas9 activadora. Aunque se requiere una mayor optimización de GB\_SynP en hongos filamentosos, pues los niveles de expresión fueron menores que los observados previamente en plantas, ésta y otras herramientas disponibles en la colección FungalBraid pueden utilizarse en el futuro de manera efectiva para el desarrollo de biofactorías fúngicas que produzcan feromonas de insectos y otras biomoléculas de alto valor.