

Resumen

Plant Molecular Farming (PMF) es la producción de proteínas de interés industrial y valor comercial en plantas. Su objetivo es proporcionar un enfoque seguro y rentable para la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Las plantas del género *Nicotiana*, especialmente el tabaco y *Nicotiana benthamiana*, han adquirido una importancia creciente como plataformas de producción de PMF debido a sus ventajas, como el alto rendimiento de biomasa, la facilidad de transformación y la expresión robusta de proteínas. Sin embargo, en la actualidad el tabaco y *N. benthamiana* no son hospedadores ideales para el cultivo molecular. Los objetivos de mejora genética, como retrasar o suprimir la floración para aumentar la biomasa de la planta, podrían convertir a *N. benthamiana* en un chasis de primera para fines de cultivo molecular. En este trabajo de investigación nos centramos en este objetivo. En el primer capítulo, realizamos un análisis de todo el genoma de los genes SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL) en esta especie y en su pariente cercana *N. tabacum*, identificando 49 genes SPL en *N. tabacum* y 43 genes SPL en *N. benthamiana*. Los genes SPL de las dos especies se clasificaron en ocho grupos filogenéticos de acuerdo con la clasificación de SPL en *Arabidopsis*. La estructura génica exón-intrón y los dominios de unión al ADN estaban muy conservados entre homeólogos y ortólogos, y se descubrió que la mayoría de ellos eran dianas del microRNA156. La expresión de los genes SPL en las hojas se analizó mediante RNA-seq en tres estadios diferentes, revelando que los genes que no estaban bajo el control de miR156 se expresaban en general de forma constitutiva a niveles altos, mientras que los genes regulados por miR156 mostraban niveles de expresión más bajos, a menudo regulados por el desarrollo. Seleccionamos el gen SPL13_1a de *N. benthamiana* como diana para un experimento CRISPR/Cas9 KO. El knock out completo de este único gen produjo un retraso significativo en el tiempo de floración de 4-5 días y un aumento de la ramificación. En el segundo capítulo, mostramos más knock outs CRISPR/Cas9 realizados en *N. benthamiana* con el objetivo de abolir la floración. Los activadores florales *NbFT4* y *NbFT5_1a/1b* fueron eliminados solos y en combinación con *NbSPL13_1a*. En la línea más editada FT4-FT5-SPL13 40-1 se prolongó el tiempo de floración hasta duplicarlo con respecto a las plantas WT, pero tampoco en este caso se logró su abolición. El retraso en la floración tuvo consecuencias sobre diversos aspectos del crecimiento de la planta, que cuantificamos a través de varios parámetros: las líneas más editadas presentaron mayor biomasa, altura, número de hojas y área foliar total en comparación con las editadas en menos genes y WT. Además, se evaluó el potencial de expresión de proteínas heterólogas de las líneas generadas. Inesperadamente, no fueron capaces de mantener altos niveles de expresión después de la quinta semana. Como perspectiva futura, los knockouts en otros actores importantes en el inicio de la floración, como *NbSPL9/15* y *NbSPL3/4/5*, se piramidarán en nuestras líneas.