



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Diseño y validación de herramientas biotecnológicas  
para la mejora del valor nutricional de la alfalfa  
(*Medicago sativa* L.)**

**Memoria presentada por**

**SANDRA FRESQUET CORRALES**

**para optar al grado de**

**DOCTOR por la Universidad Politécnica de Valencia**

**Directores**

**Dr. LUIS ANTONIO CAÑAS CLEMENTE  
Dr. JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER  
Dra. EDELÍN MARTA ROQUE MESA**

**Valencia, diciembre 2015**





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



Instituto de Biología Molecular  
y Celular de Plantas



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

D. Luis Antonio Cañas Clemente, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Científico del CSIC, D. José Pío Beltrán Porter, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor de Investigación del CSIC y D<sup>a</sup> Edelin Marta Roque Mesa, Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia y Titulado Superior Contratado del CSIC, con destino en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que,

D<sup>a</sup> Sandra Fresquet Corrales, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Diseño y validación de herramientas biotecnológicas para la mejora del valor nutricional de la alfalfa (*Medicago sativa* L.)”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 23 de septiembre de 2015.

Fdo: Dr. Luis A. Cañas Clemente    Fdo: Dr. José Pío Beltrán Porter    Fdo: Dra. Edelin Marta Roque Mesa



## AGRADECIMIENTOS

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta Tesis y que me han acompañado durante estos 5 años.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Dr. Luis Antonio Cañas y Dr. José Pío Beltrán, mi más amplio agradecimiento por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis. Gracias por haberme ayudado tantísimo. Gracias de corazón.

A mi directora, la Dra. Edelin Marta Roque, por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me ha permitido crecer como investigadora y que esta Tesis finalizara de la mejor manera posible. En especial, quiero agradecer esta última etapa, por su grandísima ayuda y por sus risas, haciendo que el final fuera menos duro. Te quería escribir un refrán, pero ya sabes que soy muy mala para eso...

A M<sup>a</sup> Cruz, que haces un trabajo indispensable para que el laboratorio funcione en el día a día, porque además, siempre estás dispuesta a ayudar ante cualquier situación. Sin duda, eres una grandísima compañera y me ha encantado tenerte en mi "equipo".

A mis compañeros de laboratorio y la hora del almuerzo: Mónica, Marina, José, Pablo, Roberto, Joanna, M.D. y Marisol. Gracias por los buenos ratos compartidos, las discusiones científicas y no tan científicas (como temas políticos, niños, recetas de cocina...), ¡Sin duda, he aprendido un poco de todo con vosotros! A Concha, muchas gracias por dedicarme muchos ratos de tu trabajo para ayudarme a solucionar dudas y problemas de todo tipo. A M<sup>a</sup> Carmen, porque nunca has dudado en echarme una mano, incluso, acogiéndome en tu despacho en el IVIA cada vez que lo he necesitado. Y por último, pero desde luego no menos importante, a mis niñas: Pilar, Rim y Rosa. Gracias por haber compartido conmigo los momentos más felices de mi vida y por haberme apoyado en los que eran menos: en vosotras he encontrado unas verdaderas amigas y sé que, a pesar de que la distancia será un obstáculo más adelante, siempre os tendré ahí.

Del resto de personas del IBMCP me gustaría dedicar unas líneas. A Afri, mi otra niña, porque eres una grandísima amiga y compañera: espero poder seguir compartiendo cada momento especial de nuestras vidas. Nunca olvides lo muy grande que eres. A Berta y Ale, muchísimas gracias por ayudarme cuando algo no salía y sobre todo, gracias por estar conmigo dentro y fuera de este instituto, por las cenas y

cervezas tan divertidas que hemos compartido. A Marisa, porque también formas parte de esos amigos que me llevo del IBMCP, con los que he compartido momentos tan felices de mi vida. Gracias a los que me alegráis la hora de comer cada día con vuestras risas y charlas: Myriam, Eszther, Vero, Edu, Miguel, Pepe, Víctor, Marina, Flo, Mariana, Majo y Ana. A otras que os veo por los pasillos: José Manuel, Carolina, Javi y Laura. Gracias a Salvi la *limpiadora* por tu sonrisa de cada mañana y por interesarte tanto por mí. A Mapi, por ayudarme a entender el mundillo de las antocianinas y las proantocianidinas, con todo lo que eso conlleva: gracias de corazón por tu paciencia y ayuda. A Lynne Yenush y Cecilia, por ayudarme a resolver todas mis dudas, tanto de temas burocráticos como científicos.

A la gente del laboratorio del Dr. Diego Orzáez, en especial a Marta, Estefanía y de nuevo Ale, por su paciencia y disposición para resolver cualquier pregunta referente a GoldenBraid 2.0, y por prestarme todas aquellas herramientas necesarias para su uso.

Al Prof. Francisco Tomás Barberán (CEBAS-CSIC) le agradezco su ayuda y colaboración en la interpretación de los resultados de HPLC y espectrometría de masas (MS) y en el análisis por floroglucinolisis.

Quería agradecer a otras personas por su profesionalidad y saber hacer. En especial a Eugenio Grau del Servicio de Secuenciación, por tantas veces que me has hecho la puñeta (y yo te las he devuelto) y por tu infinita ayuda. Al personal del invernadero, en especial a Rafa por cuidar tan bien de mis alfalfas.

Desde el punto de vista formal me gustaría agradecer la financiación recibida de los proyectos BIO2009-08134 y BIO2012-39849-CO2-01 (MINECO) sin la cual el trabajo experimental que he desarrollado habría sido imposible. También agradezco al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la concesión de una beca predoctoral dentro del programa JAE-Pre para la realización de mi tesis doctoral. Agradezco también la concesión de una beca de movilidad del CSIC que cofinanció mi estancia de tres meses en Texas. A la Dra. Lina Gallego y al Dr. Richard Dixon por acogerme en su laboratorio del departamento de Ciencias Biológicas, en la Universidad del Norte de Texas. Gracias por transmitirme vuestro conocimiento y ayuda durante mi estancia. En especial a Lina, por su compañía, su generosidad, sus detalles y darme su cariño que me hizo sentir como si estuviera en mi casa. Gracias por estar tan pendiente y preocuparte tanto de mí. Eres una gran amiga.

Después de todos estos agradecimientos relacionados con el mundo científico quiero tener unas palabras para mis amigos, que han estado ahí a lo largo de estos años. A Nuria, mi "hermanita", por hacerme sentir tan querida e importante para ti. Gracias por estar en mi vida desde la guardería y por poder contar contigo para todo, gracias por ser la mejor amiga del mundo. ¡Y por supuesto a Abel y a mis sobris! ¡Os quiero! A Sandra, Jordi y Laia, porque hacéis sentir que el tiempo no pasa para nosotros, pese a la

distancia, siempre seguiremos juntos. A Sonia, José, Nieves, Carlos, Alba, José y Manu, que como alguno de vosotros me dijo una vez: “no hace falta conocerse de toda la vida para ser grandes amigos”. ¡Viva Vista Calderona! A María y Lucía, por demostrarme las grandes personas que sois y apoyarme cada vez que lo he necesitado en esta última etapa tan dura de mi vida. Y a Javi, gracias por seguir a mi lado, por alegrarnos con tus gestos de cariño y tus chistes taaaaan malos.

Para ir terminando, a mi familia. A mis tíos y primos, en especial a mi tío Rafa, mi tía Ilu y mis primos Patricia y Alejandro: gracias por haberme apoyado en cada una de mis decisiones y por haberme hecho sentir que valía para esto. Gracias por hacerme sentir tan especial como sobrina y como prima. A mi hermano Jordi, porque a pesar de que te cuesta expresar lo que sientes por mí (eso siempre ha sido así...), tengo claro que el amor que sentimos es mutuo. Siempre estaré a tu lado, tete.

A Nacho, que ha elegido el estar a mi lado y compartir conmigo los malos y buenos momentos que han ido viniendo durante estos años. Gracias por tu infinita paciencia cuando he estado trabajando durante horas y horas. Por intentar entender este mundillo para ti tan raro. Gracias por hacer tú y las peques, que aquellos días en que lo veía todo negro, sacara una gran sonrisa. Sin tu apoyo, muchas cosas habrían sido mucho más difíciles.

Finalmente quiero agradecer a quienes dedico esta Tesis, a mis padres: Carlos y Paqui. Gracias por vuestro constante e incondicional apoyo, por vuestros consejos, por vuestro trabajo, vuestro esfuerzo, perseverancia y por haberme dado la educación que me ha hecho ser quien soy: sin duda, esta Tesis es fruto del gran trabajo que habéis hecho y el haber podido presentarla ha sido posible gracias a todos esos valores que me habéis enseñado. Os quiero muchísimo papás.

Sandra

*A mis padres*

*A Nacho*

---

# RESÚMENES

---



## RESUMEN

La **alfalfa** (*Medicago sativa* L.), es una leguminosa forrajera con un importante contenido en proteína, siendo la más cultivada a nivel mundial. En esta especie, los contenidos protéicos se ven mermados por los procesos de crecimiento y los recursos utilizados por la planta en el proceso de floración. Por otro lado, la alfalfa contiene una concentración de taninos condensados (TCs o proantocianidinas, PAs) muy inferior a la requerida para subsanar el desorden digestivo del ganado rumiante que genera hinchamiento por gases de efecto invernadero (metano, CO<sub>2</sub>) o meteorismo y la excesiva desaminación de las proteínas en el rumen producida por las fermentaciones de la flora microbiana ruminal. Estas carencias nutricionales tienen un efecto negativo sobre el rendimiento productivo de los animales. Los avances producidos en la modificación genética de plantas en los últimos años han proporcionado evidencia convincente de que estas tecnologías pueden complementar e implementar los programas de mejora de determinadas especies cultivadas difíciles de mejorar mediante métodos convencionales, como es el caso de la alfalfa.

El objetivo general de esta Tesis es desarrollar herramientas moleculares de utilidad para la manipulación genética de determinados caracteres de interés agronómico en la alfalfa, con objeto de incrementar su valor nutricional. Para ello, hemos puesto a punto un protocolo de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* vía embriogénesis somática aplicable a varios genotipos de alfalfa, que permite la producción de embriones viables capaces de germinar y producir plantas completas en el 50% de los explantes inoculados. Prácticamente no se detectó la presencia de quimeras o escapes, ya que el 80-100% de las plantas obtenidas contenían el T-DNA con todos los transgenes incorporados, disponiéndose por tanto de la herramienta imprescindible para la realización de los otros dos objetivos.

Hemos aislado dos ortólogos del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* de alfalfa (*MstFL1c* y *MstFL1a*). Ambos genes se sobreexpresaron constitutivamente en *A. thaliana* y después en alfalfa para su posible uso como herramienta biotecnológica para la mejora del valor nutricional de este forraje, produciendo un retraso en el tiempo de floración y con ello un posible aumento del desarrollo vegetativo. *MstFL1a* extiende la fase vegetativa e inflorescente y retrasa la floración en *Arabidopsis*. En alfalfa su expresión constitutiva también produce retraso de la floración. Sin embargo, a este fenotipo no se le asocia un incremento del desarrollo vegetativo, presentando las plantas un tamaño más reducido que parece vinculado a una limitación en la proliferación celular. Esto conlleva a una disminución de la biomasa. La validación completa de esta herramienta biotecnológica requerirá de trabajos adicionales para la evaluación de otros parámetros que determinen la calidad nutricional de estas plantas. Hemos comprobado que la limitación en la proliferación celular se asocia a una reducción en los niveles de expresión de determinados genes efectores de la división celular, como es el caso de las ciclinas. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los genes *TFL1*-like podrían participar adicionalmente en vías de señalización que regulan la diferenciación celular en plantas. *M. sativa* podría ser un buen modelo para estudiar la posible gama de diversificación bioquímica de estas proteínas.

Por otra parte, hemos realizado una construcción multigénica mediante el sistema de clonaje por módulos GoldenBraid 2.0 (35S::*Del*::*Ros1*::*MtANR*::*MtLAR*). Inicialmente, se ha validado su funcionalidad mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Además, se ha introducido de manera estable en dos modelos experimentales: *A. thaliana* y *N. tabacum*, y en *M. sativa*, donde se ha estudiado su capacidad de integración, así como la de expresión de los transgenes. Hemos comprobado que esta construcción multigénica es capaz de activar la ruta de biosíntesis de antocianinas y de PAs en *N. tabacum*. Sin embargo, no fue capaz de activar la ruta de biosíntesis de antocianinas y por tanto, la de PAs, en alfalfa. Los factores transcripcionales *Delila* y *Rosea1* no fueron capaces de activar los genes implicados en la regulación de ambas vías metabólicas en esta especie, o alternativamente no fueron suficientes sus niveles de expresión para este fin. Por tanto, la construcción multigénica 35S::*Del*::*Ros1*::*MtANR*::*MtLAR* no es una buena herramienta biotecnológica que procure la activación de la ruta de biosíntesis de PAs en la alfalfa. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos de control transcripcional de la biosíntesis de antocianinas y PAs son diferentes entre las distintas especies, y que se necesita información genética adicional específica de la biosíntesis de antocianinas y PAs en leguminosas para poder diseñar eficientemente herramientas moleculares que puedan activar su biosíntesis *de novo*.

## SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), is a forage legume with a significant content of protein, being the most widely cultivated forage around the world. In this species, the protein content decreased during growth processes as well as other resources used by the plant during the flowering process. On the other hand, alfalfa contains a lower concentration of condensed tannins (CTs or Proanthocyanidins, PAs), less than required to remedy the digestive disorder of ruminant livestock causing pasture bloat by production of greenhouse gases (methane, CO<sub>2</sub>) as result of the microbial fermentation in the rumen and the excessive desamination of proteins in the rumen produced by microbial fermentations (by-pass effect). These defects on nutrition are reflected in the yield and production of ruminants. The advances in genetic modification of plants in recent years have provided convincing evidence that these technologies can complement and implement breeding programs of certain cultivated crop species difficult to improve by conventional methods, as it is the case of alfalfa.

The overall objective of this thesis is to develop molecular tools useful for genetic manipulation of certain traits of agronomic interest in alfalfa, to enhance their nutritional value. At a first step, we have developed an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocol via somatic embryogenesis applicable to various genotypes of alfalfa to produce viable embryos in the 50% of the inoculated explants. Chimaeric plants or scapes were almost not detected because the 80-100 % of the transgenic plants contained the T-DNA with all the transgenes incorporated, having thus the indispensable tool to perform the other two objectives.

We have isolated two orthologs of the *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* gene from alfalfa (*MsTFL1c* and *MsTFL1a*). Both genes were constitutively expressed in *A. thaliana*, and later on in alfalfa, to evaluate their possible use as biotechnological tool for the improvement of the nutritional value of this forage legume, producing a delay in the flowering time and thereby an increase of vegetative development. *MsTFL1a* performs the same functions as *TFL1* in *Arabidopsis* and its overexpression in this plant produces a remarkable delay of flowering time. In alfalfa, its constitutive expression also produces a delay in flowering. However, this phenotype was not associated to an increase of vegetative growth, being plants of reduced size that appears tied to a limitation in cell proliferation. This leads to a decrease in biomass. The complete validation of this biotechnological tool will require additional works for the evaluation of other parameters to determine the nutritional quality of the plants. Moreover, the limitation in cell proliferation was associated with a reduction in the expression levels of certain cell division effector genes, as it is the case of cyclins. Our results support the hypothesis that *TFL1*-like genes could also participate in signaling pathways that regulate cell differentiation in plants. *M. sativa* could be a good model to study the possible range of biochemical diversification of these proteins.

On the other hand, we have made a multigenic construct in the modular cloning system GoldenBraid 2.0 (35S::*Del*::*Ros1*::*MtANR*::*MtLAR*). In a first step, it was functionally validated by transient expression in *N. benthamiana*. In addition, this construct was introduced by stable transformation in two experimental models (*A. thaliana* and *N. tabacum*) and later on in *M. sativa*, where it has been studied the integration capacity and expression levels of the different transgenes. In *N. tabacum* it has been achieved the activation of both the anthocyanin and PAs biosynthetic pathways. However, it was not able to activate both routes in alfalfa. The TFs *Delila* and *Rosea1* were not able to activate the genes involved in the regulation of these metabolic pathways in alfalfa, or were not sufficient levels of expression of both TFs for this purpose. Therefore, the multigenic construct 35S::*Del*::*Ros1*::*MtANR*::*MtLAR* does not resulted a good biotechnological tool for the activation of PAs biosynthesis in alfalfa. Our results suggest that the mechanisms of transcriptional control of both biosynthetic pathways could be different between plant species, and that additional specific genetic information on the anthocyanin and PAs biosynthesis in legumes is needed to efficiently activate both pathways in this species.

## RESUM

L'alfals (*Medicago sativa* L.), és una lleguminosa farratgera amb un important contingut en proteïna, sent la més cultivada a nivell mundial. En aquesta espècie, els continguts proteics es veuen desfavorits amb els processos de creixement i els requeriments utilitzats per la planta en el procés de floració. D'altra banda, l'alfals conté una concentració de tanins condensats (TCs o proantocianidines, PAs) molt inferior a la requerida per a esmenar el desordre digestiu del bestiar remugant que genera unflament per gasos o meteorisme i la producció de gasos d'efecte hivernacle (metà, CO<sub>2</sub>) i l'excessiva desaminació de les proteïnes en el rumen produïda per les fermentacions de la flora microbiana ruminal. Aquests efectes sobre la nutrició es veuen reflectits en el rendiment productiu dels animals. Els avanços produïts en la modificació genètica de plantes en els últims anys han proporcionat evidència convincent de què estes tecnologies poden complementar i implementar els programes de millora de determinades espècies cultivades difícils de millorar per mitjà de mètodes convencionals, com és el cas de l'alfals.

L'objectiu general d'aquesta Tesi és desenvolupar ferramentes moleculars d'utilitat per a la manipulació genètica de determinats caràcters d'interès agronòmic en l'alfals, a fi d'incrementar el seu valor nutricional. Per a això, hem posat a punt un protocol de transformació mediada per *Agrobacterium tumefaciens* via embriogènesi somàtica aplicable a diversos genotips d'alfals que permet la producció d'embrions viables capaços de germinar i produir plantes completes en el 50% dels explants inoculats. Pràcticament no es va detectar la presència de quimeres o fugues, ja que el 80-100 % de les plantes obtingudes contienien el T-DNA amb tots el transgens introduïts, tenint per tant la ferramenta imprescindible per a la realització dels altres dos objectius.

Es van aïllar i sobreexpressar constitutivament dos ortòlegs del gen *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) d'alfals (*MtTFL1c* i *MtTFL1a*) en *A. thaliana* i en alfals per al seu possible ús com a ferramenta biotecnològica per a la millora del valor nutricional de l'alfals, procurant així un retard en el temps de floració i amb això un augment del desenvolupament vegetatiu. *MtTFL1a* estén la fase vegetativa i inflorescent i retarda la floració en *Arabidopsis*. En alfals la seua expressió constitutiva també produïx retard de la floració. No obstant això, a aquest fenotip no se li associa un increment del desenvolupament vegetatiu, sent les plantes d'una grandària més reduït que pareix vinculat a una limitació en la proliferació cel·lular. Açò comporta a una disminució de la biomassa. La validació completa d'esta ferramenta biotecnològica requerirà de treballs addicionals per a l'avaluació d'altres paràmetres que determinen la qualitat nutricional d'aquestes plantes. Hem comprovat que la limitació en la proliferació cel·lular s'associa a una reducció en els nivells d'expressió de determinats gens efectors de la divisió cel·lular, com és el cas de les ciclines. Els nostres resultats recolzen la hipòtesi que els gens *TFL1*-like podrien participar adicionalment en vies de senyalització que regulen la diferenciació cel·lular en plantes. *M. sativa* podria ser un bon model per a estudiar la possible varietat de diversificació bioquímica d'aquestes proteïnes.

D'altra banda, hem realitzat una construcció multigènica per mitjà del sistema de clonatge per mòduls GoldenBraid 2.0 (*35S::Del::Ros1::MtANR::MtLAR*). S'ha validat funcionalment de manera preliminar per mitjà d'expressió transitòria en *N. benthamiana*. A més, s'ha introduït de manera estable en tres models experimentals: *A. thaliana*, *N. tabacum* i *M. sativa*, en els que s'ha estudiat la seua capacitat d'integració, així com la d'expressió. Hem mostrat que aquesta construcció multigènica és capaç d'activar la ruta de biosíntesi d'antocianines i de PAs en *N. tabacum*. No obstant això, no van ser capaços d'activar la ruta de biosíntesi d'antocianines i per tant, la de PAs, en alfals. Els factors transcripcionals *Dellila* i *Rosea1* no són capaços d'activar els gens implicats en la regulació d'ambdues vies metabòliques en aquesta espècie, o alternativament no van ser prou els seus nivells d'expressió per a este fi. Per tant, la construcció multigènica *35S::Del::Ros1::MtANR::MtLAR* no és una bona ferramenta biotecnològica per activar la ruta de biosíntesi de PAs en l'alfals. Els nostres resultats suggerixen que els mecanismes de control transcripcional de la biosíntesi d'antocianines i PAs són diferents entre les distintes espècies, i que es necessita informació genètica addicional específica de la biosíntesi d'antocianines i PAs en lleguminoses per a poder abordar eficientment ferramentes moleculars que puguen activar la seua biosíntesi *de novo*.



## ÍNDICE

	<b>ABREVIATURAS</b> .....	VII
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.	Las leguminosas: alta diversidad e importancia agronómica .....	3
2.	La alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.) .....	5
2.1.	Origen de la alfalfa .....	5
2.2.	Botánica y características morfológicas de la alfalfa .....	6
2.3.	Distribución geográfica de la alfalfa .....	9
2.4.	El cultivo de la alfalfa en España .....	11
2.5.	Beneficios del consumo de alfalfa.....	13
3.	Biología y mejora genética de especies forrajeras: el caso de la alfalfa .....	14
3.1.	Interés del retraso de la floración en leguminosas forrajeras .....	16
3.1.1.	Control de la transición floral en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
3.1.1.1.	Control de la iniciación floral en <i>Arabidopsis</i> . Genes de identidad de meristemo floral .....	19
3.1.1.2.	<i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> es un regulador negativo de la iniciación floral en <i>Arabidopsis</i> .....	20
3.1.1.2.1.	<i>TFL1</i> y el desarrollo de la inflorescencia en <i>Arabidopsis</i> .....	21
3.1.1.2.2.	La proteína TFL1 .....	23
3.1.1.2.3.	Ortólogos de <i>TFL1</i> en leguminosas.....	25
3.2.	Interés de la biofortificación de cultivos forrajeros: producción <i>de novo</i> de antocianinas y acumulación de proantocianidinas (taninos condensados) en alfalfa .....	27
3.2.1.	Biosíntesis de proantocianidinas (PAs) .....	27
3.2.1.1.	Las PAs como potenciales nutraceuticos .....	32
3.2.1.2.	Interés de activar <i>de novo</i> la biosíntesis de antocianinas y PAs en la alfalfa.....	34
3.2.2.	Aproximaciones realizadas para intentar la activación de la ruta de antocianinas y PAs en alfalfa.....	39
3.3.	GOLDENBRAID 2.0: un interesante sistema de ensamblaje multigénico por módulos .....	41
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
1.	Material biológico .....	49
1.1.	Material vegetal .....	49
1.1.1.	Condiciones de cultivo de las plantas .....	49
1.1.1.1.	Cultivo de <i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago truncatula</i> .....	49
1.1.1.2.	Cultivo de <i>Nicotiana benthamiana</i> en maceta .....	50
1.1.1.3.	Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en macetas.....	51

1.2.	Microorganismos .....	51
1.2.1.	Cepas bacterianas .....	51
1.2.2.	Condiciones de cultivo de los microorganismos.....	51
1.2.3.	Medios de cultivo para microorganismos.....	51
2.	Procesamiento de material vegetal para microscopía .....	52
2.1.	Fijación de tejido vegetal.....	52
2.2.	Inclusión de tejido vegetal en parafina.....	52
2.3.	Procesamiento de las muestras incluidas en parafina.....	53
3.	Técnicas de fotografía y microscopía .....	53
3.1.	Fotografía digital.....	53
3.2.	Microscopía .....	53
3.2.1.	Microscopía estereoscópica .....	53
3.2.2.	Microscopía óptica .....	54
3.2.3.	“Software” empleado para el tratamiento de imágenes.....	54
4.	Métodos de biología molecular .....	54
4.1.	Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos .....	54
4.1.1.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	54
4.1.2.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	54
4.1.3.	Aislamiento y cuantificación de DNA genómico .....	55
4.1.4.	Aislamiento del RNA total .....	56
4.2.	Métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	56
4.2.1.	Amplificación de fragmentos de DNA .....	56
4.2.2.	Transcripción reversa (RT) .....	57
4.2.3.	RT-PCR semicuantitativa.....	57
4.2.4.	RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....	58
4.2.5.	Purificación de fragmentos de DNA por producto de PCR.....	59
4.3.	Técnicas de clonación .....	61
4.3.1.	Vectores plasmídicos utilizados.....	61
4.3.2.	Ligación de fragmentos mediante la técnica de recombinación homóloga Gateway (Invitrogen™) .....	61
4.3.3.	Reacciones de ligación de DNA .....	62
4.3.4.	Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	62
4.3.5.	Sistema de clonaje múltiple: GoldenBraid (GB) .....	62
4.3.5.1.	Clonaje de piezas modulares.....	62
4.3.5.2.	Reacción de ensamblaje de piezas modulares por GB: digestión-ligación .....	63
4.3.5.3.	Domesticación de las piezas .....	63
4.3.5.4.	Ensamblaje multipartito: promotor (PR) + CDS + Terminador (TM).....	66
4.3.5.5.	Ensamblaje binario .....	68
4.4.	Transformación de cepas bacterianas .....	69

4.4.1. Selección de recombinantes bacterianos .....	70
4.5. Secuenciación .....	70
4.5.1. Análisis de secuencias.....	71
4.6. Análisis de la actividad GUS .....	71
5. Transformación genética de plantas.....	72
5.1. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas de <i>Medicago sativa</i> .....	72
5.1.1. Solución mineral y vitamínica del medio de propagación clonal <i>in vitro</i> (SH10b).....	72
5.1.2. Obtención de réplicas por estaquillado.....	72
5.1.3. Poda de las plantas transgénicas para fenotipado.....	75
5.1.4. Evaluación del nivel de ploidía.....	76
5.1.5. Caracterización morfológica de las líneas transgénicas de <i>Medicago sativa</i> 35S:: <i>MsTFL1a</i> .....	76
5.1.5.1. Caracterización macroscópica.....	76
5.1.5.2. Caracterización microscópica .....	78
5.1.6. Evaluación de la ruta de biosíntesis de flavonoides .....	83
5.1.6.1. Extracción y cuantificación de PAs solubles por DMACA .....	83
5.1.6.2. Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de Masas (MS).....	84
5.1.6.2.1. Análisis directo.....	84
5.1.6.2.2. Análisis por floroglucinolisis .....	85
5.1.6.3. Reacción Bate-Smith .....	86
5.2. Transformación transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	86
5.3. Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
5.3.1. Selección de transformantes .....	88
5.4. Transformación estable de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	88
5.4.1. Cultivo de explantes primarios.....	88
5.4.2. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	88
5.4.3. Cocultivo y lavado de explantes .....	89
5.4.4. Inducción de organogénesis .....	89
5.4.5. Aclimatación de plantas en invernadero.....	89
5.4.6. Soluciones y medios de cultivo utilizados.....	90
5.4.6.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962) .....	90
5.4.6.2. Solución vitamínica .....	90
5.4.6.3. Medios de cultivo para transformación estable de <i>N. tabacum</i> .....	91
5.4.6.4. Medios de cultivo estándar .....	92
6. Análisis estadístico.....	92
<b>IV. CAPÍTULO I: Diseño de una metodología eficiente para la transformación genética de la alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>

1.	Elección del genotipo de alfalfa, de la estirpe de <i>Agrobacterium</i> y del agente de selección de transformantes .....	96
1.1.	Selección del genotipo de alfalfa para los ensayos de transformación .....	96
1.2.	Elección de la estirpe de <i>Agrobacterium</i> más infectiva para la alfalfa y del agente de selección de transformantes .....	96
2.	Protocolo detallado para la transformación genética estable de alfalfa mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	99
2.1.	Germinación de semillas de alfalfa .....	99
2.2.	Preparación del inóculo de <i>A. tumefaciens</i> AGL1 .....	99
2.3.	Preparación de los explantes de hoja de alfalfa (cvs. Regen-SY 27, RSYD4) .....	100
2.4.	Disección de las hojas trifoliadas e infección .....	101
2.5.	Inducción de callos embriogénicos y selección de transformantes .....	102
2.6.	Desarrollo y germinación de embriones para producir plántulas .....	104
2.7.	Aclimatación de plantas a condiciones de invernadero .....	106
3.	Ensayos de GUS para el seguimiento del protocolo de transformación .....	108
4.	Evaluación de la eficiencia del protocolo de transformación .....	110
	<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO I</b> .....	113
	Puesta a punto de un protocolo de transformación mediante embriogénesis somática en <i>M. sativa</i> .....	115
V.	<b>CAPÍTULO II: Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen <i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> de <i>M. sativa</i> para su posible uso como herramienta biotecnológica para retrasar el tiempo de floración en la alfalfa</b> .....	121
	<b>RESULTADOS</b> .....	123
1.	Aislamiento de los ortólogos de <i>TFL1</i> de <i>M. sativa</i> . Diseño de construcciones y obtención de plantas con ganancia de función .....	123
1.1.	Aislamiento de los ortólogos de <i>TFL1</i> de <i>M. sativa</i> .....	123
1.2.	Sobreexpresión de <i>MsTFL1a</i> y <i>MsTFL1c</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	124
2.	Sobreexpresión del gen <i>MsTFL1a</i> en <i>M. sativa</i> .....	130
2.1.	Obtención y caracterización de las plantas transgénicas .....	130
2.2.	Análisis del nivel de expresión de <i>MsTFL1a</i> en las plantas transgénicas T1 .....	131
2.3.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas <i>35S::MsTFL1a</i> .....	134
2.3.1.	Características del desarrollo reproductivo .....	134
2.3.1.1.	Tiempo de floración .....	134
2.3.1.2.	Arquitectura de la inflorescencia .....	136
2.3.1.3.	Morfología de la flor .....	138
2.3.2.	Características del desarrollo vegetativo .....	139
2.3.2.1.	Crecimiento y desarrollo vegetativo .....	139
2.3.2.2.	Altura de las plantas .....	140
2.3.2.3.	Longitud de los entrenudos .....	141

2.3.2.4. Tamaño de las hojas.....	142
2.3.2.5. Longitud del peciolo .....	143
2.3.2.6. Diámetro de los entrenudos.....	144
2.3.2.7. Biomasa .....	145
2.3.2.8. Crecimiento celular .....	146
2.3.2.8.1. Secciones transversales de tallos .....	147
2.3.2.8.2. Secciones longitudinales de tallos.....	151
2.3.2.8.3. Análisis de expresión de genes efectores del ciclo celular en en alfalfa .....	153
<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO II</b> .....	157
1. La expresión constitutiva de uno de los dos ortólogos de <i>TFL1</i> de alfalfa modifica el tiempo de floración y la arquitectura de la planta en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	159
2. <i>MsTFL1a</i> podría tener funciones adicionales en alfalfa a las descritas para <i>TFL1</i> en <i>A. thaliana</i> .....	160
3. Los genes <i>TFL1</i> -like podrían participar en vías de señalización que regulan la diferenciación celular en plantas.....	161
4. Los genes <i>TFL1</i> -like podrían afectar al crecimiento independientemente de la transición floral.....	164
5. Abordaje futuro para la comprensión de la posible gama de diversificación bioquímica de las proteínas codificadas por los genes CETS de <i>M. sativa</i> .....	165
6. Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen <i>TERMINAL FLOWER 1</i> ( <i>TFL1</i> ) en <i>Medicago sativa</i> para su posible uso como herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa.....	167
<b>VI. CAPÍTULO III: Diseño de construcciones multigénicas en el sistema GoldenBraid 2.0 y validación funcional en sistemas modelo para activar de novo la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas. Validación de su uso como posible herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa</b> .....	169
<b>RESULTADOS</b> .....	171
1. Diseño de la construcción para la expresión constitutiva de <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> en el sistema GoldenBraid 2.0.....	171
1.1. Domesticación de piezas y construcción de módulos.....	171
1.1.1. Domesticación de piezas.....	171
1.1.2. Construcción de módulos .....	176
1.1.2.1. Construcción del módulo: 35S:: <i>Delila</i> ::T35S-35S:: <i>Rosea1</i> :: T35S-35S:: <i>MtANR</i> ::T35S-35S:: <i>MtLAR</i> ::T35S .....	176
2. Validación funcional de la construcción <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> mediante expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	181
2.1. Ensayos de expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .....	181
2.2. Detección y cuantificación de PAs en las hojas agroinfiltradas de <i>N. benthamiana</i> .....	185

3.	Validación de la construcción multigénica <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> por transformación estable.....	187
3.1.	Ensayos en <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> y <i>Medicago sativa</i> .....	187
3.2.	Validación de la construcción multigénica <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> en <i>A. thaliana</i> .....	188
3.2.1.	Caracterización de las plantas transgénicas .....	190
3.3.	Validación de la construcción multigénica <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> en <i>N. tabacum</i> .....	192
3.3.1.	Caracterización de las plantas transgénicas.....	194
3.3.2.	Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas T1 de <i>N. tabacum</i> .....	197
3.3.3.	Detección y cuantificación de PAs .....	199
3.4.	Validación de la construcción multigénica <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> en <i>M.sativa</i> .....	203
3.4.1.	Caracterización de las plantas transgénicas de <i>M. sativa</i> .....	203
3.4.2.	Detección de PAs en hojas de plantas transgénicas de <i>M. sativa</i> .....	207
	<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO III</b> .....	211
1.	Validación funcional de la construcción multigénica 35S:: <i>Delila- Rosea1-MtANR-MtLAR</i> en <i>N. benthamiana</i> .....	214
2.	La capacidad de integración de los transgenes de la construcción 35S:: <i>Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR</i> así como sus niveles de expresión varía según la especie.....	214
3.	Diferencias en la activación de la ruta de biosíntesis de antocianinas y PAs entre <i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i> y <i>M. sativa</i> .....	218
4.	La elucidación de los mecanismos moleculares que determinan la especificidad de regulación de la ruta de biosíntesis de PAs en alfalfa, es un requisito previo para la manipulación de la misma mediante ingeniería genética .....	221
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	225
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	231

**ABREVIATURAS**

°C	grado Celsius
μM	micromolar
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
AEFA	Asociación Española de Fabricantes de Alfalfa Deshidratada
Av	anillo vascular
Ca	calcio
CaMV35S	promotor 35S del virus del mosaico de coliflor
cDNA	DNA complementario
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
Col	Columbia
Ct	ciclo umbral
CTs	taninos condensados
cv.	cultivar
dap	días después de la polinización
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DIR	directo
DMACA	reactivo p-dimetilaminocinamaldehido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DM	materia seca
E8	promotor específico de fruto
EDTA	ácido etilendiaminetetracético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fe	hierro
FV	valor alimenticio
FAE	Formaldehído/Ácido acético glacial/Etanol
g	gramo
GB	método de construcción de DNA por módulos (Goldenbraid)
g/l	gramo por litro
GPM	grado medio de polimerización
h	hora
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
hptII	higromicina fosfotransferasa
IBA	ácido indolbutírico

---

IM	meristemo intercalar
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
K	potasio
kb	kilobase
kg/ha	kilogramos por hectárea
Kv	kilovoltio
LB	Luria Bertoni (Medio de cultivo bacteriano)
m	metro
M	molar
m <sup>2</sup>	metro cuadrado
m <sup>3</sup> /ha	metros cúbicos por hectárea
mm	milímetro
mm <sup>2</sup>	milímetros cuadrado
MES	tampón ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
MI	meristemo inflorescente
ml	mililitro
Mg	magnesio
mg	miligramo
mg/l	miligramo por litro
min	minuto
mM	milimolar
Mn	manganeso
Na	sodio
NAA	ácido naftalenacético
ng	nanogramo
nptII	neomicina fosfotransferasa
NV	valor nutritivo
OD	densidad óptica
P	fósforo
PAs	proantocianidinas
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
ppt	DL-fosfinotricina (BASTA)
q/ha	producción por hectárea
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
REV	reverso
RM	zona medular del meristemo apical del tallo
RNA	ácido ribonucleico
r.p.m	revoluciones por minuto

RR	roundup ready
SAM	meristemo apical del tallo
SDS	dodecil sulfato sódico
T1	transformantes primarios
T-DNA	DNA de transferencia
TFs	factores transcripcionales
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión estimada
Tnt1	inserciones de retrotransposon
TRIS	TRIS (hidroximetil) aminometano
uidA	gen reportero β-glucoronidasa (GUS)
UV	ultravioleta
VFI	forraje comida voluntariamente por el ganado (“voluntary feed intake”)
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus
WT	ecotipo silvestre
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
Z	zinc



---

# **INTRODUCCIÓN**

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. Las leguminosas: alta diversidad e importancia agronómica

Las leguminosas (Fabaceae), con más de 750 géneros y 16.000-17.000 especies son la tercera familia más grande de plantas angiospermas (Allen y Allen 1981). Estas plantas crecen en condiciones agro-ecológicas muy variables y su morfología varía desde diminutas hierbas hasta árboles gigantes. Las leguminosas son un grupo de plantas con gran interés nutricional y económico en el contexto de la agricultura mundial.

Los taxónomos han dividido a las leguminosas en tres grandes subfamilias basándose en rasgos morfológicos, particularmente de la estructura floral. Estas subfamilias se conocen como Papilionoideae (476 géneros y cerca de 14.000 especies), Caesalpinioideae (162 géneros y cerca de 3000 especies) y Mimosoideae (77 géneros y aproximadamente 3000 especies), (Doyle y Luckow 2003). Las Papilionoideae son la subfamilia numéricamente dominante y representan gran parte de las leguminosas económicamente importantes, especialmente en alimentación humana y animal, y comprenden aproximadamente el 40% de las variaciones fenotípicas de todas las leguminosas (Gepts *et al.* 2005). Esta subfamilia se divide en dos clados (Wojciechowski *et al.* 2004), conocidos como Hologalegina (leguminosas “de invierno” o “de clima templado”) y Millettioide (leguminosas “de verano” o “de clima tropical”). Se ha demostrado que existen altos niveles de sintenia a nivel genómico entre las especies de invierno, como *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y *Pisum sativum* (Kalo *et al.* 2004) o entre las especies de verano como *Phaseolus vulgaris* o *Glycine max* (Lee *et al.* 2001).

Entre las especies vegetales cultivadas, las leguminosas son las únicas plantas capaces de fijar el nitrógeno atmosférico mediante una relación endosimbiótica con bacterias del género *Rhizobium* o con micorrizas (Hirsch 2004; Jensen y Hauggaard-Nielsen 2003), la cual ocurre en una estructura especializada conocida como nódulo. Esta simbiosis provee a las leguminosas (y a los cultivos que se sembrarán tras ellas) de una fuente autónoma, gratuita y renovable de nitrógeno, que es el principal nutriente limitante en la producción de cultivos (Seastedt y Knapp 1993; Smil 1999; Vitousek *et al.* 1997). Además, el uso de leguminosas fijadoras de nitrógeno para producir proteína vegetal promueve la diversidad en la rotación de los cultivos

agrícolas y produce un descenso en las poblaciones de patógenos de plantas y de plagas, lo cual se traduce en un sustancial descenso en el consumo de combustibles fósiles, pesticidas y fertilizantes nitrogenados. Por tanto, las leguminosas son extraordinariamente importantes en el desarrollo de una agricultura sostenible.

Esta familia tiene un papel fundamental en la agricultura debido a su elevado contenido en proteínas. Las semillas de estas plantas presentan altos contenidos de proteína (entre 20% y 50%), conformando la mayor fuente de proteína vegetal para la alimentación humana y animal. Las leguminosas de grano por si solas aportan hasta el 33% de las necesidades proteicas de la dieta humana y pueden contener más de dos o tres veces más proteínas que los cereales (Graham y Vance 2003). Otra propiedad de las leguminosas que las hace especialmente interesantes es que sintetizan un gran número de productos secundarios con actividad biológica de interés, incluyendo isoflavonas y saponinas triterpénicas (Anderson *et al.* 1984; Grusak 2002; Madar y Stark 2002). Se ha descrito que el consumo regular de leguminosas puede ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, hepáticas, Parkinson, Alzheimer o Huntington (Singh *et al.* 2005; Singh *et al.* 2007).

Algunas especies de leguminosas han sido seleccionadas con el tiempo por los agricultores para ser cultivadas como forraje para el consumo animal. El número de leguminosas utilizadas como forrajes en el mundo no se conoce del todo, pero en la página web del repositorio de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO; [www.feedipedia.org](http://www.feedipedia.org)) hay una lista de 153 especies de leguminosas diferentes que se utilizan actualmente como forrajes. Esta lista proporciona una idea de la enorme diversidad de forrajes existentes en los diversos climas del planeta. Sin embargo, un menor número de especies tienen importancia económica a nivel global debido a sus cualidades nutritivas: *Medicago sativa* (alfalfa), *Trifolium repens* (trébol blanco), *Trifolium pratense* (trébol rojo), *Trifolium subterraneum* (trébol subterráneo) y *Lotus corniculatus* (Frame *et al.* 1998; Peyraud 2009; Stephenson 1984). Las leguminosas forrajeras han sido la base de la producción cárnica y láctea desde hace siglos (Russelle 2001). Sin embargo, además de los usos tradicionales como alimento y forraje, las leguminosas son una excelente fuente de madera y aceites y se han utilizado industrialmente para preparar plásticos biodegradables (Paetau *et al.* 1994), gomas, tintes, resinas, barnices y productos eco-amigables como el etanol o el diesel de soja (Singh *et al.* 2007).

Los niveles elevados de sintenia entre *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y muchas leguminosas económicamente importantes apoyan la elección de estas dos especies como plantas modelo para el estudio de esta familia. Estas plantas modelo, es especial *M. truncatula*, se están utilizando para buscar respuesta a cuestiones biológicas exclusivas de las leguminosas (Somers *et al.* 2003), como las bases moleculares que rigen la fijación de nitrógeno o las distintas rutas metabólicas que llevan a la producción de determinados metabolitos secundarios. *M. truncatula* ha llamado la atención como sistema modelo genómico y molecular para estudios biológicos de las leguminosas (Cook 1999; Oldroyd y Geurts 2001), debido a sus características peculiares: genoma pequeño (~500-550 MpB), que actualmente está completamente secuenciado, y diploide ( $2n=16$ ), ciclo de vida corto (2-3 meses), autofecundación, posibilidad de transformación genética y existencia de grandes colecciones de diferentes ecotipos (Young y Udvardi 2009). Para realizar genética reversa, *M. truncatula* tiene disponibles diferentes plataformas que proporcionan poblaciones mutagenizadas con inserciones del retrotransposón de tabaco *Tnt1* (Cheng *et al.* 2011; Tadege *et al.* 2008), de bombardeo rápido con neutrones (“Fast Neutrón Bombardment” o FNB; Starker *et al.* 2006) y TILLING (“Target-induced Local Lesions in Genomes”). También puede realizarse silenciamiento génico basado en RNA interferente (Limpens *et al.* 2004) y se están haciendo avances en el silenciamiento génico transitorio mediado por virus (“Virus Induced Gene Silencing” o VIGS; Gronlund *et al.* 2008) que actualmente está limitado en algunas especies por la escasez de vectores víricos específicos (Serwatowska *et al.* 2014). Lo más importante en el estudio de estas plantas modelo es la posibilidad de extender los conocimientos obtenidos a cultivos de interés agronómico.

## **2. La alfalfa (*Medicago sativa* L.)**

### **2.1. Origen de la alfalfa**

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa introducida en España desde la época de los árabes. Esta leguminosa procede de Irán, donde probablemente fue adoptada por el hombre durante la Edad del bronce para alimentar a los caballos procedentes de Asia Central. Según Plinio el Viejo, fue introducida en Grecia alrededor del 490 a.C., durante la Primera Guerra Médica, posiblemente en forma de semillas llegadas con el forraje de la caballería persa. Pasó a ser un cultivo habitual destinado a la alimentación de los caballos. A Estados Unidos llegaría a través de Chile, en torno

a 1860. De entre las diversas especies forrajeras cultivadas en el mundo, la alfalfa es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico y aportar una gran riqueza de fibra y proteína de calidad. Estas cualidades nutritivas la han hecho ser desde hace tiempo muy valorada por los agricultores y ganaderos, en este último caso para destinarla a la alimentación de sus ganados, especialmente rumiantes, y constituirse en casi imprescindible en la dieta de alguno de ellos.

## 2.2. Botánica y características morfológicas de la alfalfa

La alfalfa pertenece a la familia de las Fabáceas o Leguminosae y es autotetraploide, con un genoma de unas 800-900 Mpb. Se trata de una planta herbácea perenne, vivaz, alógama (no es autofértil, requiere de la visita de abejas para su fecundación cruzada) y de porte erecto o suberecto que alcanza un tamaño de 30-60 cm de altura según el genotipo estudiado. La alfalfa tiene un ciclo vital de entre cinco y doce años, dependiendo de la variedad utilizada. Además, desarrolla densas agrupaciones de pequeñas flores púrpuras y sus raíces suelen ser muy profundas, pudiendo medir hasta 4,5 metros. De esta manera, la planta es especialmente resistente a la sequía. Sus raíces poseen nódulos que contienen la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, produciendo alimento alto-proteico, sin importar el nitrógeno disponible en el suelo.

A continuación se detallan las principales características morfológicas de esta planta en cuanto a su raíz, tallo, hojas, flores y frutos:

**Raíz.** La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 4,5 m. de longitud) con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos (Figura 1).



**Figura 1. Planta completa de alfalfa tras la inducción floral.**

**Izquierda:** arquitectura del tallo con ramas laterales y hojas trifoliadas con bordes dentados. Se observan también las inflorescencias con flores de color azulado en la parte superior.

**Derecha:** corona de tallos en la base de la planta y raíz pivotante principal con numerosas raíces secundarias en los laterales.

**Inferior:** detalle de hoja trifoliada con bordes dentados.



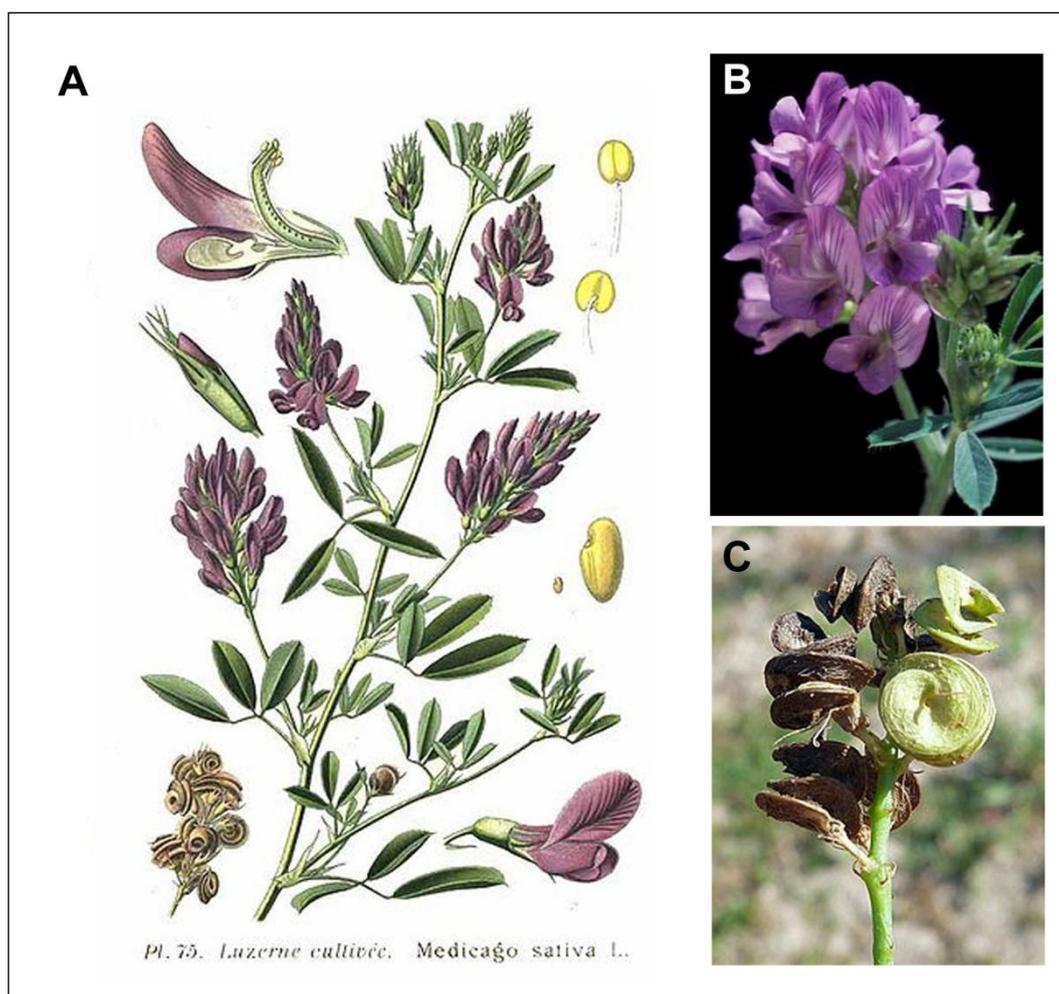
**Tallos.** El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. Son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. En su parte herbácea, presenta nudos desde donde nacen las hojas. No solo tiene crecimiento primario sino que también posee un crecimiento secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne, que forma parte de la corona. El número de los tallos depende de la edad y el vigor de la planta, y puede llegar hasta 20. El crecimiento de los tallos es inducido por su utilización (pastoreo o corte) o por un nuevo ciclo fisiológico de crecimiento. Además de su constitución morfológica, es conveniente resaltar la importancia funcional de la corona como estructura almacenadora de sustancias de reserva y sede de yemas a partir de las cuales se producirán los nuevos rebrotes de la planta, condicionando así las prácticas de manejo

del cultivo. El tamaño (pequeño, intermedio, grande) y el tipo (compacta o cerrada, intermedia, abierta) de la corona depende de factores genéticos y ambientales (Figura 1).

**Hojas.** Son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Se originan en el ápice del tallo. Posteriormente, cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales ubicadas en los nudos de los tallos. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados. Los folíolos de 5-20 mm de largo y 3-10 mm de ancho, son obovados o sublineales, dentados en el ápice, adpreso pubescentes. La hoja es entera o dentada en la base (Figura 1).

**Flores.** La flor característica de esta familia es la de la subfamilia Papilionoidea. Son de color azul, violeta o púrpura, con inflorescencias en racimos pedunculados que nacen en las axilas de las hojas, el pedúnculo es mucho más largo que el pecíolo. La flor tiene 5 sépalos en el primer verticilo, 5 pétalos (1 estandarte, 2 alas y 2 pétalos fusionados formando la quilla que recubre los órganos reproductivos) en el segundo verticilo, 9 estambres (antera + filamento) fusionados en un tubo estaminal y uno libre en el tercer verticilo, y un carpelo en el cuarto verticilo. La corola tiene unos 6-12 mm de largo. La arquitectura de la inflorescencia es indeterminada (Figura 2 A y B).

**Frutos.** Los frutos se disponen en espirales siniestras flojas de 1-4 giros, glabras a pilosas. Es una legumbre indehiscente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud (Figura 2 A y C).

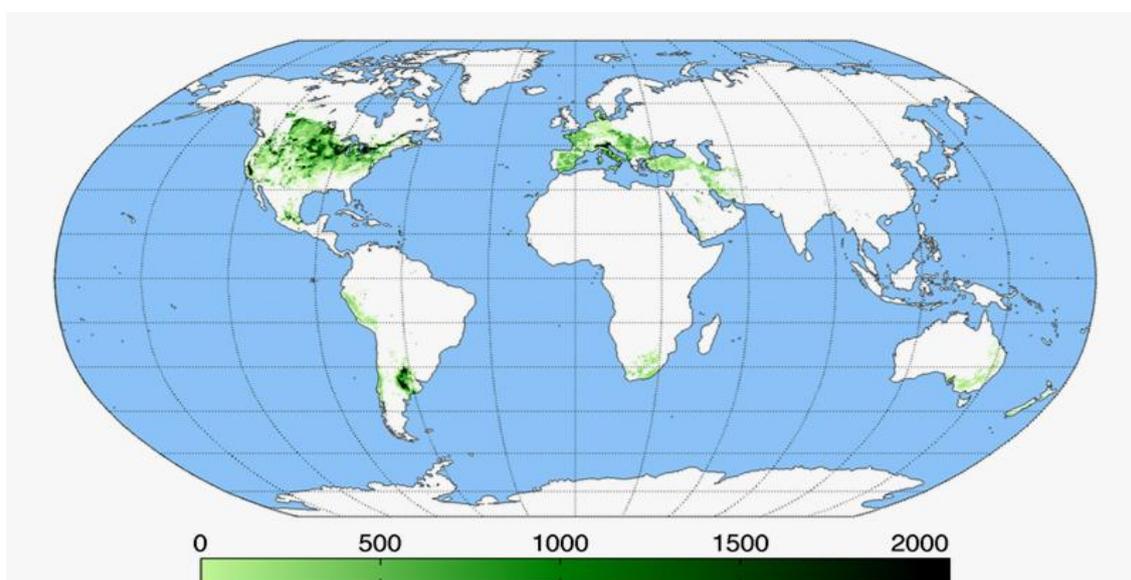


**Figura 2. Arquitectura de la inflorescencia de la alfalfa (*Medicago sativa* L.). (A).** Órganos vegetativos (hojas trifoliadas con bordes dentados), órganos florales, frutos en espiral y semillas. **(B).** Detalle de una inflorescencia con flores en anthesis. **(C).** Detalle de los frutos en hélice siniestra.

### 2.3. Distribución geográfica de la alfalfa

La ganadería intensiva ha demandado con el tiempo la producción de forma regular de forrajes y piensos que ha tenido que proveer la industria forrajera, dando lugar al cultivo intensivo de alfalfa y otras leguminosas forrajeras, cuya finalidad es la de abastecer a la creciente demanda industrial. La importancia del cultivo de la alfalfa va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales, a su contribución paisajística y a su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. También es importante señalar la significativa reducción energética que supone la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para los siguientes en las rotaciones de las que forma parte.

El cultivo de la alfalfa está muy extendido en los países de clima templado. La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Caúcaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa. Es una planta que se utiliza ampliamente como pasto o forraje para alimentar el ganado y con este propósito se cultiva intensivamente en el mundo entero. Por ser una especie pratense y perenne, su cultivo aporta elementos de interés como limitador y reductor de la erosión y de ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación. El mayor país productor de alfalfa en cuanto a quintales por hectárea (q/ha) cultivada es Estados Unidos (Figura 3), si bien España ocupa el segundo lugar en el mundo en cuanto a producción y exportación de alfalfa deshidratada. También ocupa el tercer lugar en cuanto a producción de alfalfa en la Unión Europea con una superficie de cultivo aproximada de 250.000 has y una producción de 965.000 toneladas, siendo dos tercios de regadío y uno de secano. (Fuente: Asociación Española de Fabricantes de Alfalfa Deshidratada, AEFA. 2014. <http://aefa-d.com/>).



**Figura 3. Distribución geográfica del cultivo de la alfalfa en el mundo.** La gama de colores verdes indica la producción (q/ha) en las distintas zonas señaladas.

## 2.4. El cultivo de la alfalfa en España

El cultivo de la alfalfa se ha extendido por toda España en los últimos años, ya que es poco exigente con el clima. En cuanto a suelos, prefiere los profundos de naturaleza caliza, siendo incompatible con los suelos ácidos. La superficie de cultivo está actualmente muy cercana a las 250.000 has, con especial peso en el Valle del Ebro y Castilla-León. Las hectáreas de cultivo vienen aumentando desde hace años en las zonas en las que la alfalfa se ha industrializado (plantas deshidratadoras).

Las siembras de la alfalfa en España se llevan a cabo en otoño (51%) y primavera (49%). Las primeras normalmente tras un cereal de invierno y las de primavera tras el maíz. El 95% de las mismas procede del ecotipo Aragón, y se utilizan dosis medias de semilla entre 30-35 kg/ha. La permanencia del cultivo puede ser de muchos años, no obstante la persistencia económica se sitúa en unos cinco años, siendo los de máximo rendimiento unitario el segundo y tercer año de cultivo. No es una planta muy exigente, habrá que aportarle fósforo y potasa en la cuantía de las extracciones del cultivo, y si el desarrollo nodular es el adecuado no necesitará de incorporación de abono nitrogenado. A la alfalfa le afectan pocas enfermedades y su mayor enemigo son las plagas (pulguilla, pulgones, gusano verde, cuca negra y apión), siendo la intensidad de los ataques muy variable según los años. Para combatirlas se usan cada vez más los métodos de lucha integrada, que permiten disminuir el número de tratamientos y la dosis de fitosanitarios.

El que sea España un país de baja pluviometría y con alto nivel de evapotranspiración, hace que la alfalfa sea un cultivo básicamente de regadío, ya que de no ser en zonas muy frescas la productividad en secano es baja. Así un 78% se cultiva en regadío y el resto en secano, existiendo Comunidades Autónomas en que casi el 100% se hace en regadío. En el caso del regadío el consumo medio de agua se sitúa en unos 7.000 m<sup>3</sup>/ha. La siega del cultivo se suele hacer cada 30-35 días, con 5 ó 6 cortes anuales, buscando el momento en que un 10% de las plantas se encuentran en floración, que es cuando se logra el mayor equilibrio entre la cantidad y la calidad. El volteado e hilerado se lleva a cabo trascurridas unas 24 horas con la finalidad de que en la recogida la humedad del producto sea lo más homogénea posible. El presecado en campo (horas entre siega y recogida), es variable dependiendo del destino; en el caso de ir a la deshidratación este será de unas 48 horas en verano y si el destino es el empacado para rama, este periodo se dilata hasta unos cinco o seis días. El sistema de recolección también es variable dependiendo del

destino, en el caso de ir para rama se utilizan empacadoras que la prensan en forma de prisma rectangular o redondo; si el destino es la industria deshidratadora la recogida se hace con carro picador en él 80% de la superficie y con picadora y remolque en el 20% restante. Los rendimientos en las zonas de cultivo más tradicionales pueden situarse entre 13 y 15 t/ha al 12% de humedad, siendo resaltable que la producción en la explotación es muy estable de un año a otro.



**Figura 4. Recolección y subproductos de alfalfa deshidratada. (A).** Campo de alfalfa en época de siega. **(B).** Balas cilíndricas de alfalfa tras su recolección para secado en campo (henificado). **(C).** Planta deshidratadora de forrajes (Palencia). **(D).** Pacas de alfalfa deshidratada. **(E).** Pellets de alfalfa deshidratada. **(F).** Tacos de alfalfa deshidratada.

La alfalfa se puede consumir fresca, ensilada, henificada o deshidratada, siendo estas dos últimas modalidades las más utilizadas. El henificado consiste en un secado natural dejando las balas o pacas al sol para que pierda humedad. La mayor parte de la producción se destina a la obtención de deshidratados en forma de pacas, pellets o tacos ya que es la mejor forma para su conservación y distribución al ganado en forma de piensos (Figura 4). Por esta razón, en los últimos años, se han creado muchas plantas deshidratadoras de forraje en España (unas 70), si bien el 85% del forraje tratado corresponde a alfalfa. La producción de forrajes deshidratados en 2014 fue de 965.000 toneladas que se distribuyen por todas las comunidades de España, representando la comunidad de Aragón junto con la Comunidad de Cataluña el 78% de la producción total. Las 70 plantas de secado o deshidratado de forrajes se localizan en las zonas de producción y cuentan con una alta tecnología de desarrollo e investigación reconocidas a nivel internacional (Fuente: Asociación Española de Fabricantes de Alfalfa Deshidratada, AEFA. <http://aefa-d.com/>).

## **2.5. Beneficios del consumo de alfalfa**

Además de su elevado contenido proteico, la alfalfa posee otras cualidades nutricionales y medicinales que también la posicionan como una planta de interés para el consumo humano, existiendo en la actualidad una importante cantidad de complementos alimenticios preparados a partir de extractos de alfalfa. La venta de germinados de alfalfa, que generalmente se añaden a ensaladas, también se ha incrementado en los últimos años. Por la cantidad de minerales (Ca, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn), vitaminas y aminoácidos que contiene se emplea para combatir la anemia. Es rica en vitaminas del complejo B y los brotes contienen también vitamina A y C. Por su contenido en vitamina D y calcio ayuda en casos de artritis y artrosis. Es también eficaz como diurética y para evitar formación de cálculos biliares. Contiene cantidades poco usuales de vitamina K (necesaria para coagular la sangre) y unos 0,5 g/kg DM de taninos condensados unidos a proteína que no suponen un problema para la palatabilidad del forraje al estar en muy baja concentración, aunque también supone una desventaja ya que los taninos previenen toda una serie de problemas digestivos que padece el ganado rumiante.

### 3. Biotecnología y mejora genética de especies forrajeras: el caso de la alfalfa

El cultivo de leguminosas forrajeras de calidad constituye una fuente segura de alimento para el ganado rumiante, evitando de esta manera los efectos negativos de su alimentación con piensos que muchas veces incorporan deshechos animales de dudosa procedencia y deficiente estado sanitario. Desde que se detectó la enfermedad de las “vacas locas” (encefalopatía espongiiforme bovina), una enfermedad causada por priones y transmisible al ser humano, la Unión Europea ha dedicado importantes inversiones en mejorar la calidad de los piensos destinados al ganado a base de incentivar los cultivos de leguminosas forrajeras, así como su mejora genética, con objeto de sustituir la proteína procedente de deshechos animales por la de origen vegetal.

La mejora tradicional de leguminosas forrajeras se ha basado principalmente en la selección fenotípica seguida de recombinación sexual de la variación genética natural encontrada dentro y entre los distintos ecotipos. Esta mejora se ha usado a lo largo de las últimas décadas pero está limitada a trabajar sólo con aquellos genes que están naturalmente presentes en la especie en cuestión o en otras relacionadas. Sin embargo, para mejorar muchos caracteres de interés agronómico, la variabilidad genética de estas especies puede resultar insuficiente o directamente inexistente. En estos casos, la ingeniería genética resulta una herramienta útil, dado que posibilita la incorporación de genes foráneos que incorporan caracteres novedosos. En este caso se encuentra la alfalfa (*Medicago sativa* L.), una leguminosa forrajera estrechamente relacionada con *M. truncatula*, que es un cultivo difícil de mejorar mediante métodos convencionales debido a su complicada genética. La alfalfa es autotetraploide ( $2n=4x=32$ ), presenta un alto grado de heterocigosidad y debido a su fecundación cruzada, la mayoría de los cultivares son poblaciones sintéticas con unos complicados antecedentes genéticos.

Se ha realizado un mapeo genético comparativo entre la leguminosa modelo *M. truncatula* y una variedad de alfalfa diploide (Regen-2x;  $2n=16$ ), se han mapeado varios cientos de marcadores comunes en ambos sistemas y se han comparado sus posiciones en el mapa. En ambas especies, se ha comprobado que los marcadores se distribuyen en 8 grupos y muestran elevados niveles de sintenia. Por tanto muchas de las herramientas genéticas y genómicas, incluyendo la secuenciación completa de su genoma, desarrolladas hasta la fecha para *M. truncatula* podrían ser utilizadas en la

alfalfa para así contribuir a su mejora genética. En anteriores proyectos del grupo hemos desarrollado una serie de herramientas moleculares y biotecnológicas en leguminosas modelo (*Pisum sativum* y *Medicago truncatula*), tales como el diseño de métodos para su transformación genética estable o la identificación de genes implicados en el proceso de floración, que pueden ser ahora utilizadas en objetivos más aplicados y dirigidos a la mejora genética de la alfalfa.

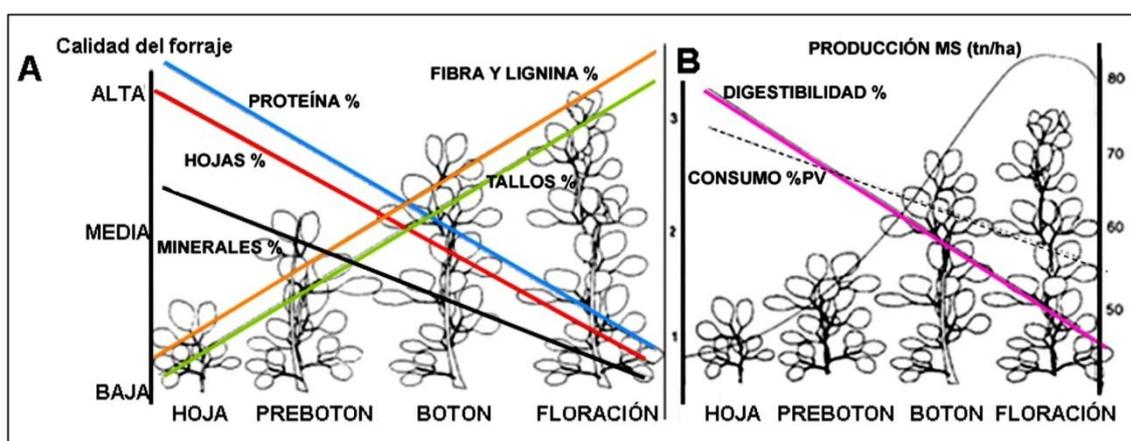
Los avances producidos en el campo de la modificación genética de plantas en los últimos años han proporcionado evidencia convincente de que estas tecnologías pueden complementar e implementar los programas de mejora de determinadas especies que son difíciles de mejorar mediante técnicas convencionales como es el caso de las leguminosas forrajeras. Dentro de este grupo sería particularmente interesante acometer programas de mejora aplicables a la alfalfa. Se han identificado diversas dianas de mejora de esta especie como por ejemplo: mejorar su valor nutritivo mediante la modificación de la biosíntesis de lignina para incrementar su digestibilidad en el ganado, modificar su contenido en taninos condensados para evitar el meteorismo en el ganado vacuno, incrementar la resistencia a enfermedades producidas por hongos y virus, modificar la presencia de alérgenos en el polen, retrasar la senescencia de la planta, retrasar su floración para incrementar su digestibilidad y su desarrollo vegetativo, etc.; si bien algunas de ellas no se han podido abordar con éxito debido a la falta de herramientas biotecnológicas adecuadas (Spangenberg 2001). Los abordajes biotecnológicos mediante el uso de la ingeniería genética requieren la disponibilidad de protocolos de transformación genética eficientes. Estos protocolos deben aplicarse a variedades de estudio para poder evaluar dichos abordajes y luego, extrapolar este sistema de estudio a otras variedades comerciales.

Las actuales variedades comerciales de alfalfa han sido obtenidas mediante programas de mejora convencional y han sido seleccionadas por presentar determinadas características de interés agronómico, como una mayor productividad, mejor tolerancia a plagas y enfermedades o más resistentes a estreses abióticos. La identificación de genes diana y el diseño de herramientas moleculares que puedan contribuir a la introducción de nuevos caracteres en estas variedades mejoradas de alfalfa mediante la modificación de algunas vías metabólicas o de determinados procesos de desarrollo, es primordial para abordar con éxito su mejora mediante técnicas de ingeniería genética o metabólica. La puesta a punto de protocolos eficientes para la transformación genética de esta especie forrajera, la identificación de

herramientas moleculares y la utilización de técnicas de ensamblaje multigénico que permitan la introducción simultánea de distintos transgenes para modificar un determinado proceso en la alfalfa, contribuirían en gran medida a su mejora biotecnológica.

### 3.1. Interés del retraso de la floración en leguminosas forrajeras

El declive del valor alimenticio en algunas especies forrajeras perennes, como la alfalfa, está asociado con el comienzo del crecimiento del tallo, la floración y la senescencia. En la alfalfa, el contenido en proteína de las hojas desciende durante la floración y los tallos se lignifican, siendo por tanto menos digeribles. En lo referente a calidad del forraje, no sólo se debe considerar el contenido de proteína sino también otros parámetros, como porcentajes de hoja, tallo, fibra, lignina, digestibilidad y consumo animal. Cortada en estados inmaduros, la alfalfa produce un forraje de mayor calidad pero se reduce significativamente su producción y persistencia. Estados muy maduros producen mayor cantidad de forraje pero de menor calidad, aunque se mejora la persistencia. Tanto los parámetros de calidad como los que definen la persistencia están íntimamente relacionados con los estados de madurez (Romero *et al.* 1995).



**Figura 5. Evolución de los componentes del forraje de alfalfa en relación con los estados de madurez. (A).** Según avanza el desarrollo de la planta, se produce un declive de su valor nutritivo. Un forraje de alta calidad está directamente relacionado con un alto contenido de hojas y bajo porcentaje de tallos. El contenido en proteína y minerales decrece según se acerca la floración mientras que el de lignina y fibra aumenta alcanzando su máximo durante la floración. **(B).** Con la madurez también disminuyen la digestibilidad del forraje y el consumo animal (Adaptado de Romero *et al.* 1995).

La evolución de los parámetros que determinan la calidad del forraje en relación con los estados de crecimiento se observa en la figura 5 (Romero *et al.* 1995). A medida que avanzan los estados de madurez disminuyen los porcentajes de proteínas y minerales, aumentando los componentes que reducen la calidad del forraje, como fibra (celulosa y hemicelulosa) y lignina (Figura 5 A). Con la madurez también disminuyen la digestibilidad del forraje y el consumo animal (Figura 5 B). Por tanto, un retraso en la transición del desarrollo vegetativo de la planta al reproductivo se podría traducir en un mayor crecimiento vegetativo (incremento de biomasa), un mayor contenido en proteína por planta y un incremento en la digestibilidad del forraje.

Para la elección de genes candidatos que permitiesen la manipulación del retraso de la transición floral en leguminosas forrajeras, resumiremos algunos aspectos bibliográficos referentes al control de la transición floral en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

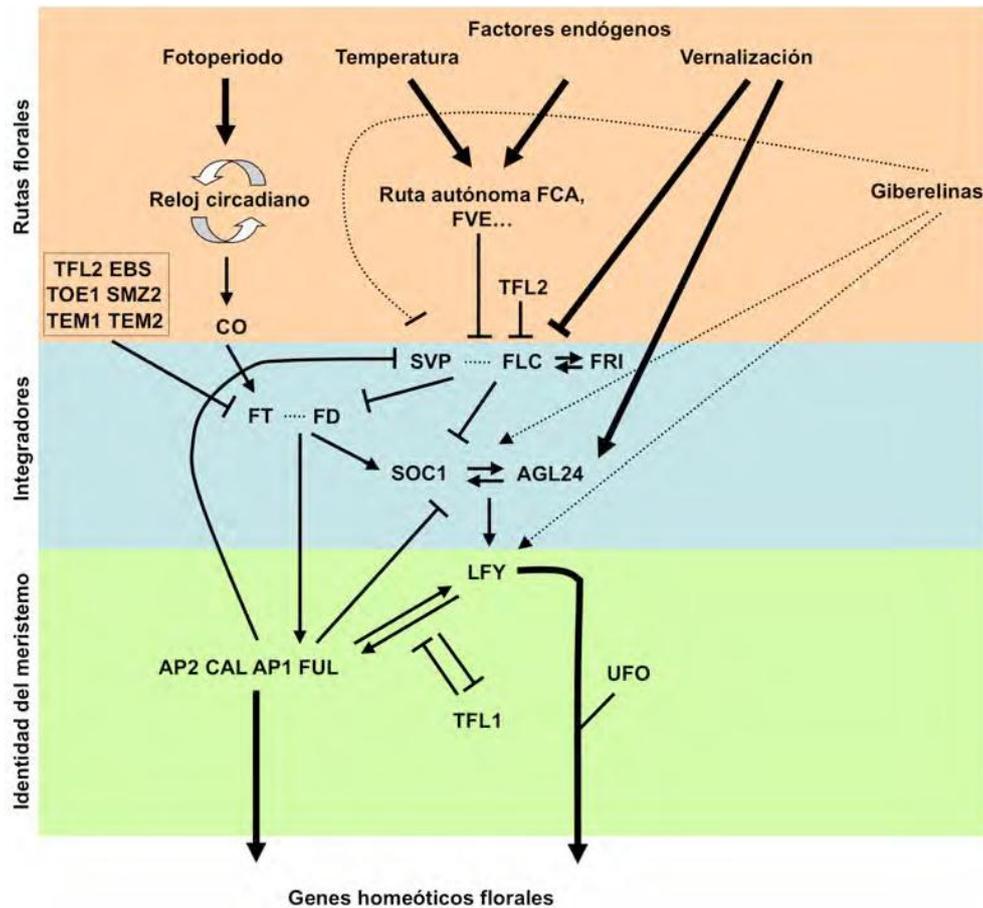
### **3.1.1. Control de la transición floral en *Arabidopsis thaliana***

Las plantas son organismos sésiles, es decir que nacen, crecen y se reproducen en un mismo emplazamiento. Al no disponer de la capacidad de desplazarse, han desarrollado a lo largo de su evolución una serie de mecanismo de respuesta a cambios ambientales basados en el desarrollo de vías alternativas para conseguir su principal objetivo: reproducirse. Un ejemplo claro de esta estrategia es el proceso de inducción floral para el que las plantas han desarrollado distintas rutas alternativas.

Los principales avances en el conocimiento de los mecanismos que controlan la transición, la iniciación y el desarrollo floral, se han obtenido utilizando como base de estudio la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En *Arabidopsis*, una planta facultativa de día largo, se han descrito cuatro rutas principales de las que depende la floración: la *ruta del fotoperíodo*, la *ruta de la vernalización*, la *ruta de las giberelinas* y la *ruta autónoma*. A éstas se han sumado posteriormente otras dos rutas: la *ruta de la temperatura ambiental* y la *ruta de la edad* (Amasino y Michaels 2010).

Las rutas del fotoperíodo y la vernalización controlan la floración en respuesta a los cambios estacionales en la duración del día y la temperatura, la ruta de la temperatura ambiental responde al aumento diario de la temperatura, y las rutas de la edad, autónoma y de las giberelinas actúan de forma más independiente a los estímulos medioambientales (Fornara *et al.* 2010). Estas rutas convergen en un grupo de genes

que integran la información (Moon *et al.* 2005) y regulan la expresión de los genes de identidad de meristemo floral, que dirigen el desarrollo de las flores (Irish 2010). En la figura 6 se incluye un esquema de las distintas rutas de inducción floral y de los genes implicados en el proceso de transición floral en *A. thaliana*.



**Figura 6. Control de la transición floral en Arabidopsis.** El esquema indica los principales genes implicados en la transición floral y las interacciones entre ellos. En Arabidopsis, la floración está regulada a través de cuatro rutas principales que perciben información procedente del ambiente y endógena de la planta: la ruta del fotoperiodo, la ruta autónoma, la ruta de la vernalización y la ruta de las giberelinas. Estas rutas convergen en un grupo de genes que integran esta información (*LFY*, *FT*, *SOC1*, *AGL24*, *FLC*, *SVP*) y regulan la expresión de los genes de identidad de meristemo floral (*AP1*, *LFY*), que dirigen el desarrollo de las flores. Asimismo, los genes de identidad de meristemo floral evitan la reversión a inflorescencia de los meristemos florales, reprimiendo en ellos la expresión de genes de identidad de meristemo inflorescente y de tiempo de floración (*AGL24*, *SOC1*, *SVP* y *TFL1*). →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa. Las líneas discontinuas entre *FT* y *FD*, y *SVP* y *FLC*, indican interacción proteína-proteína. La acción de las giberelinas sobre otros reguladores florales se indica mediante líneas punteadas. Imagen modificada a partir de Serrano-Mislata (2010).

### 3.1.1.1. Control de la iniciación floral en *Arabidopsis*. Genes de identidad de meristemo floral

Como se ha descrito en el apartado anterior, en *Arabidopsis* existen múltiples rutas que regulan la floración en respuesta a condiciones ambientales y endógenas (Sung *et al.* 2003). Esta información es transmitida al grupo de “genes integradores”, como *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1)* o *AGAMOSUS LIKE 24 (AGL24)*, (Figura 6), y estos actúan sobre los genes de identidad de meristemo floral, que desencadenan un nuevo programa de desarrollo que conduce a la formación de las flores.

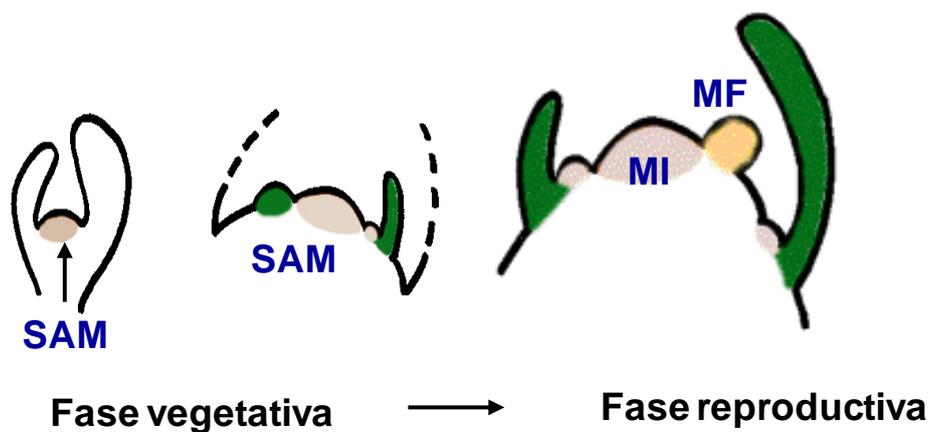


Figura 7. Esquema del desarrollo del meristemo inflorescente (MI) y floral (MF) en *A. thaliana* una vez realizada la transición floral. SAM: meristemo apical del tallo.

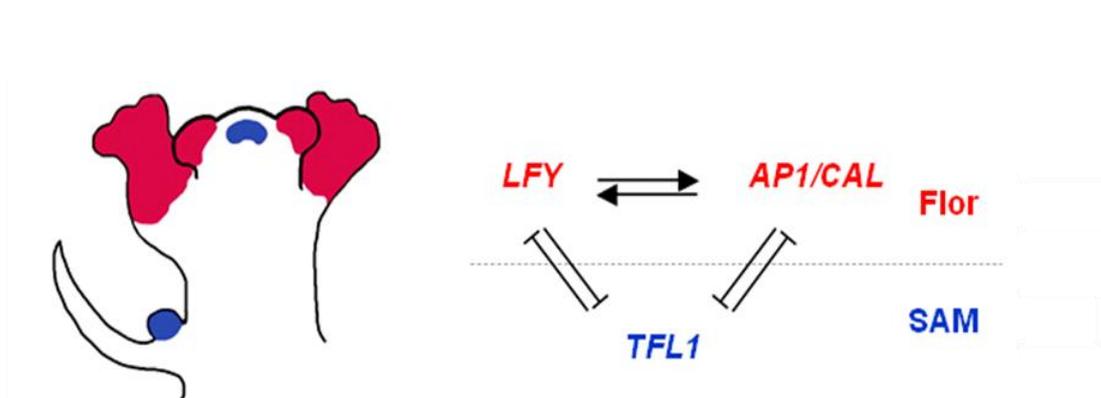
En *Arabidopsis*, durante la fase de desarrollo vegetativo, el meristemo apical del tallo diferencia órganos laterales vegetativos como primordios de hojas y yemas axilares, que posteriormente darán lugar a brotes laterales. En un estadio concreto de su ciclo de vital, las plantas pasan de la fase de desarrollo vegetativo a la fase reproductiva donde el meristemo apical del tallo (SAM) adquiere la condición de meristemo inflorescente (MI) y comienza a diferenciar meristemos florales (MF) en sus flancos (Figura 7).

Por lo tanto, con la transición floral el destino de estos primordios laterales tiene que ser reprogramado para que adquieran la identidad de meristemos florales. En *Arabidopsis*, la adquisición de la identidad de meristemo floral es controlada por la interacción de genes reguladores positivos y negativos (Benlloch *et al.* 2007). Los genes reguladores positivos son los genes de identidad de meristemo floral, que se expresan en los flancos del SAM y confieren identidad floral al primordio lateral que se

forma. Para ello, activan y controlan la expresión de los genes homeóticos florales, que finalmente son los encargados de dirigir la formación de los órganos de la flor (Irish 2010). En *Arabidopsis* los principales genes de identidad del meristemo floral son *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *FRUITFULL* (*FUL*) y *APETALA 2* (*AP2*), (Figura 6).

### 3.1.1.2. *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* es un regulador negativo de la iniciación floral en *Arabidopsis*

Las funciones del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* y los genes de identidad del meristemo floral son antagónicas. Por tanto, para el correcto desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis* es necesario que la expresión de *TFL1* quede confinada al centro del SAM para impedir su determinación, mientras que la de *AP1*, *LFY* y *CAL* ha de quedar confinada a sus flancos (Figura 8), que es donde se formarán las flores. Para conseguir que los patrones de expresión de estos dos grupos de genes antagónicos queden restringidos a zonas excluyentes y no solapantes del ápice, se da una represión mutua entre ellos. De esta forma, *LFY*, *AP1*, *CAL* y *FUL* especifican y mantienen la identidad del meristemo floral, evitando su reversión a meristemo inflorescente, al reprimir en él la expresión de *TFL1* (Ferrandiz *et al.* 2000; Kaufmann *et al.* 2010; Liljegren *et al.* 1999; Moyroud *et al.* 2011; Ratcliffe *et al.* 1999; Winter *et al.* 2011). Por el otro lado, la acción de *TFL1* en el centro del SAM, reprime la expresión de los genes de identidad del meristemo floral manteniendo así el carácter inflorescente de éste.



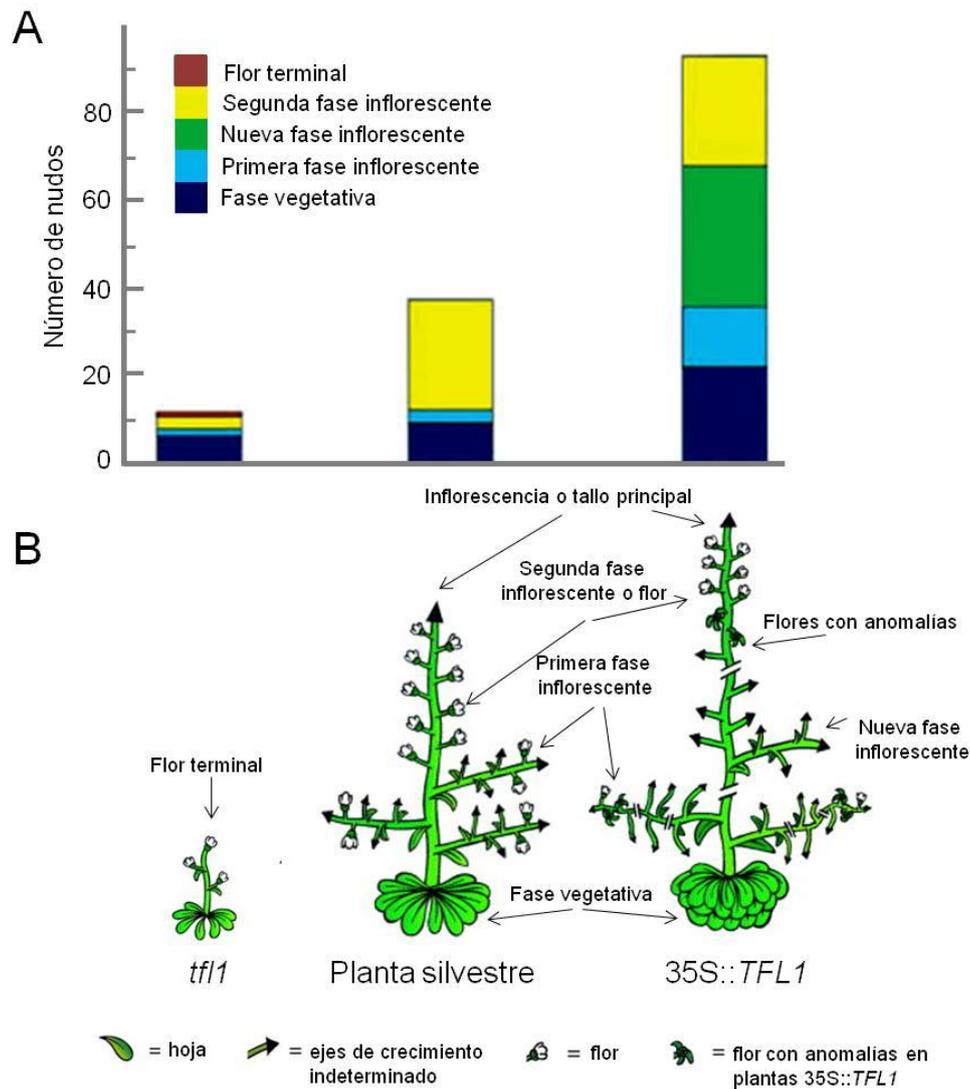
**Figura 8. Expresión complementaria de los genes *TFL1* (azul) y los genes de identidad de meristemo floral *LFY* / *AP1* / *CAL* (rojo) en el meristemo inflorescente de *Arabidopsis*. Mientras *LFY* y *AP1* / *CAL* especifican la identidad floral, *TFL1* se requiere para mantener la identidad inflorescente del meristemo. Adaptado de Benlloch *et al.* 2007.**

### 3.1.1.2.1. *TFL1* y el desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis*

El gen *TFL1* es un regulador clave del desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis*. Alteraciones en la función de *TFL1* afectan a la arquitectura de la parte aérea de la planta (Figura 9). Una planta mutante *tfl1* se diferencia de una planta silvestre principalmente en dos aspectos: las plantas *tfl1* florecen antes y sus inflorescencias se hallan transformadas en flores (Alvarez *et al.* 1992; Bradley *et al.* 1997; Schultz y Haughn 1993; Shannon y Meeks-Wagner 1991). Durante la fase vegetativa, el patrón de desarrollo de una planta *tfl1* es aparentemente normal aunque acaba floreciendo tras producir un menor número de hojas que la planta silvestre (Shannon y Meeks-Wagner 1991; Bradley *et al.* 1997). Por su parte, el desarrollo inflorescente de la planta *tfl1* se encuentra afectado. Así, la primera fase inflorescente se acorta ligeramente, formándose solamente una o dos hojas caulinares. A continuación, la segunda fase inflorescente es muy corta y tras la producción de entre una y cinco flores, el ápice se determina formando una flor terminal (Figura 9), (Bradley *et al.* 1997; Ratcliffe *et al.* 1999).

Al contrario de lo que sucede con la pérdida de función de *TFL1*, su sobreexpresión bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Odell *et al.* 1985), extiende la longitud de las fases vegetativa e inflorescente (Ratcliffe *et al.* 1999), (Figura 9). Las plantas 35S::*TFL1* presentan una fase vegetativa mucho más larga que la planta silvestre.

La primera fase inflorescente incrementa su duración aún más, lo que se traduce en la formación de una gran cantidad de inflorescencias secundarias. Además, aparece una nueva fase inflorescente, no observada en plantas silvestres, caracterizada por la formación de inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares. También, en estas inflorescencias aparecen flores con anomalías. Finalmente, la planta 35S::*TFL1* alcanza la segunda fase inflorescente, durante la cual se generaran flores normales. Puesto que las inflorescencias secundarias e inflorescencias de roseta repiten el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal, se obtiene una planta de gran tamaño y con una arquitectura muy ramificada (Figura 9), (Ratcliffe *et al.* 1999).



**Figura 9. *TFL1* es un gen clave para el control de la arquitectura de la planta en *Arabidopsis*.** (A). Efecto de la actividad de *TFL1* en la duración de las fases del desarrollo del SAM en plantas: *tf1-1* cultivada en día largo (izquierda), planta silvestre del ecotipo Col cultivada en día largo (centro) y planta 35S::*TFL1* cultivada en día largo (derecha). Cada fase está representada por una barra de color y su duración se mide según el número de nudos que el SAM produce en ella. Fase vegetativa, donde se producen hojas de roseta; primera fase inflorescente, donde se producen inflorescencias secundarias sustentadas por hojas caulinares; nueva fase inflorescente, exclusiva de las plantas 35S::*TFL1* donde se producen inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares; segunda fase inflorescente, donde se producen flores; flor terminal, fase exclusiva de las plantas *tf1* donde se produce la flor terminal. (B). Ilustraciones de la morfología de *Arabidopsis* en: planta *tf1-1* cultivada en día largo (izquierda), planta silvestre del ecotipo Col cultivada en día largo (centro) y planta 35S::*TFL1* cultivada en día largo (derecha). La sobreexpresión de *TFL1* bajo el control del promotor 35S, extiende la longitud de las fases vegetativa e inflorescente, lo contrario que ocurre con *tf1*. Imagen adaptada de Ratcliffe *et al.* (1998) y de Pidkowich *et al.* 1999.

En resumen, *TFL1* regula la longitud de las distintas fases por las que pasa el SAM a lo largo del ciclo de vida de la planta, afectando al número e identidad de todos los órganos aéreos generados por él y, por lo tanto, actúa como un determinante clave de la arquitectura de la inflorescencia (Bradley *et al.* 1997; Ratcliffe *et al.* 1999; Conti y Bradley 2007). Del mismo modo que se ha visto que la sobreexpresión de *TFL1* o *CENTRORADIALIS* (*CEN*, el ortólogo de *TFL1* en *Antirrhinum majus*) en especies heterólogas, como por ejemplo la de *CEN* en tabaco (Amaya *et al.* 1999), produce un retraso importante en el tiempo de floración dando lugar a un incremento en el desarrollo vegetativo de la planta y a un mayor número de hojas (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de la represión de la transición floral por *CENTRORADIALIS* (*CEN*) en *Nicotiana tabacum*.** La sobreexpresión del gen *CEN* de *Antirrhinum majus* en tabaco produce retraso de la floración de hasta 10 meses que se traduce en un incremento del desarrollo vegetativo. En la figura se aprecia a la izquierda una planta transgénica de tabaco que porta la construcción 35S::*CEN* comparada con una planta WT no transformada que ya ha realizado la transición floral. La planta transgénica presenta una mayor longitud de tallo, un mayor número de hojas y ausencia de flores en su ápice. Adaptado de Amaya *et al.* 1999.

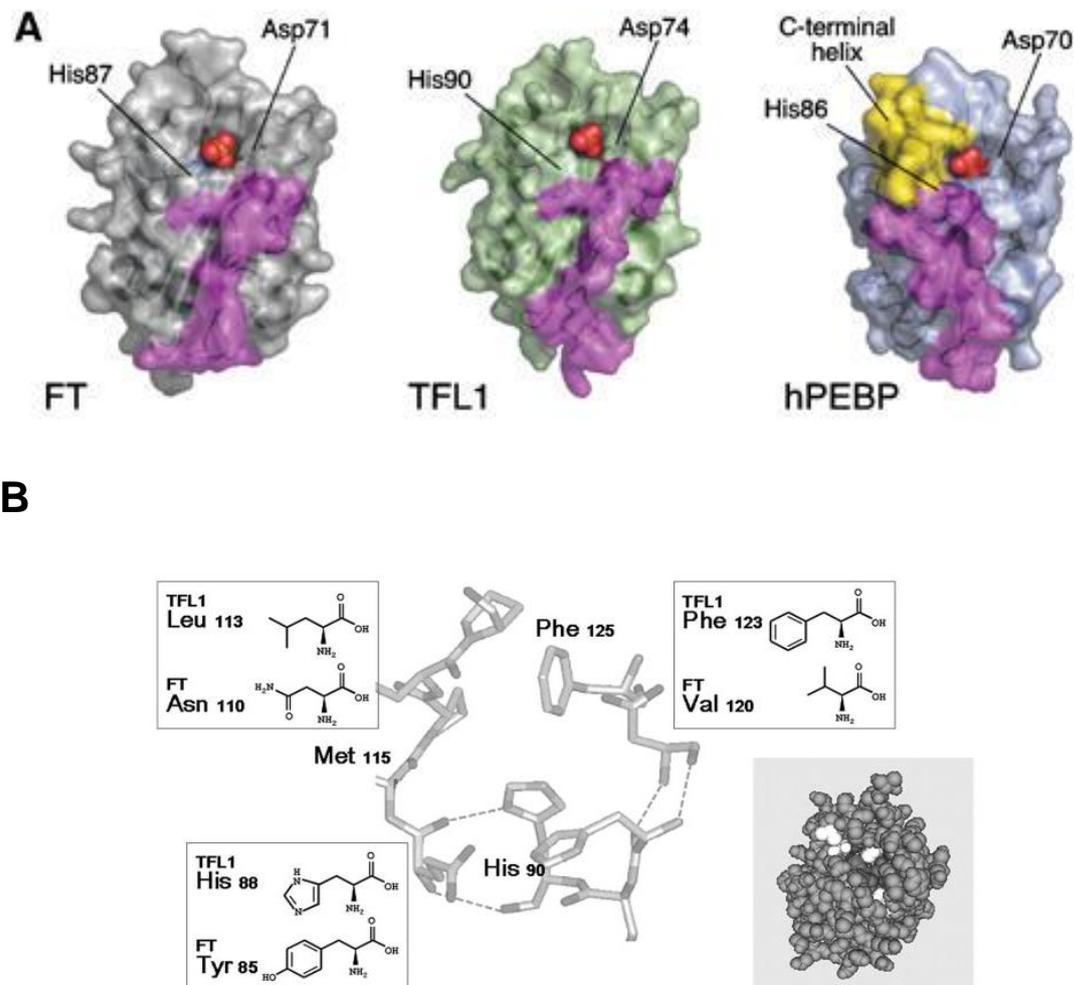
### 3.1.1.2.2. La proteína TFL1

*TFL1* codifica una proteína con homología a las proteínas de unión a fosfatidiletanolamina (PEBPs; Bradley *et al.* 1997; Ohshima *et al.* 1997). Estas proteínas participan en diferentes fenómenos fisiológicos regulando rutas de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación (Chautard *et al.* 2004; Hengst *et al.* 2001; Yeung *et al.* 1999). La familia de las PEBPs se encuentra presente en todos los reinos eucariotas, y en angiospermas se ha denominado familia de los genes *CETS*. Este nombre proviene de los primeros tres genes con homología a estas proteínas aislados de plantas: *CENTRORADIALIS* (*CEN*, *Antirrhinum majus*), *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*, *Arabidopsis thaliana*) y *SELF-PRUNING* (*SP*, *Solanum*

*lycopersicum*), (Bradley *et al.* 1997; Pnueli *et al.* 2001). Esta familia en plantas está dividida en tres subfamilias: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *MOTHER OF FT Y TFL1 (MFT)* y *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) LIKE* (Karlgrén *et al.* 2011). Las proteínas FT y TFL1, a pesar de presentar una homología alta a nivel de secuencia (59%), tienen funciones antagónicas en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Al contrario de lo que sucede con TFL1, la pérdida de función de FT provoca floración tardía y las plantas 35S::*FT* muestran un fenotipo similar al de los mutantes *tfl1* (Kardailsky *et al.* 1999; Kobayashi *et al.* 1999). El miembro de esta familia más estudiado es la proteína inhibidora de la Raf1 quinasa (RKIP) de mamíferos, por su papel en la supresión de la metástasis entre otros (Yeung, 1999; Granovsky y Rosner 2008; Hagan *et al.* 2006). Las PEBPs poseen una estructura globular compacta (Figura 11), con un bolsillo de unión a ligando, lo que les proporciona una amplia superficie para interactuar con otras proteínas (Granovsky y Rosner 2008).

Las proteínas FT y TFL1 muestran una estructura tridimensional muy similar a la de otras proteínas PEBPs de animales y plantas (Banfield y Brady 2000). Presentan algunas diferencias entre ellas en la conformación del bolsillo de unión a ligando (Ahn *et al.* 2006), diferencias que son esenciales para su función bioquímica (Figura 11). Así, la sustitución en TFL1 de una histidina, situada en la periferia del bolsillo de unión a ligando, por el residuo en la posición equivalente de FT, tirosina, y viceversa, es suficiente para intercambiar, al menos parcialmente, las funciones de TFL1 y FT en *Arabidopsis* (Hanzawa *et al.* 2005). Estos residuos interactúan con un dominio externo de la proteína que, probablemente, actúa como una superficie molecular de reconocimiento proteico (Ahn *et al.* 2006). De este modo, tanto los residuos situados junto al bolsillo de unión a ligando como el dominio externo contribuyen a la especificidad funcional de TFL1 y FT, probablemente determinando su capacidad de formar complejos con otras proteínas.

Se ha demostrado que FT promueve la floración al actuar en el núcleo, como parte de un complejo transcripcional, con el factor de transcripción de tipo bZIP FD (Abe *et al.* 2005; Wigge *et al.* 2005). La proteína TFL1 también es capaz de interactuar con FD (Pnueli *et al.* 2001; Abe *et al.* 2005; Wigge *et al.* 2005; Hanano y Goto 2011). Por otra parte, TFL1 ejerce su función como represor de la floración actuando como modulador negativo de la transcripción mediante el reclutamiento de uno o varios cofactores (represores), hasta ahora desconocidos, y que inhibirían la expresión de los genes diana de FD (Hanano y Goto 2011).

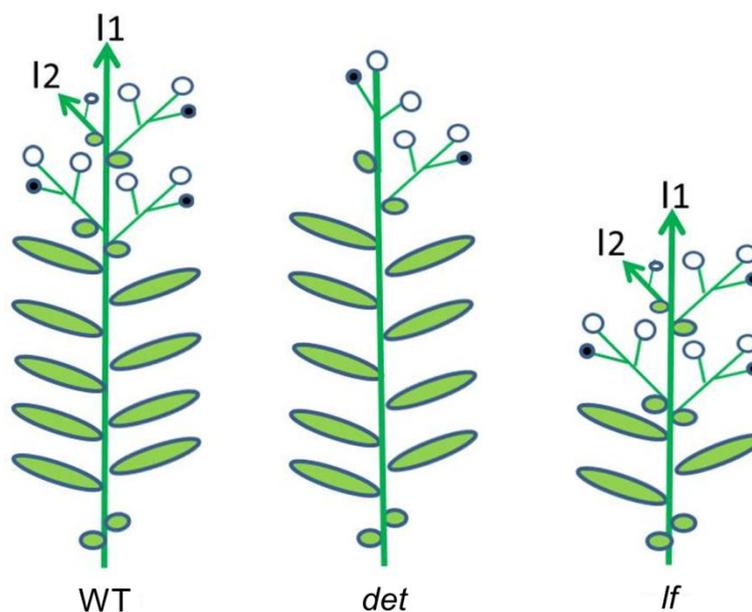


**Figura 11. Estructura de las proteínas FT, TFL1 y hPEBP mostrando la gran similitud entre ellas y las diferencias puntuales en algunos aminoácidos de su secuencia. (A).** Representación superficial de las tres proteínas en orientación similar. Las esferas en rojo indican la zona de unión a ligando (fosfato), la zona en magenta es la correspondiente al segmento B de gran similitud entre FT y TFL1, y la zona marcada en amarillo en la hPEBP de mamíferos corresponde al segmento C-terminal que hace menos accesible al sitio de unión a ligando que en FT y TFL1. Los dos residuos conservados de His y Asp que unen al ligando está señalados en la figura. **(B).** La sustitución en TFL1 de una histidina, situada en la periferia del bolsillo de unión a ligando, por el residuo en la posición equivalente de FT, tirosina, y viceversa, es suficiente para intercambiar, al menos parcialmente, las funciones de TFL1 y FT. Adaptada de Ahn *et al.* (2006) y Hanzawa *et al.* (2005).

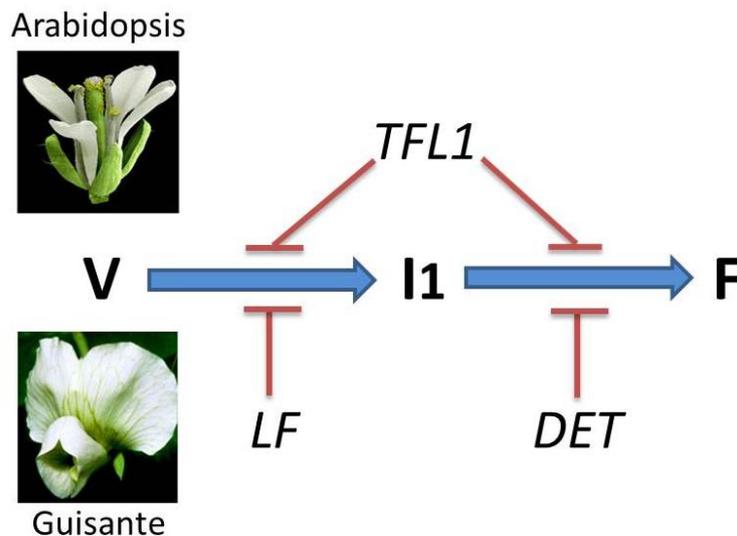
### 3.1.1.2.3. Ortólogos de *TFL1* en leguminosas

Se han identificado genes ortólogos de *TFL1* en guisante (Foucher *et al.* 2003) y en *Medicago truncatula* (A. Berbel y F. Madueño, comunicación personal). *PsTFL1a*, *PsTFL1b* y *PsTFL1c* son los tres ortólogos de *TFL1* identificados en guisante. Estudios

de mapeo han sugerido que *PsTFL1a* y *PsTFL1c* corresponden a *DETERMINATE* (*DET*) y *LATE FLOWERING* (*LF*) respectivamente (Foucher *et al.* 2003). El mutante *lf* tiene un fenotipo de floración temprana con una parada prematura del desarrollo de la inflorescencia. En cambio, el mutante *det* no presenta ningún fenotipo durante la fase vegetativa. En estas plantas, la mutación del gen *DET* da lugar a la producción de algunas flores axilares y a la aparición de una flor terminal (Figura 12). Estas diferencias en el fenotipo son debidas a que los genes *PsTFL1* presentan diferentes patrones de expresión en distintos tejidos de la planta y en diferentes estadios. *PsTFL1a* se expresa en raíces, en ápices florales y flores; mientras que su parálogo *PsTFL1c* se expresa con niveles de expresión similares en todos los órganos de la planta. Con estos resultados, Foucher *et al.* (2003) demostraron que diferentes homólogos de *TFL1* controlan dos aspectos distintos del desarrollo de guisante: *LF* está implicado en el control de la fase vegetativa dando lugar a un retraso en la iniciación floral, la transición de la fase vegetativa al meristemo inflorescente; y *DET* está implicado en el control de la fase floral previniendo la transición del meristemo inflorescente primario (I1) a flor (Figura 13). En cambio, un solo gen *TFL1* controla ambas funciones en *Arabidopsis*.



**Figura 12. *DET* y *LF* son dos genes claves para el control de la arquitectura de la planta en *Pisum sativum*.** Ilustraciones de la arquitectura de la planta de guisante (*P. sativum*) en: planta silvestre (izquierda), planta *det* (centro) y planta *lf* (derecha). El mutante *det* produce algunas flores axilares y la aparición de una flor terminal. En cambio, el mutante *lf* tiene un fenotipo de floración temprana. Adaptado de Foucher *et al.* 2003.



**Figura 13. Represión de la transición floral por dos ortólogos de *TFL1* en *Pisum sativum* en comparación con *Arabidopsis thaliana*.** En Arabidopsis existe un solo gen *TFL1* que reprime el paso de meristemo vegetativo (V) a inflorescente (I1) y de este a la formación de flores (F). En guisante y *M. truncatula* existen dos ortólogos de *TFL1*: *LF* que reprime el paso de meristemo vegetativo a inflorescente y *DETERMINATE* (*DET*) que reprime el paso de meristemo inflorescente a floral y controla el crecimiento indeterminado de la planta. Adaptado de Foucher *et al.* 2003.

### 3.2. Interés de la biofortificación de cultivos forrajeros: producción de novo de antocianinas y acumulación de proantocianidinas (taninos condensados) en alfalfa

La biofortificación de alimentos es un área de la Biotecnología que consiste en dotar a los alimentos de un valor añadido enfocado hacia la prevención o reducción de carencias nutricionales, o bien para desarrollar alimentos funcionales con compuestos bioactivos saludables. La mayoría de estos abordajes se realiza mediante técnicas de ingeniería metabólica a base de modificar rutas de biosíntesis o degradación de determinados compuestos de interés nutricional o farmacológico.

#### 3.2.1. Biosíntesis de proantocianidinas (PAs)

Los flavonoides comprenden uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios derivados de las rutas metabólicas del ácido siquímico y de los poliacetatos que contribuyen a importantes caracteres de las plantas. Dentro de esta familia, se encuentran las antocianinas y los flavanoles (Figura 14). Estos últimos,

representan una compleja familia compuesta por las formas isoméricas de las catequinas y sus polímeros llamados taninos condensados o proantocianidinas (PAs) (Figura 15), (Cheynier *et al.* 2000).

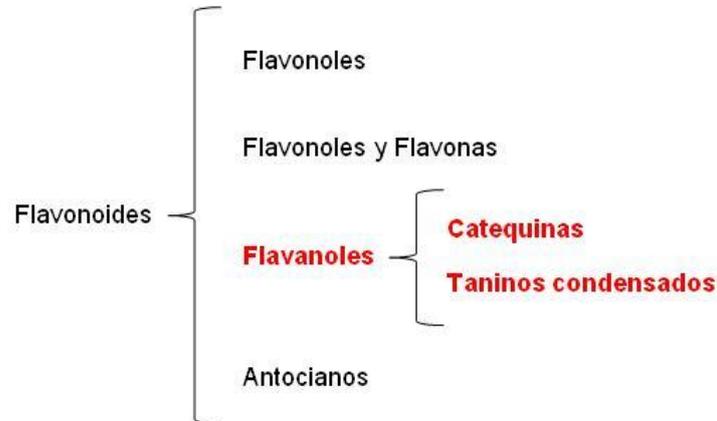


Figura 14. Clasificación de los flavonoides (Zamora, 2003).

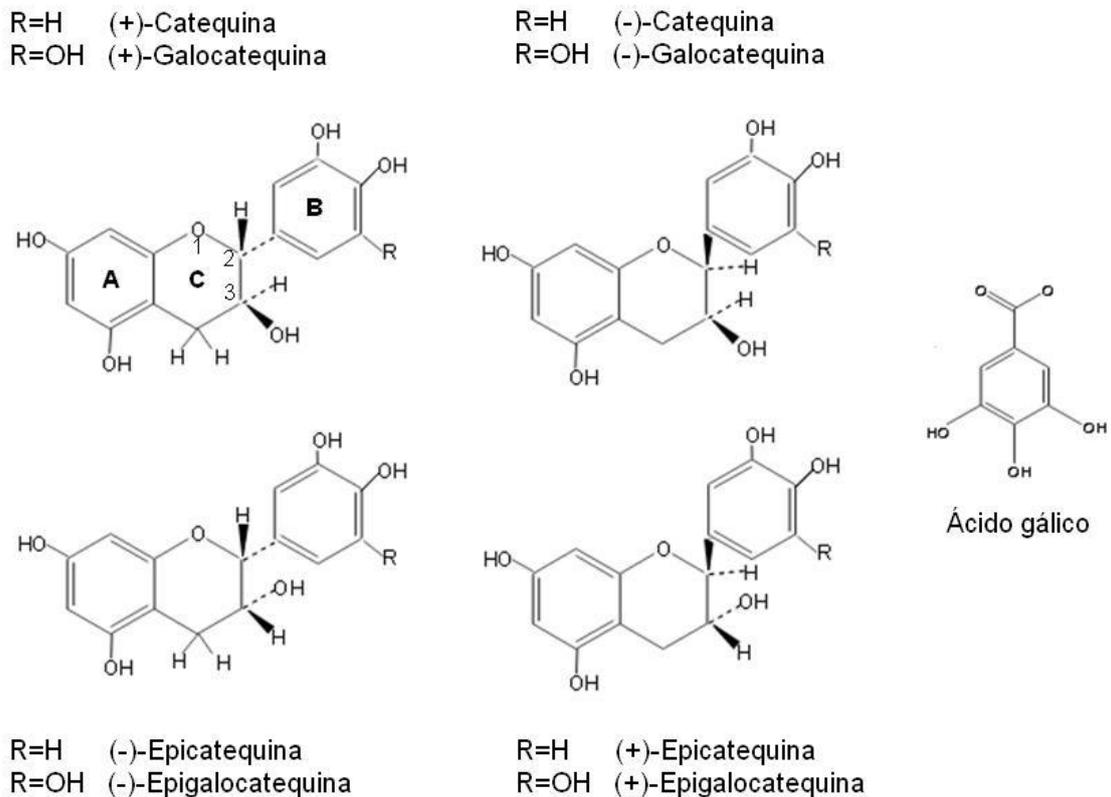
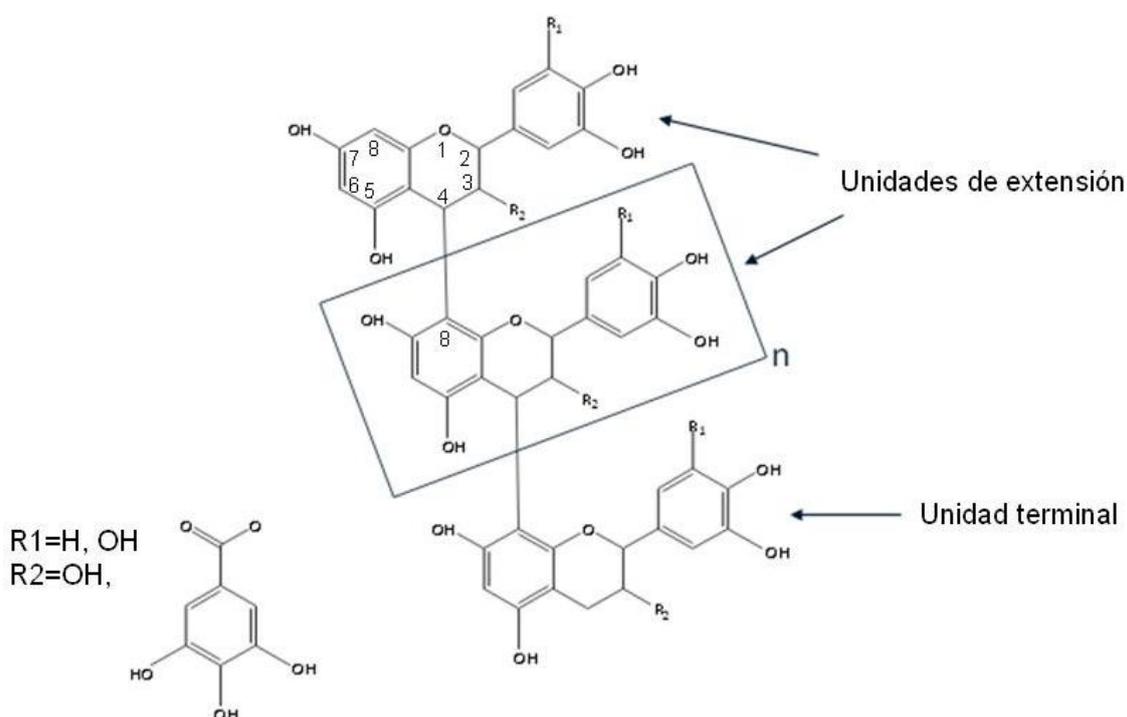


Figura 15. Estructura química de los flavanoles. Estructura básica de la catequina que presenta un benzopirano con dos carbonos asimétricos que dan lugar a 4 isómeros: (+)/(-) catequina y epicatequina.

La estructura básica de las catequinas presenta un benzopirano con dos carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros: (+)/(-) catequina y epicatequina (Figura 15). Además el anillo aromático B siempre presenta dos hidróxilos y puede presentar un tercer OH dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigalocatequina. Por otra parte, el grupo OH en posición 3 del benzopirano puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico, por lo que también se pueden formar los 3-galatos de (+)/(-) (galo) catequina y epi (galo) catequina.

Los flavanoles polímeros reciben el nombre de taninos condensados o proantocianidinas (PAs) y están formados por monómeros de flavanoles unidos mediante enlaces C4-C8 ó C4-C6 (Figura 16), (Dixon *et al.* 2005). A pesar de que la ruta de síntesis de flavonoides es conocida, las etapas que conducen a la polimerización de catequinas no han sido aclaradas, ni tampoco si éste es un mecanismo enzimático o no enzimático considerando las condiciones ácidas de la vacuola (Hagerman, 2002; Dixon *et al.* 2005; Lepiniec *et al.* 2006).



**Figura 16. Estructura química de las proantocianidinas, polímeros formados por unidades de los diversos flavanoles unidas mediante enlaces C4-C8 ó C4-C6.**

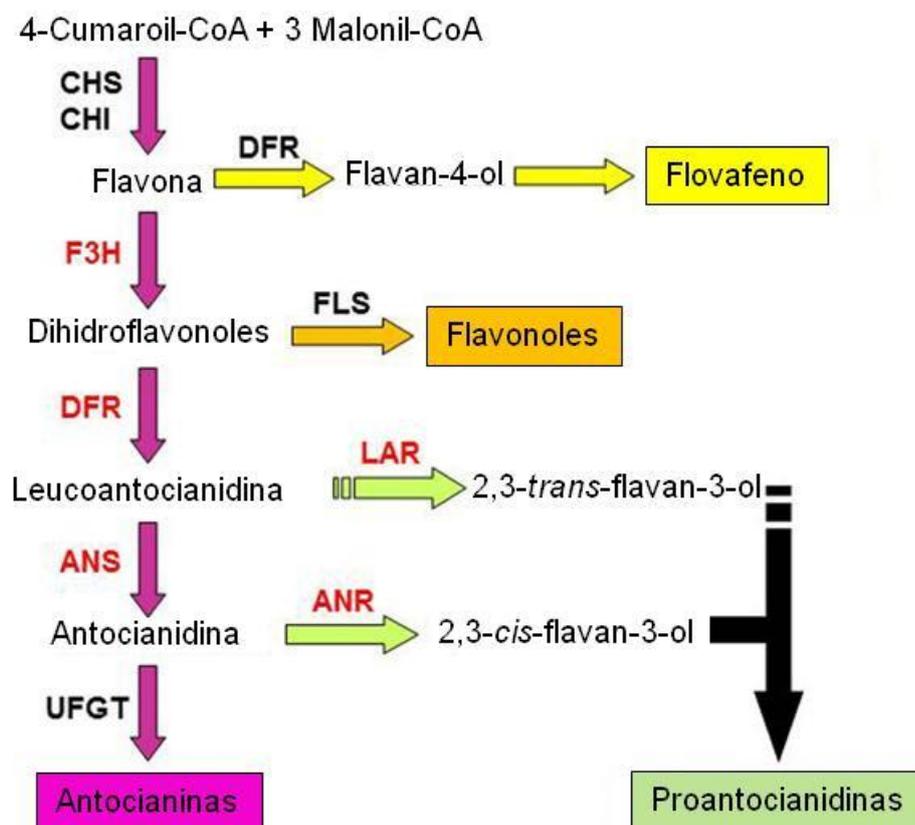
La ruta de biosíntesis de antocianinas y PAs ha sido bien caracterizada en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, habiéndose realizado principalmente gracias a

los mutantes llamados “*transparent testa*” (*tt*) y “*tannin-deficient seeds*” (*tds*). Las PAs están presentes en las cubiertas de frutos, hojas y semillas de muchas plantas donde actúan dando protección frente a los predadores. Por ello, en muchas plantas, el color de la cubierta de la semilla se determina principalmente por su contenido en antocianinas y PAs. Las cubiertas de las semillas con alto contenido en PAs y bajo contenido de antocianinas presentan colores marrones debido a la oxidación de las PAs. Por el contrario, las cubiertas de las semillas con alto contenido de antocianinas exhiben un color rojo oscuro. En cambio, estos mutantes presentan un color claro en su semillas, indicando que tienen reducida la biosíntesis de antocianinas y PAs, siendo especialmente deficiente en la acumulación de estas últimas (Debeaujon *et al.* 2001). Algunos de los genes identificados gracias a los mutantes corresponden a factores de transcripción que regulan la expresión de los genes que codifican las enzimas que integran la ruta de biosíntesis de flavonoides (Dixon *et al.* 2005; Lepiniec *et al.* 2006). Esta regulación es realizada principalmente mediante una combinación transcripcional formado por los factores de transcripción de tipo MYB y los llamados *basic helix-loop-helix* (bHLH).

Dicha ruta (Figura 17) comienza cuando tres moléculas de malonil-CoA y una de *p*-cumaroil-CoA son condensadas para producir naringenina chalcona por la acción de la enzima chalcona sintasa (CHS). Luego por acción de la enzima chalcona isomerasa (CHI), la naringenina chalcona es modificada a su isómero naringenina flavanona la cual posee los tres anillos C6-C3-C6 del esqueleto flavonoide. Posteriormente, por la acción de las enzimas flavanona 3 $\beta$ -hidroxilasa (F3H) y flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) sintetizan dihidroflavonoles, los que son reducidos a leucoantocianidinas por la enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), (Sparvoli *et al.* 1994). La enzima antocianidina sintasa (ANS) o también llamada leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX) convierte las leucoantocianidinas en antocianidinas mediante una reacción de oxidación. Hasta la formación de antocianidinas la ruta de síntesis de flavonoides comparte etapas comunes para la síntesis de antocianinas y PAs (Winkel-Shirley *et al.* 2001; Koes *et al.* 2005).

Otros genes estructurales de esta ruta han sido identificados, incluyendo el de la enzima antocianidina reductasa (ANR), también conocido como *BANYULS* (*BAN*) en *A. thaliana*. Los mutantes *banyuls*, que contienen una mutación en el gen *ANR*, presentan un elevado contenido de antocianinas en la cubierta de las semillas siendo éstas de color rojo oscuro (Devic *et al.* 1999; Xie *et al.* 2003). El fenotipo de los mutantes *ban* muestra la función exclusiva de la ANR en la biosíntesis de PAs.

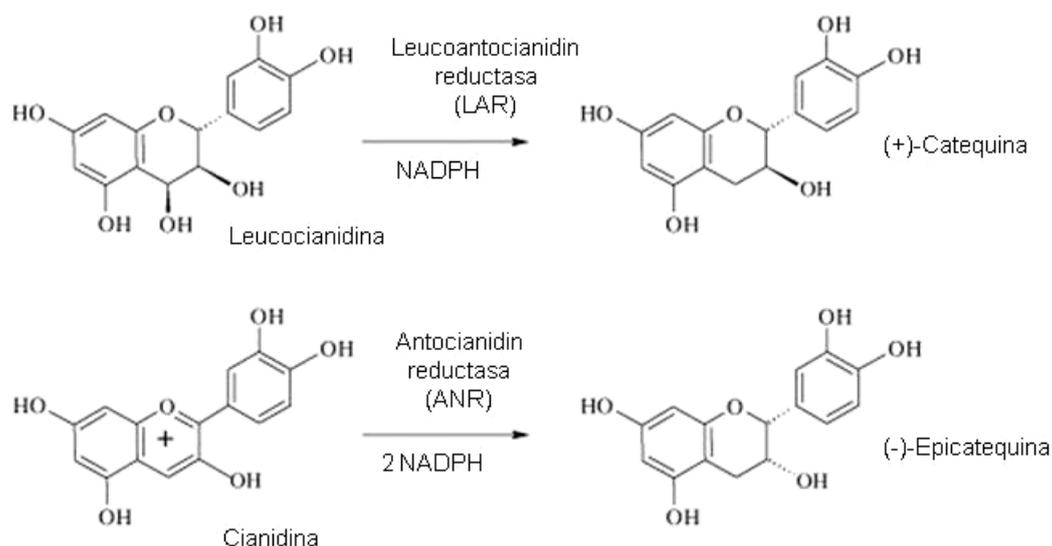
Además de esta clara evidencia genética, las correlaciones bioquímicas establecen que tanto ANR y LAR son enzimas implicadas en dicha ruta (Xie *et al.* 2005). El gen *LAR* se clonó a partir de hojas ricas en PAs de la leguminosa *Desmodium uncinatum* (Tanner *et al.* 2003).



**Figura 17. Rutas de síntesis de antocianinas y proantocianidinas.** Ruta de biosíntesis de proantocianidinas a partir de leucoantocianidinas mediante la leucoantocianidin reductasa (LAR) y de las antocianidinas mediante la antocianidin reductasa (ANR). CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavona 3-hidroxilasa; DFR: dihidroxiflavonol 4-reductasa; ANS: antocianidin sintasa; FLS: flavonol sintasa; UFGT: UDP glucosa-flavonoide 3-O-glucosiltransferasa.

De este modo, para la biosíntesis de PAs (Figura 18) se utilizan dos intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavonoides, la leucoantocianidina para la formación de 2,3-*trans*-flavan-3-ol (p.e: (+)-catequina y (+)-galocatequina) mediante la actuación de la leucoantocianidin reductasa (LAR), (Tanner *et al.* 2003) y la antocianidina (pelargonidina, cianidina o delfinidina) para la formación de 2,3-*cis*-flavan-3-ol (p.e: (-)-epicatequina y la (-)-epigalocatequina), mediante la actuación de la antocianidin reductasa (ANR), (Xie *et al.* 2004; Xie *et al.* 2006). Ambas enzimas son dependientes

de la coenzima NADPH que al oxidarse a  $\text{NADP}^+$  cataliza la conversión de los precursores reduciéndolos a (+)-catequina y (-)-epicatequina (Figura 18), (Pfeiffer *et al.* 2006). Además, ambos intermediarios son inestables y no se acumulan en niveles medibles en plantas (Peel *et al.* 2009).



**Figura 18. Reacción enzimática llevado a cabo por LAR y ANR para la biosíntesis de (+)-catequina y (-)-epicatequina, respectivamente.** LAR convierte la leucocianidina en (+)-catequina y ANR convierte la ciandina en (-)-epicatequina. Ambas enzimas son dependientes de la coenzima NADPH que al oxidarse a  $\text{NADP}^+$  cataliza dichas conversiones.

### 3.2.1.1. Las PAs como potenciales nutraceuticos

La habilidad de manipular la biosíntesis de flavonoides en plantas de interés agronómico está incrementando su importancia en los últimos tiempos debido a sus posibles usos en las áreas de los nutraceuticos y de la alimentación humana y animal en general. Las proantocinidinas son principios activos de los vegetales que han demostrado tener potentes propiedades en cuanto a su capacidad de brindar beneficios a la salud y contribuir como recurso antienvjecimiento. Entre los argumentos que sugieren la incorporación diaria en la dieta de cantidades suficientes de estas sustancias, se encuentran los siguientes: potentes antioxidantes, protección de los vasos sanguíneos, profilaxis de las infecciones, preservación del daño causado por el tabaco, retardo del envejecimiento general de los tejidos, retardo del daño del DNA, protegen al colesterol de la oxidación, menor incidencia de arteriosclerosis y de sus consecuencias asociadas, eficaces en el tratamiento de edemas, hemorroides, varices y retinopatía. Entre sus fuentes nutricionales se destacan las siguientes:

semillas de uva, corteza de pino, arándano, espino blanco, cítricos, cacao, manzana, cacahuates, almendras y té verde. Durante la década de los noventa se popularizó la venta de complementos a base de corteza de pino marítimo francés y extracto de semillas de uva (Figura 19). Junto con ellos, y por compartir propiedades, renovaron su credibilidad algunos nutrientes clásicos como los bioflavonoides cítricos, las grosellas, el vino tinto o el espino blanco; también otros se volvieron familiares en las tiendas de salud, tales como el té verde, el arándano azul y rojo, entre otros. Todos estos nutrientes tienen su especificidad de acción pero comparten generalidades.

“Plant Extract with a **Proanthocyanidins** Content as a Therapeutic Agent Having **Radical Scavenger Effect**”

© OPCS.COM

-Jack Masquelier (1987)

Supplement Facts	
Serving Size:	2 Capsules
Servings Per Container:	30
Amount Per Serving	% Daily Value
Flavay®	200 mg ‡
Standardized and genuine oligomeric (small-cluster) proanthocyanidins complex (isolated from <i>Vitis vinifera</i> seed and <i>Pinus maritima</i> French pine bark)	
Macrozyme™ Active Enzymes	50 mg ‡
Amylase, Cellulase, Lactase, Lipase, Protease, Maltase and Invertase	
‡ Daily Value not established	



Anything Else is Just Pretending™

Compare Supplement Facts: the other brands contain vague and untraceable extracts.



**Figura 19. Comercialización de productos derivados de extractos vegetales ricos en proantocianidinas.** Los extractos derivados de las semillas de uva poseen un notable efecto antioxidante y propiedades secuestrantes de radicales libres, produciendo un efecto antienviejimiento. Esto se debe a su alto contenido en taninos condensados o proantocianidinas cuya incorporación a la dieta tiene efectos saludables. En el mercado existen numerosos preparados que contienen proantocianidinas extraídas de distintas especies de plantas.

El uso de las proantocianidinas en la medicina moderna tiene su antecedente mucho tiempo atrás, en 1534, cuando un explorador francés y su tripulación estaban atrapados por el hielo en el Río San Lorenzo donde hoy son los Estados Unidos. Muchos de los marinos fueron salvados del escorbuto por un nativo que les indicó que bebieran té de las agujas y la corteza de un pino que crecía en la región. Unos cuatro siglos después, Jacques Masquelier de la Universidad de Bordeaux se encontró con esta historia e investigó los principios activos de los pinos; pronto pudo elaborar un extracto de la corteza del pino marítimo francés y verificó que tenía algunas de las propiedades de la vitamina C. Este hecho disparó muchas investigaciones que dieron paso a un campo fértil dentro de las ciencias de la salud. En 1951, el fitoquímico inglés

E.C. Bate-Smith (Universidad de Cambridge, UK), desarrolló un método colorimétrico para detectar la presencia de proantocianidinas en tejidos vegetales (Bate-Smith 1973).

### **3.2.1.2. Interés de activar *de novo* la biosíntesis de antocianinas y PAs en la alfalfa**

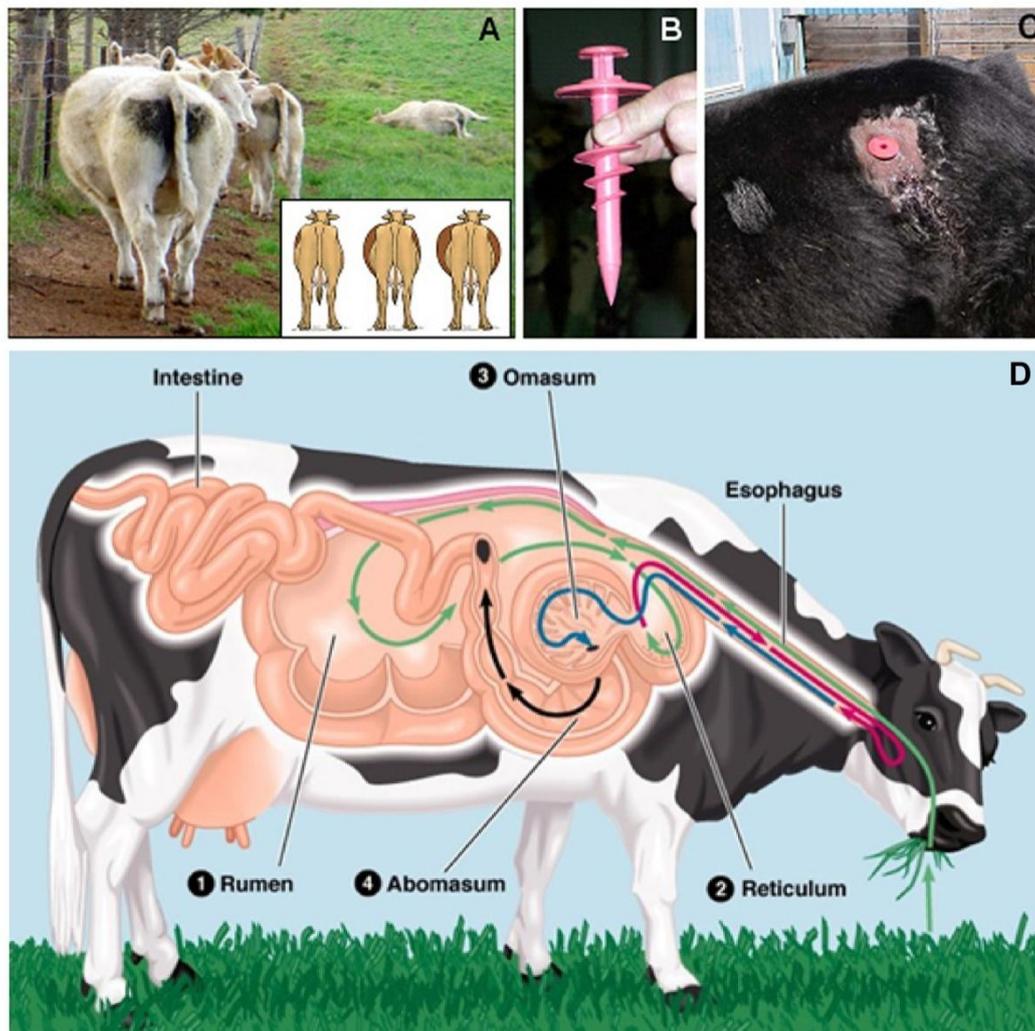
La alfalfa, a diferencia de otras especies forrajeras, no produce ni acumula PAs en sus órganos vegetativos. Tan sólo en la cubierta de la semilla se produce síntesis de antocianinas y PAs. La introducción de PAs en la alfalfa sería particularmente interesante para los productores de ganado rumiante con objeto de combatir el hinchamiento por gases o meteorismo. El meteorismo es una alteración digestiva caracterizada por la distensión del retículo-rumen como consecuencia de la acumulación de gases de efecto invernadero (metano, CO<sub>2</sub>) provenientes de la fermentación microbiana del alimento, los cuales son atrapados en pequeñas burbujas de gran estabilidad. Esto impide su normal eliminación mediante la eructación y ocasiona alteraciones circulatorias y respiratorias que pueden producir la muerte del animal (Figura 20 A), (Howarth 1975). Cuando se produce el hinchamiento por gases, la única solución para evitar la asfixia del ganado es perforar el rumen desde el lomo del animal con una cánula y desalojar los gases contenidos en esta cavidad (Figura 20 B y C).

El meteorismo está asociado a la “teoría de la velocidad de digestión inicial”, la cual señala que las leguminosas meteorizantes (*Medicago sativa* L., *Trifolium repens* L. y *Trifolium pratense* L.) presentan mayor fragilidad en su pared celular que el resto de leguminosas (Howarth *et al.* 1975, 1978; Majak y Hall 1990). Lees *et al.* (1981) indican que la resistencia de la pared celular determina la velocidad de ruptura celular. Ante una menor resistencia, el proceso de masticación y el posterior ataque microbiano al material vegetal (Howarth y Horn 1984) provocan una rápida liberación ruminal de los constituyentes intracelulares, fundamentalmente hidratos de carbono solubles y proteínas solubles, que tienen un rol principal en el desarrollo del meteorismo. Dichos componentes se acumulan en cantidades que resultan críticas para la formación de espuma (Howarth *et al.* 1978). Las proteínas solubles son los principales constituyentes de la espuma y a su vez responsables de los cambios en la viscosidad y tensión superficial de líquido ruminal. De este modo, las pequeñas burbujas de gas quedan atrapadas entre la espuma proteinácea, impidiendo su coalescencia y dando lugar a la formación de espuma estable en el rumen.

Esta problemática está asociada con el complicado aparato digestivo de los rumiantes que se desarrolló a lo largo de su evolución y que se ha conservado hasta nuestros días. Cuando estos animales vivían libres en la naturaleza, desarrollaron un aparato digestivo poligástrico con diversos compartimentos que les permitía engullir con rapidez el pasto presente en las grandes praderas y acumularlo en uno de esos compartimentos denominado panza o rumen donde sufre una fermentación microbiana y un primer proceso degradativo. Después, y una vez en un lugar seguro a salvo de sus predadores, el pasto pasaba de nuevo en pequeñas porciones mediante regurgitación a la boca a través del retículo o redecilla para su masticación y salivación, y de nuevo por el esófago pasaba esta vez al omaso o libro y después al abomaso o cuajar (estómago verdadero) para su completa digestión con jugos gástricos. Finalmente el pasto digerido pasaba al intestino para su absorción (Figura 20 D).

También se ha descrito que en el rumen se suele producir una excesiva degradación de las proteínas del forraje (hasta un 70%) por proteólisis microbiana. Esta degradación genera amonio y ácidos grasos volátiles como productos finales. Este proceso involucra diversas actividades microbianas como la hidrólisis de la proteína mediante proteasas, la degradación de péptidos por peptidasas y, finalmente, la desaminación y fermentación de la cadena carbonada (Cotta y Hespell 1984). Por tanto, se calcula que tan sólo un 30% de las proteínas del forraje pasan al intestino delgado para su absorción. Además, el amonio producido se excreta como urea en la orina.

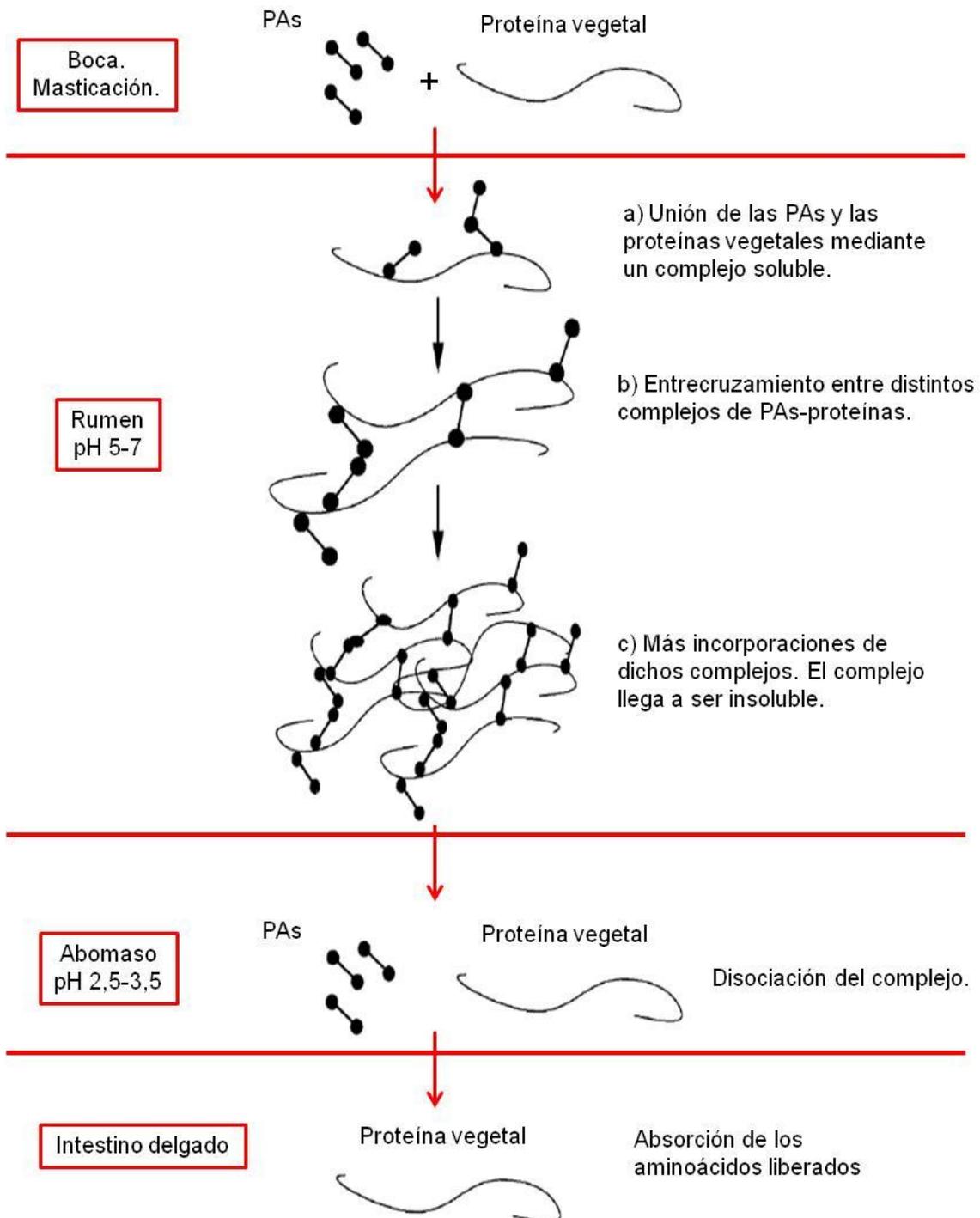
McAllister 1994 indicó que las PAs previenen, o al menos interfieren, en la unión de los microorganismos del rumen a las proteínas vegetales, evitando de este modo que se produzca la proteólisis y también el desarrollo del meteorismo. Las PAs presentan una gran diversidad estructural entre las distintas especies, pero una característica que tienen en común entre todas ellas es que son capaces de precipitar proteínas. El proceso de unión de las PAs y las proteínas es complejo y depende de la cantidad, de la estructura y del tamaño de ambos. Las proteínas que muestran más afinidad por las PAs son relativamente grandes e hidrofóbicas, tienen una estructura abierta, flexible y son ricas en prolina. Estos complejos están formados principalmente por enlaces de hidrógeno y han demostrado ser dependientes del pH.



**Figura 20. Meteorismo del ganado producido por acumulación de gases en el rumen que puede llegar a producir su muerte por asfixia. (A).** Ganado con síntomas de meteorismo y muerte por asfixia. **(B).** Cánula utilizada para extraer los gases del rumen por perforación. **(C).** Colocación de la cánula en la res. **(D).** Esquema del aparato digestivo poligástrico de un rumiante mostrando los diversos compartimentos. El pasto pasa primero de la boca al rumen o panza por el esófago (trazos verdes) donde se almacena. Posteriormente pasa de nuevo en porciones a la boca a través del retículo o redecilla (trazos rojos) para su masticación y de nuevo por el esófago pasa esta vez al omaso o libro (trazos azules) y después al abomaso o cuajar (estómago verdadero) para su completa digestión. Finalmente pasa al intestino para su absorción (trazos negros).

El mecanismo de acción de las PAs comienza en el rumen (pH 6.0-7.0) uniéndose a las proteínas vegetales ingeridas por el ganado y reduciendo la proteólisis microbiana producida por la flora ruminal. La formación de estos complejos con las proteínas hace que sean más inaccesibles a los microorganismos del rumen. Posteriormente las proteínas pasan al abomaso (estómago) con un pH de 2.5-3.5,

donde se producirá la disociación del complejo mediante una hidrólisis enzimática con rotura de puentes de hidrógeno y de este modo, se llevará a cabo la absorción de los aminoácidos liberados en el intestino delgado (Figura 21).



**Figura 21. Representación del mecanismo de interacción entre PAs y proteínas vegetales en el aparato digestivo de los rumiantes (adaptado de Charlon *et al.* 2002).**

El valor alimenticio (“feeding value”, FV) de un forraje específico se define como la respuesta en producción animal y es determinado por la cantidad de forraje consumida voluntariamente por el ganado (voluntary feed intake, VFI) y el valor nutritivo de dicho forraje (“nutritive value”, NV). Además, el valor nutritivo se define como la concentración de nutrientes en un forraje o la respuesta del animal en producción de carne, leche o lana por unidad de materia seca comida. Por tanto, FV está en función tanto de NV como de VFI ( $FV = VFI \times NV$ ). El efecto de las PAs sobre el valor alimenticio de los forrajes está determinado por una combinación de factores que influyen sobre VFI y NV, como son el proceso de digestión y la eficiencia en la utilización de los nutrientes digeridos. Por ejemplo, concentraciones elevadas de PAs provocan la disminución de la digestibilidad de las plantas que los contienen y la ingestión voluntaria en los animales que los consumen por problemas de palatabilidad debido al sabor amargo que provocan, es decir, disminuye el valor de VFI (Ramos *et al.* 1999). Por tanto, concentraciones apropiadas de PAs pueden ser muy efectivas a la hora de aumentar la absorción de aminoácidos por parte del ganado, incrementándose con ello el valor nutritivo del forraje ya que se produciría un mejor aprovechamiento de la proteína en el intestino (Frutos *et al.* 2004). Se ha estimado que la cantidad de PAs en un forraje que resulta efectiva para proteger al ganado del meteorismo e incrementar su valor alimenticio, está entre 25 y 45 g kg<sup>-1</sup> de materia seca (DM), (Aerts *et al.* 1999; McMahon 2000; Phelan *et al.* 2015; Waghorn 1994).

Actualmente, la dieta forrajera del ganado se complementa con agentes antiespumantes (siliconas, aceites vegetales, grasas animales emulsionadas, etc.) que tienen una acción directa sobre la espuma, impidiendo su formación al mezclarse con los constituyentes que la generan (principalmente proteínas solubles) y disminuyendo sus propiedades espumantes (Hall *et al.* 1994). Otra opción es la mezcla con otro forraje que contenga naturalmente moderados niveles de PAs en sus hojas (Li *et al.* 1996). Ambas opciones son económicamente costosas y sería mucho más efectiva la inducción de la síntesis de PAs en la propia planta ya que tendría un mayor efecto beneficioso suministradas dentro de la matriz alimentaria (alfalfa) que utilizadas como suplemento (sinergias, biodisponibilidad, etc.).

En el caso concreto de la alfalfa, el contenido de proteína de la planta es elevado pero no tiene taninos condensados en sus partes vegetativas (Tabla 1). Por tanto, la presencia moderada de PAs en la planta de alfalfa tendría varios efectos beneficiosos para el ganado ya que se unirían en el rumen de las vacas y ovejas a las proteínas vegetales procedentes del forraje y retardarían su digestión, la cual se realiza

normalmente de forma rápida en los rumiantes (efecto by-pass). Este retardo prevendría el hinchamiento por gases en los animales mediante la formación de un complejo PAs-proteínas que reduciría la estabilidad de la espuma, y por otro lado reduciría la desaminación de las proteínas, con lo que se incrementaría la absorción de aminoácidos en el duodeno y se mejoraría la eficiencia de conversión de la proteína vegetal en animal. Además, las PAs reducirían la producción de gases de efecto invernadero y la presencia de parásitos gastrointestinales en el ganado. Su presencia en la planta también inhibiría las posibles mordeduras de determinados insectos fitófagos (Waghorn 1990; Niezen *et al.* 1998; Aerts *et al.* 1999; McMahon *et al.* 2000; Thompson 2000).

Leguminosas forrajeras	Taninos condensados (g/kg DM)			
	Extraíbles	Unidos a proteína	Unidos a fibra	Total
<i>Lotus pedunculatus</i>	61	14	1	76
<i>Lotus corniculatus</i>	36	9	2	47
<i>Hedysarum coronarium</i>	33	9	3	45
<i>Onobrychis vicifolia</i>	29	--	--	29
<i>Trifolium pratense</i>	0,4	0,6	0,7	1,7
<i>Medicago sativa</i>	0	0,5	0	0,5

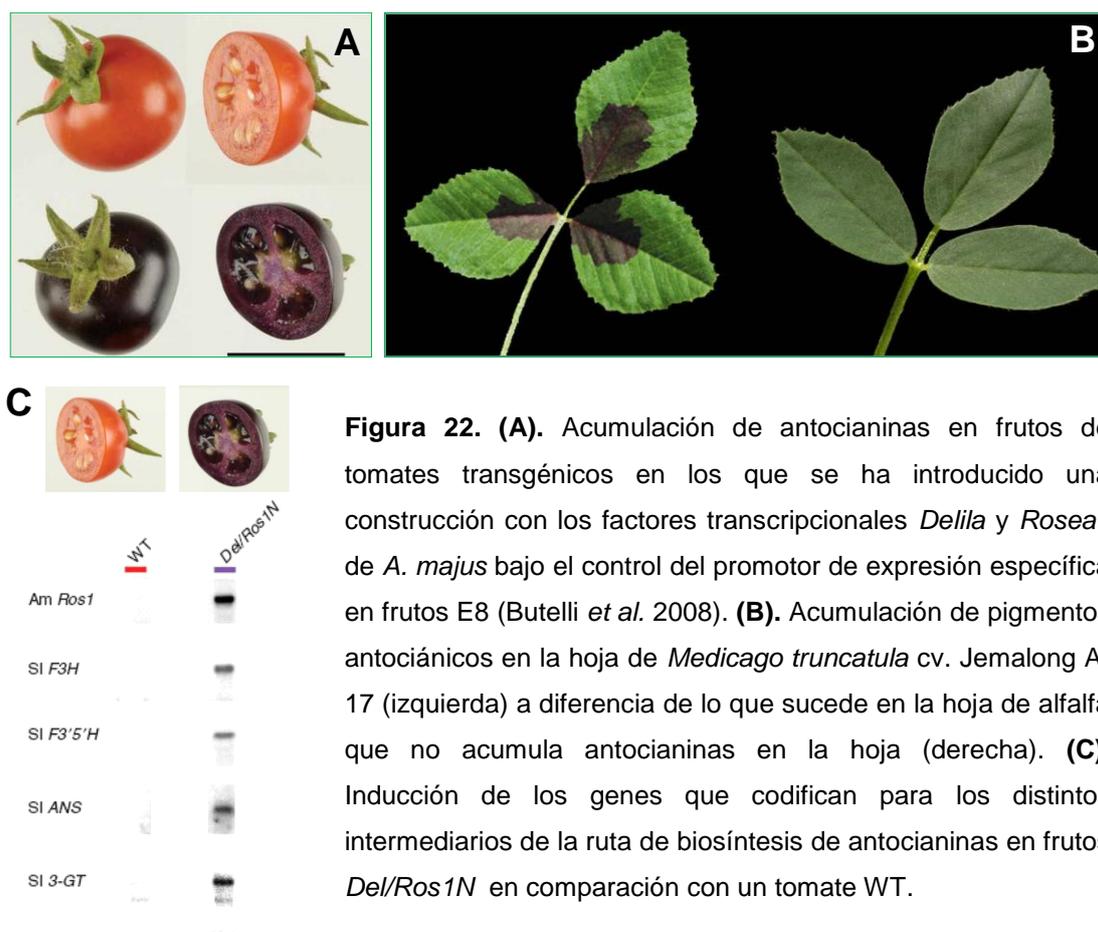
**Tabla 1. Taninos condensados extraíbles y unidos a proteína o fibra en distintas leguminosas forrajeras.** Las leguminosas forrajeras con mayor contenido en proteína, como la alfalfa (*M. sativa*), son las que tienen un menor contenido en taninos condensados (Phelan *et al.* 2015).

### 3.2.2. Aproximaciones realizadas para intentar la activación de la ruta de biosíntesis de antocianinas y de PAs en alfalfa

Como ya se ha comentado anteriormente, a diferencia de *M. truncatula* (cv. Jemalong A-17) la alfalfa no acumula pigmentos antociánicos en las hojas y tallos (Figura 22 B), excepto durante la senescencia o de forma local bajo determinadas condiciones de estrés (p.e mordeduras de insectos, frío intenso). Sin embargo, dichos pigmentos se acumulan en la cubierta de la semilla de alfalfa, lo que nos indica que los genes estructurales implicados en la biosíntesis de PAs están presentes en su genoma (Wettstein 2007).

Los métodos clásicos de mejora no han conseguido hasta la fecha la producción de PAs en las hojas de alfalfa y este problema requiere una solución biotecnológica (Lees 1992). Teniendo en cuenta que tanto las PAs como las antocianinas (que también están ausentes en las partes aéreas de la alfalfa) tienen los mismos precursores, una aproximación para abordar este problema sería transformar la planta primero con uno o más factores de transcripción que, cuando se expresen ectópicamente, induzcan la producción de antocianinas (Lloyd *et al.* 1992) y luego inducir la co-expresión de las dos enzimas que participan en la biosíntesis de PAs, tales como la antocianidin reductasa (ANR) y la leucoantocianidin reductasa (LAR), necesarias para sintetizar las PAs monoméricas y poliméricas (Dixon *et al.* 2005) y posteriormente acumularse (Xie *et al.* 2006). De esta forma evitaríamos la utilización de procesos iterativos para introducir los distintos transgenes en la planta, tales como rondas sucesivas de cruces entre diferentes líneas transgénicas o la transformación secuencial de plantas transgénicas con transgenes adicionales.

En los últimos años se han publicado diversos artículos sobre factores transcripcionales (TFs) que regulan la ruta de flavonoides en diferentes tejidos o en respuesta a estreses. Los factores de tipo MYB y los llamados *basic helix-loop-helix* (bHLH) generalmente actúan conjuntamente en un complejo para regular la expresión de los genes que codifican las enzimas que catalizan cada paso de la ruta de biosíntesis de flavonoides (Figura 17) (Deluc *et al.* 2006; Gong *et al.* 1999; Grotewold 2006; Li *et al.* 2007; Park *et al.* 2007; Ramsay *et al.* 2003; Robbins *et al.* 2003; Sweeney *et al.* 2006). La rama de la ruta de biosíntesis de flavonoides que da lugar a la producción de antocianinas se activa en las flores de *Antirrhinum majus* por dos TFs: *Rosea1* (codifica un TF de tipo MYB) y *Delila* (codifica un TF de tipo *basic helix-loop-helix*), (Schwinn *et al.* 2006). Plantas de tomate que expresan ectópicamente *Rosea1* y *Delila* bajo el control del promotor E8, de expresión específica en el fruto, acumularon altos niveles de pigmentos antociánicos en sus frutos (Butelli *et al.* 2008). La acumulación de antocianinas en los frutos de tomates transgénicos *Del/Ros1* se produjo como resultado de la activación de la mayoría de los genes que codifican las enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de flavonoides (Figura 22 A y C). Hasta la fecha, la funcionalidad de ambos TFs no ha sido analizada mediante transformación estable en otras especies vegetales (incluyendo leguminosas), motivo por el cual podría ser interesante su estudio en una leguminosa forrajera como la alfalfa para comprobar si son capaces de inducir la síntesis *de novo* de antocianinas en las partes aéreas de la planta.



**Figura 22.** (A). Acumulación de antocianinas en frutos de tomates transgénicos en los que se ha introducido una construcción con los factores transcripcionales *Delila* y *Rosea1* de *A. majus* bajo el control del promotor de expresión específica en frutos E8 (Butelli *et al.* 2008). (B). Acumulación de pigmentos antociánicos en la hoja de *Medicago truncatula* cv. Jemalong A-17 (izquierda) a diferencia de lo que sucede en la hoja de alfalfa que no acumula antocianinas en la hoja (derecha). (C). Inducción de los genes que codifican para los distintos intermediarios de la ruta de biosíntesis de antocianinas en frutos *Del/Ros1N* en comparación con un tomate WT.

La disponibilidad de tecnología y de conocimientos básicos sobre el funcionamiento de la vía de biosíntesis de antocianinas está ganando día a día una mayor importancia económica y se está utilizando en sectores tan importantes como el la nutraceútica y el agroalimentario. Un mejor conocimiento de las vías de síntesis de antocianinas y PAs en el caso de la alfalfa y la identificación de los genes que controlan esos procesos permitirá en un futuro su mejora biotecnológica y la producción de forrajes de mayor calidad y valor nutritivo.

### 3.3. GOLDENBRAID 2.0: un interesante sistema de ensamblaje multigénico por módulos

La ingeniería metabólica, la producción de proteínas recombinantes o la manipulación de determinadas redes genéticas, generalmente necesitan la incorporación de varios transgenes en el correspondiente modelo biológico. La mayoría de los caracteres agronómicos de interés son poligénicos, por tanto la introducción de nuevas rutas genéticas o la modificación de las ya existentes puede

requerir la incorporación simultánea de varios transgenes a la planta (Farre *et al.* 2013; Ruiz-Lopez *et al.* 2012). En las últimas décadas, diferentes problemas técnicos que limitaban el número de genes que se podían transferir a las plantas han supuesto un importante cuello de botella para el progreso en la biotecnología de plantas (Capell y Christou 2004; Dafny-Yelin y Tzfira 2007; Halpin 2005).

Los primeros métodos de transformación genética de plantas se desarrollaron con la intención implícita de introducir uno o dos genes (generalmente un transgen primario y uno de selección o marcador) y luego se han optimizado sobre esta base (Twyman *et al.* 2002). Como ya se ha comentado anteriormente, los genes pueden ser introducidos en las plantas utilizando procesos iterativos, tales como rondas sucesivas de cruces entre diferentes líneas transgénicas (Datta *et al.* 2002; Ma *et al.* 1995) o transformación secuencial de plantas transgénicas con transgenes adicionales (Jobling *et al.* 2002; Lapiere *et al.* 1999M; Qi *et al.* 2004). Ambos métodos tienen dos grandes inconvenientes: el largo y trabajoso proceso que supone la producción de varias generaciones de mejora y el hecho de que los diferentes transgenes no estarán ligados, produciéndose su segregación en las siguientes generaciones (Halpin *et al.* 2001).

La principal aplicación de la transferencia múltiple de genes hasta ahora ha sido el análisis y la modificación de rutas metabólicas. La ingeniería metabólica implica incluir en el abordaje un gran número de genes y de mecanismos *feedback* y esto no puede ser realizado utilizando aproximaciones de un solo gen (Jiang *et al.* 2013; Naqvi *et al.* 2009). Una aproximación alternativa es la construcción modular de dispositivos genéticos utilizando partes de DNA estandarizadas. El diseño modular facilita la ingeniería combinatorial, ya que las partes de DNA estandarizadas pueden ser fácilmente intercambiadas mejorando con ello las posibilidades del proceso de construcción. GoldenBraid 2.0 (GB 2.0) es una plataforma estandarizada de ensamblaje de DNA desarrollada para facilitar la ingeniería multigénica en plantas mediante la incorporación simultánea de varios transgenes. GB 2.0 permite la combinación binaria de múltiples ensamblajes utilizando un conjunto de reglas sencillas. Este nuevo sistema de clonaje facilita la reusabilidad de las partes de DNA y dispositivos ensamblados para realizar eficazmente construcciones complejas (Sarrion-Perdigones *et al.* 2011; Sarrion-Perdigones *et al.* 2013; Sarrion-Perdigones *et al.* 2014).

---

# OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

El cultivo de leguminosas forrajeras de calidad constituye una fuente segura de alimento para el ganado rumiante, evitando de esta manera los efectos negativos de su alimentación con piensos que muchas veces incorporan desechos animales de dudosa procedencia y deficiente estado sanitario. Dentro de este grupo sería particularmente interesante acometer programas de mejora aplicables a la alfalfa (*Medicago sativa* L.), el forraje más cultivado a nivel mundial debido a sus cualidades nutritivas. Sin embargo, la mejora genética de esta especie por métodos convencionales para la obtención de nuevas variedades es bastante complicada debido a su naturaleza tetraploide y elevada heterocigosidad. El campo de la ingeniería genética podría resultar una herramienta útil y complementaria para los programas de mejora tradicional de cultivos de interés agronómico como la alfalfa.

### Objetivo general e hipótesis de trabajo

El **objetivo general** de esta Tesis ha sido el diseño y su posterior validación en modelos experimentales de herramientas moleculares para la manipulación de determinados caracteres de interés agronómico en la alfalfa, con objeto de abordar en un futuro su mejora mediante aproximaciones biotecnológicas. En este sentido, nos propusimos como primer objetivo la puesta a punto de un protocolo eficiente para la transformación genética de esta leguminosa forrajera que nos permitiera obtener un buen número de plantas modificadas genéticamente para el abordaje de los otros dos objetivos de la Tesis. Una vez conseguida esta herramienta imprescindible, hemos intentado retrasar el tiempo de floración en esta especie mediante la expresión constitutiva de un gen represor del tiempo de floración. Nuestra hipótesis de partida consistía en que si retrasábamos la entrada en floración de la planta prolongaríamos su desarrollo vegetativo con el consecuente incremento de biomasa y por tanto del contenido en proteína por planta, incrementándose así su valor nutricional. También nos propusimos diseñar distintas construcciones multigénicas con objeto de activar *de novo* la ruta de biosíntesis de antocianinas en la alfalfa, para posteriormente desviarla hacia la producción de proantocianidinas (PAs) o taninos condensados. En este objetivo nuestra hipótesis de partida suponía que la presencia en este forraje de PAs impediría, por un lado el hinchamiento por gases o meteorismo en el ganado rumiante, y por otro la excesiva desaminación de las proteínas en el rumen, lo que implicaría un mejor aprovechamiento digestivo de las mismas y por tanto también se incrementaría el valor nutricional del forraje.

## Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta Tesis son:

**Objetivo 1.** Diseño de una metodología eficiente para la transformación genética de la alfalfa (*Medicago sativa* L.).

**Objetivo 2.** Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* de *M. sativa* para su posible uso como herramienta biotecnológica para retrasar el tiempo de floración en la alfalfa.

**Objetivo 3.** Diseño de construcciones multigénicas en el sistema GoldenBraid 2.0 y validación funcional en sistemas modelo para activar *de novo* la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas. Validación de su uso como posible herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa.

---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material biológico

#### 1.1. Material vegetal

En la tabla 2 se muestran las distintas plantas utilizadas en este trabajo.

Planta	Variedad /ecotipo	Uso
<i>Medicago sativa</i>	Regen SY27	Transformación genética estable. Aislamiento de <i>MsTFL1a</i> y <i>MsTFL1c</i>
<i>Medicago sativa</i>	Regen SY4D	Transformación genética estable
<i>Medicago sativa</i>	Aragón	Control nivel de ploidía. Transformación genética estable
<i>Medicago truncatula</i>	2HA	Aislamiento <i>MtANR</i> y <i>MtLAR</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>		Transformación genética transitoria
<i>Nicotiana tabacum</i>	Otawa	Transformación genética estable
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col)	Transformación genética estable

**Tabla 2. Plantas utilizadas en este trabajo y su uso.**

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas en este trabajo para la extracción de ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización. Las muestras destinadas a estudios de microscopia se fijaron para ser procesadas posteriormente según se explica en el apartado 2.

#### 1.1.1. Condiciones de cultivo de las plantas

##### 1.1.1.1. Cultivo de *Medicago sativa* y *Medicago truncatula*

Las semillas de *M. sativa* y *M. truncatula* se escarificaron mecánicamente frotando con papel de lija hasta ver claros signos de abrasión en la cubierta de las mismas.

Posteriormente, se esterilizaron por inmersión en una solución al 25 % de lejía comercial durante 15 minutos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas se colocaron en placas Petri con un soporte de papel de filtro estéril humedecido, se sellaron con "Parafilm" y se almacenaron en oscuridad durante 2 días a temperatura ambiente. Después se realizó una incubación a 4 °C durante 3 días más con la finalidad de sincronizar la germinación de las plántulas (estratificación).

Las plántulas de *M. sativa* y *M. truncatula* procedentes de la germinación de semillas se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 12 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue una mezcla de turba, perlita y vermiculita en una proporción 1:1:1. Se colocaron en bandejas y se regaron por inmersión con solución de Hoagly nº 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt 1966). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad y evitar contaminaciones con otras semillas procedentes de plantas próximas.

Al aparecer el primer par de hojas aproximadamente o ver condensación en el plástico que las recubría, se agujereó el mismo en distintos puntos de la bandeja que fueron incrementándose hasta que se eliminó el plástico por completo al cabo de tres días.

Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero o en cámara de cultivo (fitotrón). Las condiciones de temperatura fueron de 22 °C durante el día y 18 °C durante la noche, con un fotoperiodo inductivo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL). La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 W.

#### **1.1.1.2. Cultivo de *Nicotiana benthamiana* en maceta**

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba:vermiculita (1:1) previamente esterilizada, en una cabina de invernadero bajo condiciones controladas y con una temperatura de 24 °C durante el día y 18 °C durante la noche. La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 W [Phillips HDK/ 400 HPI ®, N], para mantener un fotoperiodo de día largo. El riego consistió en solución de Hoagly nº 1 aportada mediante un sistema de riego por goteo automatizado durante 2 min, 4 veces al día.

### 1.1.1.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en macetas

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en alveolos y en macetas de 12 cm. El sustrato utilizado era una mezcla de turba, perlita y vermiculita en una proporción 1:1:1. El riego se hizo con la solución nutritiva de Hoagland nº1. La temperatura se mantuvo en 22 °C durante el día y 19 °C durante la noche. Al igual que en *Medicago*, se mantuvo un fotoperiodo de día largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## 1.2. Microorganismos

### 1.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se han utilizado en este trabajo se detallan en la tabla 3.

Microorganismo	Cepa	Uso	Tª
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Transformación de bacterias	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	Transformación de bacterias	37 °C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL1	Transformación de plantas	28 °C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58	Transformación de plantas	28 °C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Transformación de plantas	28 °C

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

### 1.2.2. Condiciones de cultivo de los microorganismos

Los cultivos líquidos bacterianos de *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 28 °C respectivamente con agitación de 200 rpm. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en placas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37 °C y tres días a 28 °C respectivamente.

### 1.2.3. Medios de cultivo para microorganismos

El medio utilizado para el crecimiento de los cultivos bacterianos, tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens* fue:

- Medio LB (medio Luria-Bertani): 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1%

NaCl, pH 7.0. Cuando se utilizó el medio sólido, éste se solidificaba mediante la adición de 1'5% de agar (Pronadisa).

Cuando el medio se ha enfriado a 55°C, se añaden los antibióticos correspondientes estériles (filtración).

## **2. Procesamiento de material vegetal para microscopía**

### **2.1. Fijación de tejido vegetal**

Las muestras vegetales se introdujeron en FAE (50% EtOH, 5% ácido acético glacial y 4% de formaldehído). Para ayudar a la penetración del fijador se realizaron tres pulsos de vacío de 10 min cada uno, se cambió la solución por una fresca y se mantuvieron a 4 °C durante 16 horas. Tras el proceso de fijación de los tejidos se procedió a deshidratar el tejido mediante una serie de lavados sucesivos de 30 min a 4 °C en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50% y 70%). A partir de este punto, las muestras se mantuvieron en etanol 70% a 4 °C hasta el momento de ser incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sigma).

### **2.2. Inclusión de tejido vegetal en parafina**

Para la inclusión en parafina se utilizó un procesador de tejidos (Leica TP1020) el cual se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado fue el siguiente: en primer lugar las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol durante una hora cada una (70, 90, 90, 95, 95 y 100%). En la segunda concentración de 95% las muestras se tiñeron con Eosina-Y al 0,2%. Posteriormente se sumergieron tres veces en Histo-Clear® (National Diagnostics) y finalmente se transfieren a parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) fundida a 58 °C aplicando vacío.

Tras la inclusión en parafina las muestras se colocaron en moldes de aluminio con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4 °C. Se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

### **2.3. Procesamiento de las muestras incluidas en parafina**

Posteriormente, en las muestras incluídas en parafina se realizaron cortes histológicos de 20 µm de espesor utilizando un microtomo Microm HM330, y se depositaron sobre portaobjetos tratados con poly-lisina.

Las secciones de tejidos incluídos en parafina una vez secas y fijadas sobre los portas, se desparafinaron en Histo-Clear durante 10 min, luego se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol/agua (100%, 70%, 50%), durante 1 min cada vez y finalmente se lavaron con agua destilada. Los cortes se tiñeron con toluidina al 0,5% durante un minuto y luego se lavaron con abundante agua. Finalmente los cortes se montaron con Merckoglass (Merck®) y se visualizaron mediante microscopía óptica.

## **3. Técnicas de fotografía y microscopía**

### **3.1. Fotografía digital**

Para adquirir las imágenes deseadas de plantas de *M. sativa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* y *A. thaliana* a gran escala, se utilizó una cámara digital COOLPIX P80 (Nikon) de 10,1 megapíxeles y con un objetivo NIKKOR zoom de 18 aumentos. Esta cámara permitió tomar fotografías de las plantas completas, así como de flores completas cuyo tamaño superaba el campo de visión de un microscopio estereoscópico.

### **3.2. Microscopía**

#### **3.2.1. Microscopía estereoscópica**

Para observar tejidos a bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular Leica MZ16F, que estaba acoplada a una cámara digital Leica DFC300 FX. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software LAS (*Leica Application Suite*) versión 2.6.0 R1.

### 3.2.2. Microscopía óptica

Los cortes histológicos se visualizaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E600, utilizando iluminación de campo claro y la técnica de Normaski o D.I.C (contraste diferencial por interferencia). El microscopio estaba acoplado a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1). Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0.

### 3.2.3. “Software” empleado para el tratamiento de imágenes

El procesado y tratamiento de imágenes de micorscopía se realizó con ImageJ, un potente programa para el procesado de imágenes creado por “*The National Institutes of Health*”. Programado en Java, es de dominio público, funciona tanto en Windows como Mac y Linux. La página web oficial es <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, en ella se puede realizar la descarga y contiene manuales de uso para las diferentes aplicaciones del programa.

## 4. Métodos de biología molecular

### 4.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

#### 4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se realizaron a partir de cultivos bacterianos de 3 ml crecidos durante una noche en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema Rapid Plasmid Miniprep System de Marligen Biosciences, Inc.

#### 4.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *Agrobacterium* se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 ml, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El sedimento de células resultante de centrifugar el cultivo se resuspendió en 100 µl de solución I y se trató tal

como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Al sobrenadante resultante de la centrifugación a que se somete el lisado obtenido tras añadir la solución III se le añadió 900 µl de etanol absoluto y se incubó 30 min a -80 °C. Tras centrifugar a 12000 rpm 5 min a temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 25 µl de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8).

La pureza de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no era suficientemente alta para realizar análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1 µl de esta preparación de DNA se utilizaba para transformar *E. coli*. De uno de los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de este modo, se hacía una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizaba para los análisis pertinentes.

#### **4.1.3. Aislamiento y cuantificación de DNA genómico**

Para confirmar la presencia de los genes foráneos en las plantas presuntamente transgénicas, se ha utilizado el análisis molecular basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se requiere la extracción de DNA genómico, para ser utilizado como DNA molde en la reacción de PCR. Se han utilizado tres protocolos distintos de aislamiento de DNA genómico durante el desarrollo de este trabajo.

El DNA genómico utilizado para genotipar mediante PCR fue aislado a partir de 300 mg de hojas jóvenes, que se maceraron en 500 µl de tampón de extracción (0,2 M Tris-HCl pH 9,0; 0,4 M LiCl; 25 mM EDTA; 1% v/v SDS). Tras una centrifugación de 5 min a 13000 rpm, 350 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf que contenía 350 µl de isopropanol y la mezcla se centrifugó de nuevo durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con etanol al 70% (v/v) 2 veces. El sedimento se dejó secar y se resuspendió en 200 µl de agua destilada.

Para el genotipado de las plantas a partir de hojas, también se utilizó el sistema E.Z.N.A® Plant DNA Kit de OMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación de fragmentos a partir de DNA genómico de mayor pureza y mejor calidad, se utilizó el reactivo Plant DNAzol® de Invitrogen™. La extracción se hizo a partir de 100 mg de tejido congelado en nitrógeno líquido, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del DNA se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

#### **4.1.4. Aislamiento del RNA total**

La extracción de RNA total se realizó a partir de 100 mg de tejido vegetal congelado en nitrógeno líquido, siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). El RNA se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies) a 260 nm. Posteriormente se trató en su totalidad con DNasa utilizando el Ambion's DNA free-kit (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA obtenido se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### **4.2. Métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

#### **4.2.1. Amplificación de fragmentos de DNA**

Para generar fragmentos de DNA para clonación o para genotipado, se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR; (Saiki *et al.* 1988), utilizando oligonucleótidos específicos y como molde DNA de diversa naturaleza, incluyendo DNA plasmídico o genómico, fragmentos obtenidos por PCR o cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción del RNA.

Para amplificar fragmentos por PCR se utilizó DNA polimerasa (*Biotoools*®). En algunos casos donde se requería la obtención de fragmentos con alta fidelidad de copia, se utilizó TaKaRa Ex Taq™ (TaKaRa). Cabe mencionar que en la mezcla de reacción de esta última no se requiere adición de MgCl<sub>2</sub>. Estas enzimas tienen sus propios tampones de reacción que se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El diseño de los oligonucleótidos específicos para cada gen se realizó de forma manual teniendo en cuenta la longitud (entre 16 y 25 nucleótidos), contenido de GC superior al 40%, extremos 3' ricos en GC y temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) similar en cada pareja de cebadores. La información sobre los oligonucleótidos se especifica en la tabla 4.

Para todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo indistintamente en los termocicladores Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 o CS Cleaver Scientific Ltd GTC Thermal Cycler 54. La mezcla de reacción contenía 0,4  $\mu\text{M}$  de cada uno de los oligonucleótidos específicos del fragmento a amplificar, 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM, 5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 10X, 1,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM y 1,25 unidades de DNA polimerasa (*Biotoools*®) en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ .

Los programas de amplificación estándar consistieron en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C; seguida de 25-35 ciclos de amplificación y finalmente una extensión de 10 minutos a 72 °C. Cada ciclo de amplificación consistió en tres etapas: la primera de desnaturalización 94 °C durante 30 s; luego una de anillamiento de 30 s a la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos utilizados (T), la cual se consideró en función de la temperatura de fusión estimada ( $T_m$ ) de cada uno de ellos (tabla 4); y la tercera etapa de 72 °C durante 1 minuto/kb que corresponde a la extensión.

#### **4.2.2. Transcripción reversa (RT)**

Para los experimentos de RT-PCR (apartados 4.2.3 y 4.2.4), se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa del RNA. A partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total previamente tratado durante 30 min con una DNasa (Turbo DNA-free de Fermentas™), se realizó la síntesis de la primera cadena del cDNA para lo cual se utilizó el sistema Primer Script RT reagent kit® (TaKaRa), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basa en la acción de la retrotranscriptasa de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), y como cebador se utiliza una mezcla de oligo (dT) y hexámeros.

#### **4.2.3. RT-PCR semicuantitativa**

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  de cDNA como molde de la PCR, obtenido según se describe en el apartado anterior. Las condiciones de la PCR fueron iguales a las descritas.

GEN	Oligonucleótido 5'-3'	Tm (°C)	Uso
<i>MtANR-F1</i>	GCGCCGTCTCACTCGAATGGCTAGTATCAAACAA ATAGAAATAG	79,1	Amplificar fragmento para construcción GB
<i>MtANR-R1</i>	GCGCCGTCTCATCCCTAACAGTAGTATTAACAG	73,2	
<i>MtANR-F2</i>	GCGCCGTCTCAGGGACCTAGATAGTGCAAACAAA AC	80,2	
<i>MtANR-R2</i>	GCGCCGTCTCTCGCTCGAAGCTCACTTGATCCC CTGAGTCTTC	88,1	
<i>MtLAR-F1</i>	GCGCCGTCTCACTCGAATGGCACCATCATCATCA CCAACC	89,2	Amplificar fragmento para construcción GB
<i>MtLAR-R1</i>	GCGCCGTCTCACACGATTGCTCTAGGAATTTTC	79,7	
<i>MtLAR-F2</i>	GCGCCGTCTCACGTGTCTGAAGACGATCTTCTAG	80,2	
<i>MtLAR-R2</i>	GCGCCGTCTCGCTCGAAGCTCAACAGGAAGCTG TGATTGGC	89,8	
<i>MsTFL1a ATG DIR</i>	ATGGCAAGAATGTCTCAAGAAC	53,3	Amplificar fragmento para construcción expresión constitutiva (35S)
<i>MsTFL1a STOP REV</i>	GGCTAGCGTCTTCTTGCAGCGG	62,8	
<i>MsTFL1c ATG DIR</i>	ATGGGAAGTATCACTTCAGATCCAC	65,1	Amplificar fragmento para construcción expresión constitutiva (35S)
<i>MsTFL1c STOP REV</i>	CCCTAGCTAGCACGCCTTCTAGGAG	69,6	
<i>M13 CORTO DIRECTO</i>	TTGTAAAACGACGGCCAGT	63,1	Amplificar fragmentos para recombinación Gateway
<i>M13 REVERSO</i>	CAGGAAACAGCTATGACCATG	60	
<i>T7 PROMOTER</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	54	Secuenciar insertos en PCR8
<i>MtEF1-DIR</i>	AGAAGGAAGCTGCTGAGATGAAC	55,3	Amplificar fragmento gen endógeno <i>MsEF1</i>
<i>MtEF1-REV</i>	CTGCTTCACTCCAAGAGTAAATGC	55,7	

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

#### 4.2.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para el análisis de expresión de los genes en estudio se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems™) a partir de las regiones específicas para cada gen (tabla 5).

Las mezclas de reacción para la RT-qPCR se prepararon en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™), en un volumen final de 20 µL, con 3 µL de cDNA (500 ng/µL), 10 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y los dos oligos en una concentración final 0,3 µM cada uno. La placa se transfirió a un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado con el programa informático específico (Applied Biosystems™), donde se llevó a cabo la amplificación siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. Estas condiciones consistieron en una atemperación de 2 min a 50 °C, una desnaturalización de 10 min a 95 °C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 s a 95 °C y una elongación de 1 min a 60 °C. Para cada cDNA se realizaron tres replicas técnicas. Los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Applied Biosystems™) donde: Ct=Ciclo umbral o “*Threshold Cycle*”, es el ciclo en el que empieza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia.

Para cada muestra:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ muestra referencia}$$

En los análisis se usó como gen endógeno normalizador el gen *ELONGATION FACTOR-1* de alfalfa (*MsEF1*). La secuencia codificante de *MsEF1* se aisló por PCR a partir de cDNA de hojas de *M. sativa*. Para ello, se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos (MtEF1-DIR y MtEF1-REV, Tabla 4) de su homólogo en *M. truncatula* (AES 74993.1). El cálculo comparativo CT es válido cuando las eficiencias de amplificación de los genes en estudio y el gen calibrador son similares. En todos los ensayos de expresión génica las eficiencias de amplificación estaban entre 90- 100%.

#### 4.2.5. Purificación de fragmentos de DNA por producto de PCR

Si la PCR sólo produce el fragmento específico no se necesita purificarlo por electroforesis. Sin embargo, es necesario eliminar dNTPs e iniciadores residuales y ajustarlo a la concentración requerida. La purificación de DNA se llevó a cabo mediante el sistema UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification kit (MO BIO Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante.

GEN	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'
<i>DELILA</i>	GAGGAAGCAACTTGCTATTGCTG	CATTGATGCCTTCTGCCAAATTCG
<i>ROSEA1</i>	GGTAACAAATGGTCGCTGATTGC	CCATCCTCCGTTGTTTCTAGC
<i>MtANR</i>	GCATGTGTGATAGGTGGAC	GACCAGTCCCTTCGAGTTCCG
<i>MtLAR</i>	GGTCGAGTCCTAATTGTTGG	CGTGACCAAATTCTGAAGGC
<i>NbCHS</i>	ATAGGTTCTGATCCAATTCCAG	CTGTGGAGAACAACAGTCTCAACT
<i>NtCHI</i>	ACGGGTAAGCAATACTCAGAGAAG	TAGACTCCAATTTCTGGAATGGT
<i>NtF3H</i>	TATCCAATTCGGGCTAGAGACTAC	GGGTACACTATAGCTTCTGGTGCT
<i>NbDFR1</i>	CCTAGCTTAATCACTGCACCTTCA	ATTGGTTGACTTTCTGTTCCATT
<i>NtANS</i>	CTGGCCTAAAATCCCTACTGACTA	TCTCTTTATTACAAACCCCTCTGT
<i>NbActin</i>	GGATGTGAAGGAGAAGTTGG	GCTCATCTATCAGCAATGC
<i>MsCHS</i>	CAAGTGTATGCGAGTACATG	GTACATCATGTAACGCTTCAC
<i>MtCHI</i>	CAATGATCTTGCCGTTGACG	CGCACCTATCATTGACTCAAGC
<i>MtF3H</i>	GTGCTGGTATGAGTCTTGGTC	GAACGATGATTGGATGAAGGC
<i>MtDFR1</i>	GCAAGGTGTGTGTACAGGTGG	CCGGCTATTGCTGCTTCT
<i>MtANS</i>	GCTTAGCCTTGAGTGGTATATC	CCATAACCTTGAATCTTCCCAG
<i>MsEF1</i>	GTACGCATGGGTTCTTGACA	CGGGTCTGTCCATCCTTAGA
<i>AtUBIQ</i>	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT	CGACTTGTCTATTAGAAAAGAAAGAGATAACAG
<i>qRT-DELILA</i>	TACGGACAAGATTGGAGCCG	GGAATCTTTCAATCGACCTCTG
<i>qRT-ROSEA</i>	GACTAATATCGTAAGACCCCGAGC	GTAACGTGCAATCCGGTGAAGG
<i>qRT-MtANR</i>	CAACTTCTGGTCGATACATTTGC	CGGGAACACTGGTATTGTGAG
<i>qRT-MTLAR</i>	CCACCGTTGGATCAATTGCAC	GTACGCTTTGACATTGCCATG
<i>qRT-MsEF1</i>	AATGGCTGATGAGAACCTGC	CTTATCTCGACAACGCGTGC
<i>MsTFL1a</i>	ATGGCAAGAATGTCTCAAGAAC	GGCTAGCGTCTTCTTGCAGCGG
<i>qRT-MsTFL1a</i>	CAACACTCGTAATTTTGCTTCACA	GCAGCAACAGGGAGACCAAG
<i>MsTFL1c</i>	ATGGGAAGTATCACTTCAGATCCAC	CCCTAGCTAGCACGCCTTCTAGGAG
<i>Higromicina</i>	GTGCTTGACATTGGGGAGTT	GATGTTGGCGACCTCGTT
<i>qRT- CDC3.1</i>	TCATCATCACCAACAACACACTTC	TCATTATCATCGTCTTCCCATTTT
<i>qRT- CDC3.2</i>	ACCAACGACCCATCTGCTACA	AACTTCATCGTCTTCCAAAACA
<i>qRT-CYCMS2</i>	TGGAAACTTCATCGCCATTG	CCAGTCAACTAGTATAGCCC
<i>qRT-CYCA1</i>	TACCCATTGAGTAACATTTGCAGT	CTTTTCCAACCTCAACAAGAATGTCTC

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa y RT-qPCR.**

### 4.3. Técnicas de clonación

#### 4.3.1. Vectores plasmídicos utilizados

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de DNA y de los fines requeridos. En la tabla 6 se detalla la lista de plásmidos, con sus características, la procedencia y el uso que se le ha dado.

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia/ Procedencia</b>	<b>Uso</b>
pGEM® T-easy	Amp <sup>R</sup> , lacZ, promotores T7 y SP6	Promega	Clonaje de fragmentos
pCR8	Spec <sup>R</sup> , sitios attR1 y attR2	Invitrogen™	Clonaje de fragmentos, vector de entrada a la tecnología Gateway
pH7WG2	Spec <sup>R</sup> , promotor constitutivo 35S de CaMV ( <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> )	Invitrogen™	Sobre-expresión del gen <i>MstFL1a</i> y <i>MstFL1c</i>
pDGB_A12C	BsaI GB-reactions Kan <sup>R</sup>		Clonaje multigénico GOLDENBRAID 2.0
pDGB_C12B			
pDGB_A21C			
pDGB_1AB3			
pDGB_3AB2	BsmBI-GB reactions Spec <sup>R</sup>		

**Tabla 6. Plásmidos utilizados.** Los sitios *attL* y *attR*, son sitios de recombinación homóloga correspondientes a la tecnología Gateway<sup>R</sup>. Los antibióticos a los cuales confiere resistencia el plásmido se indican como: espectinomicina (*Spec*), kanamicina (*Kan*) y ampicilina (*Amp*).

#### 4.3.2. Ligación de fragmentos mediante la técnica de recombinación homóloga Gateway (Invitrogen™)

La tecnología Gateway se basa en las propiedades de recombinación de bacteriófago *lambda*, el cual contiene sitios de recombinación bien caracterizados conocidos como att (site-specific *ATTachment*). En primer lugar los productos de PCR amplificados se clonaron en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO TA® (Invitrogen™, EUA), el cual contiene las secuencias de recombinación attL1 y attL2 y dos sitios *EcoRI*, que flanquean el fragmento de interés. Posteriormente, los clones obtenidos se mandaron secuenciar para verificar su secuencia y determinar la orientación del fragmento respecto al promotor T7 del vector. Una vez se determinó la orientación del fragmento clonado, los fragmentos en la orientación adecuada se incorporaron en el

vector de destino del sistema *Gateway* (pH7WG2) que contiene dos lugares de recombinación attR1 y attR2 mediante una reacción de recombinación catalizada por la enzima LR Clonasa (Invitrogen™).

### 4.3.3. Reacciones de ligación de DNA

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una relación estequiométrica inserto:vector de 3:1 ó de 5:1. Para calcular esta relación molar entre un fragmento y un vector concreto se aplicó la ecuación:

$$\text{cantidad de inserto (ng)} = \frac{(\text{cantidad de vector [ng]})(\text{tamaño del inserto [kb]})}{\text{tamaño de vector [kb]}} \times \text{relación molar inserto: vector}$$

La relación que contenía las cantidades de inserto y vector necesarias para obtener las proporciones molares mencionadas, 1X de tampón de ligación (Invitrogen®) y 1 U de T4 DNA ligasa (Invitrogen®) en un volumen total de 10 µl. Las reacciones se realizaron a 16 °C durante 16 h. En las ligaciones con el vector pGEM® T-easy (Promega) se utilizó el kit proporcionado por la casa comercial y se siguieron sus recomendaciones.

### 4.3.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 ml con 5-10 U de la enzima / 1 µg DNA. En cada reacción la enzima iba acompañada de su respectivo tampón según las condiciones recomendadas por la casa comercial. La incubación se realizó en un termobloque Thermomixer confort (Eppendorf®) durante dos horas a 37 °C. Después de la incubación, la digestión se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### 4.3.5. Sistema de clonaje múltiple: GoldenBraid (GB)

#### 4.3.5.1. Clonaje de piezas modulares

Para amplificar fragmentos de DNA por PCR se utilizó TaKaRa Ex Taq™ (TaKaRa) siguiendo las instrucciones mencionadas en el apartado 3.2.1. Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8-1 % (p/v) en tampón

TBE1X y se purificaron usando el sistema UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification kit (MO BIO Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante.

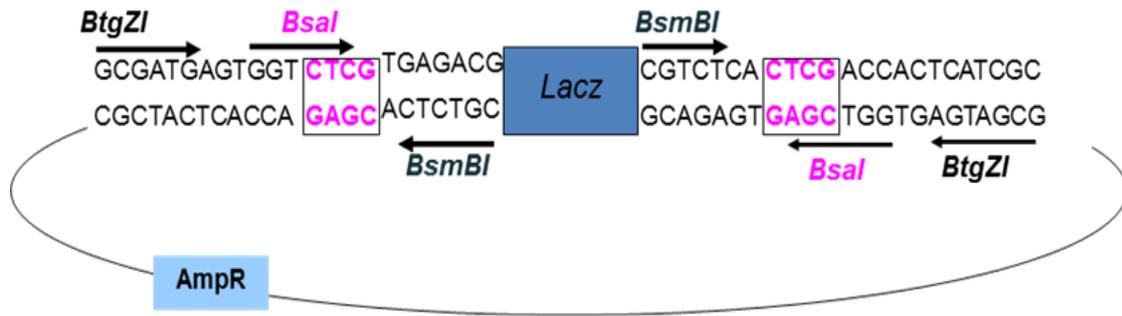
#### **4.3.5.2. Reacción de ensamblaje de piezas modulares por GB: digestión-ligación**

En una reacción GB los fragmentos a ensamblar se incuban en presencia del ERTIIS apropiado (*Bsal* o *BsmbI*) y ligasa T4 en 25 ciclos de digestión (2 min. a 37 °C) y ligación (5 min. a 16 °C) en un único tubo. Esta técnica aumenta notablemente la eficiencia de los ensamblajes pues evita tener que realizar la extracción de los fragmentos a clonar del gel. Se utilizó 1 µl de la reacción para transformar la cepa de *E. coli* DH5α mediante choque térmico. Los clones positivos fueron seleccionados en medio sólido. Las preparaciones de DNA plasmídico fueron extraídas mediante el sistema Rapid Plasmid Miniprep System de Marligen Biosciences Inc. La cuantificación del DNA se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Los clones positivos fueron confirmados mediante análisis de restricción y por secuenciación.

#### **4.3.5.3. Domesticación de las piezas**

##### **A. Fundamentos**

El primer paso en un proceso de construcción de módulos genéticos es la “domesticación de las piezas”. La domesticación pretende adaptar una secuencia de interés (promotor, CDS, terminador, etc.) y hacerla compatible a la gramática y reglas del sistema GB. La secuencia de interés, una vez ha sido domesticada, pasa a denominarse como “pieza”. Para ello, es necesario amplificar la pieza con oligonucleótidos que incorporen los sitios de clonaje *BsmbI* flanqueando la secuencia de interés, y cuatro nucleótidos específicos por cada lado. Estas extensiones, permitirán que durante el proceso de domesticación, la secuencia de interés se inserte en el interior del pUPD (Figura 23).



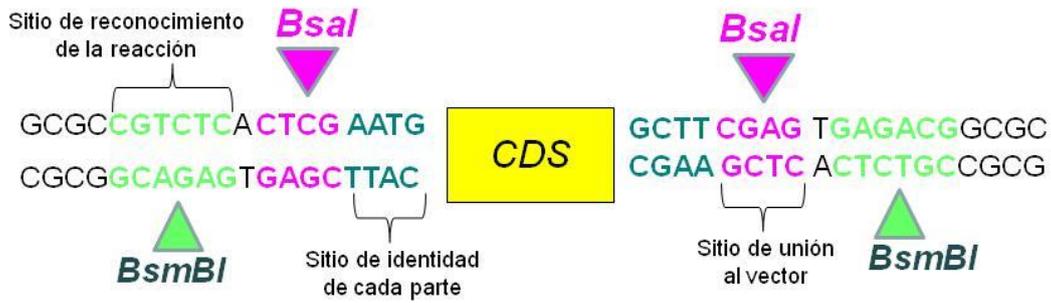
**Figura 23. Representación del plásmido de entrada o pUPD (domesticación).** El gen delator *LacZ* se encuentra flanqueado por un doble sistema de dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bsmbl* y *BsaI*. Las flechas indican la direccionalidad del corte y señalan la secuencia de 4pb que es cortada. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*).

También es muy recomendable eliminar cualquier diana interna que pueda ser reconocida por las enzimas *BsaI* y *Bsmbl*. Esto se consigue mediante la introducción de cambios sinónimos en la secuencia de DNA por amplificación de la pieza en varios fragmentos que permitan flanquear la mutación. Estos amplicones reciben el nombre de retales.

## B. Metodología de la domesticación

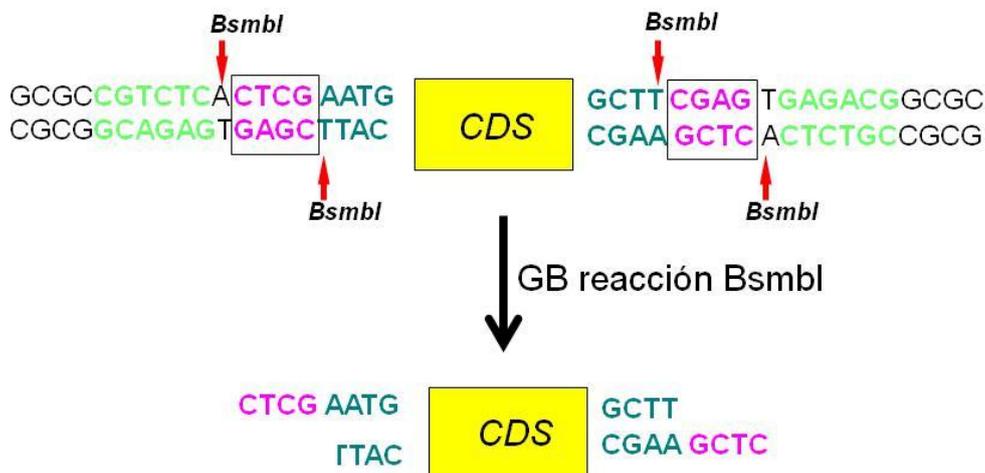
Independientemente del tipo de domesticación, en esta tesis, se siguió la misma metodología para todas las domesticaciones.

En primer lugar se recurrió al Vector NTI para diseñar los diferentes oligonucleótidos, así como realizar una previa validación “in silico” de los posteriores ensamblajes. Estos oligonucleótidos deben contener: el sitio de reconocimiento de *Bsmbl*, el sitio de unión al vector (*BsaI*), el sitio de identidad de cada parte (promotor, CDS, terminador, etc.) y el sitio de unión entre retales (debe tener un nucleótido mutado). Se encargó a la casa comercial Sigma-Aldrich (o IDT DNA en caso de oligonucleótidos largos) su síntesis química. A partir de cDNA se realizaron las pertinentes PCRs, que inmediatamente fueron validadas por electroforesis y purificadas (Figura 24).



**Figura 24. Representación del diseño de oligonucleótidos para la domesticación.** Estos oligonucleótidos deben contener: el sitio de reconocimiento de *Bsmbl*, el sitio de unión al vector (*BsaI*), el sitio de identidad de cada parte (promotor, CDS, terminador, etc.) y el sitio de unión entre retales (debe tener un nucleótido mutado).

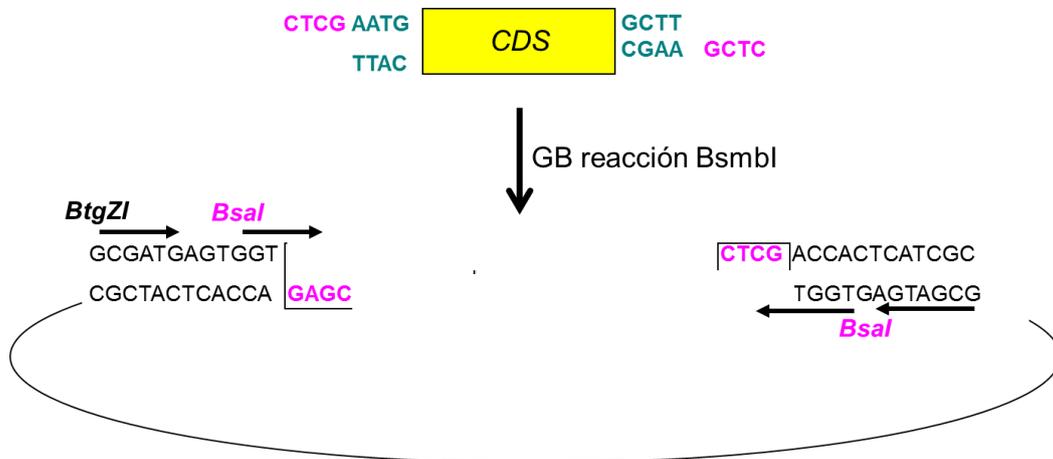
A continuación se realizó una reacción de restricción-ligación con la enzima *Bsmbl*, para unir el amplicón de la secuencia de interés con el pUPD. En el caso de que la secuencia de interés tuviera algún sitio interno que fuera necesario domesticar, se procedió de igual forma, incluyendo las PCRs de los distintos retales en la reacción de restricción-ligación. De este modo, cuando realizamos la reacción de domesticación con *Bsmbl*, dicha enzima digiere algunos nucleótidos más allá del sitio de reconocimiento dejando extremos protuberantes de 4 nucleótidos (Figura 25).



**Figura 25. Sitio de reconocimiento del *Bsmbl* en la reacción de domesticación.**

Así, el plásmido destino pUPD pierde su casete de selección negativa, incorporando en su lugar la pieza de DNA mediante una reacción de ligación entre los extremos protuberantes dejados tras la digestión con *Bsmbl*. Tras la ligación, el

plásmido resultante, que contiene la pieza de DNA ensamblada, pierde todas las dianas de *Bsmbl*, pero mantiene las dianas de *BsaI*, inherentes al plásmido (Figura 26).



**Figura 26. Reacción de domesticación con *Bsmbl*. El plásmido de destino pUPD pierde su casete de selección negativa, incorporando en su lugar la pieza de DNA mediante una reacción de ligación entre los extremos protuberantes dejados tras la digestión con *Bsmbl*.**

Tras la reacción de restricción-ligación se transformó *E. coli* por choque térmico y se sembró en placa con ampicilina, X-Gal e IPTG. Tras la incubación de una noche, 4 colonias blancas fueron picadas y crecidas en cultivo líquido. Tras una nueva incubación de una noche en agitación, se realizó la miniprep de los cultivos líquidos y se verificó, mediante digestión y electroforesis, la presencia de la secuencia de interés. Para asegurar que la pieza generada es correcta, parte de la misma miniprep fue enviada a secuenciar y el resultado fue comparado mediante alineamiento con la secuencia esperada.

#### 4.3.5.4. Ensamblaje multipartito: promotor (PR) + CDS + Terminador (TM)

##### A. Fundamentos

El método multipartito GB presenta un diseño de clonaciones en bucle que hace uso de sólo dos niveles ( $\alpha$  y  $\Omega$ ) que van alternándose entre sí. Ello se consigue mediante el uso de las dos enzimas de restricción anteriormente citadas, utilizándose

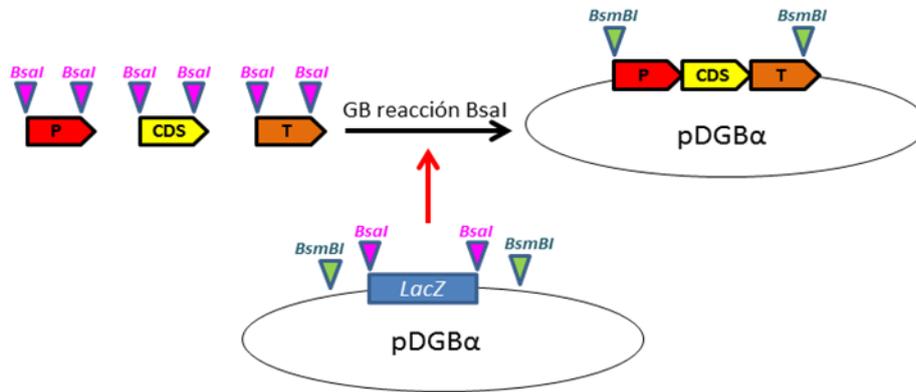
ambas en los dos niveles y con orientaciones invertidas.

## B. Metodología del ensamblaje multipartito

Para ensamblar entre sí 3 piezas de DNA (PR+CDS+TM), previamente incorporadas al precursor, es necesario que se lleve a cabo una reacción de ligación entre los extremos protuberantes dejados tras la digestión con *BsaI*. Cada precursor contiene la pieza original flanqueada por secuencias adicionales que contienen dianas de *BsaI*. Para ello, en la reacción de restricción-ligación se pipetea en un mismo tubo: las distintas piezas GB que van a formar parte de la unidad transcripcional, el plásmido de destino deseado, la enzima de restricción *BsaI* y el resto de reactivos necesarios. De esta forma, tras la digestión con la enzima *BsaI*, la pieza original se desprende del precursor, quedando flanqueada por extremos protuberantes que constituyen en sí mismos las colas necesarias para el ensamblaje. Es decir, la cola en 3' de cada pieza aparece con la cola en 5' de la pieza subsiguiente, la cola en 5' de la primera pieza aparece con el sitio de corte tipo 1, y la cola en 3' de la última pieza aparece con el sitio de corte tipo 2 de los plásmidos tipo  $\alpha$  (pDGB-A12C o pDGB-C12B). Para ello es necesario que el primer precursor contenga un sitio de corte para *BsaI* compatible con el sitio 1, el último precursor contenga un sitio de corte para *BsaI* compatible con el sitio 2 y las piezas adyacentes tengan extremos compatibles

En cada reacción de ensamblaje, el plásmido de destino de nivel  $\alpha$  pierde su casete de selección negativa, incorporando en su lugar el módulo ensamblado mediante una reacción de ligación entre los extremos protuberantes (1 y 2 en los extremos) dejados tras la digestión con *BsaI*. Tras la digestión, el plásmido resultante, que contiene el módulo ensamblado, pierde todas las dianas de *BsaI*, pero mantiene las dianas de *Bsmbl*, inherentes al plásmido (Figura 27).

De este modo, en un solo paso se consigue ensamblar la unidad transcripcional en el plásmido de destino. Con 3  $\mu$ l de la reacción, se transformó *E. coli* por choque térmico y se sembró en placa con kanamicina, X-Gal e IPTG. Tras la incubación de una noche, 4 colonias blancas fueron picadas y llevadas a un cultivo líquido. Tras una nueva incubación de una noche en agitación, se realizó la miniprep de los cultivos líquidos y se verificó, mediante digestión y electroforesis, el correcto ensamblaje de la construcción.



**Figura 27. Esquema del ensamblaje multipartito GB.** Tres piezas estandarizadas (P, CDS, T) se ensamblan en un plásmido de destino (pDGB) en una reacción con *Bsal* y ligasa *T4*, obteniendo una unidad transcripcional (UT) en el interior de un vector.

#### 4.3.5.5. Ensamblaje binario

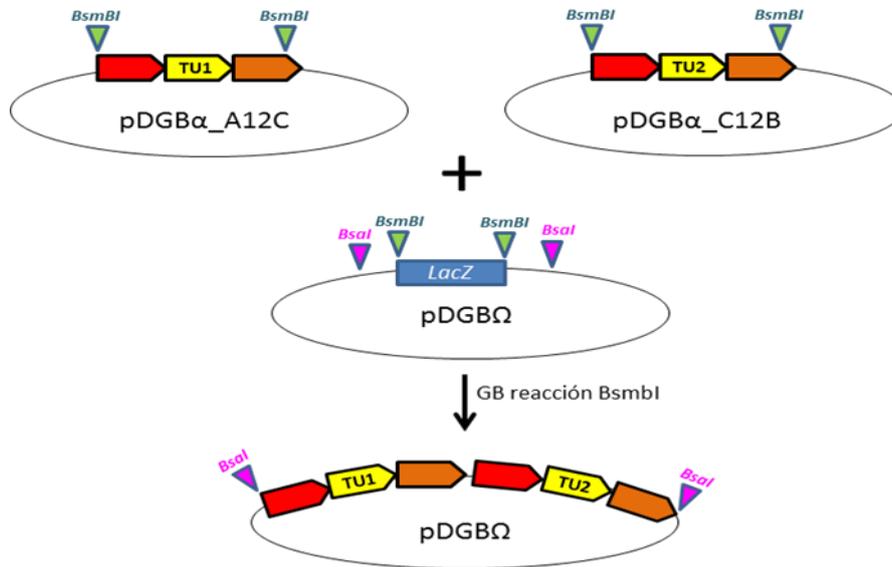
##### A. Fundamentos

Una vez ensambladas las diferentes unidades transcripcionales dentro de los plásmidos de destino es posible hacer combinaciones de unas con otras, mediante reacciones de ensamblaje binario; incrementando el número de unidades transcripcionales que contiene el vector.

##### B. Metodología del ensamblaje binario

A continuación, los módulos ensamblados sobre los plásmidos de nivel  $\alpha$  pueden ser considerados a su vez como plásmidos de entrada para un nuevo ensamblaje de nivel  $\Omega$  (pDGB-1AB3 o pDGB-3AB2). Dos módulos ensamblados sobre pDGB-A12C y pDGB-C12B respectivamente pueden a su vez ser ensamblados entre sí, esta vez utilizando el enzima *Bsmbl* y un plásmido de nivel  $\Omega$ . Para ello, se realizó una reacción de restricción-ligación, pipeteando en un mismo tubo: la pareja de construcciones compatibles entre sí que se desee ensamblar, el plásmido de destino, la enzima de restricción *Bsmbl*, y el resto de reactivos necesarios. Con el producto resultante, se transformó *E. coli* por choque térmico y se sembró en placa con los antibióticos espectinomina, X-Gal e IPTG. Tras la incubación de una noche, 4 colonias blancas fueron picadas y llevadas a un cultivo líquido. Tras una nueva incubación de una noche en agitación, se realizó la miniprep de los cultivos líquidos y se verificó, mediante digestión y electroforesis, el correcto ensamblaje de la construcción.

En esta segunda ronda de ensamblaje, y análogamente al caso anterior, los módulos construidos con plásmidos del nivel  $\Omega$  pueden nuevamente ensamblarse entre sí, utilizando la enzima *BsaI* y un plásmido de nivel  $\alpha$ , cerrando un bucle iterativo e indefinido de ensamblajes jerárquicos (Figura 28).



**Figura 28. Esquema de un ensamblaje binario GB.** Ensamblaje de dos unidades transcripcionales en un nuevo plásmido de destino (pDGB) mediante una reacción con *BsmBI* y ligasa *T4*.

#### 4.4. Transformación de cepas bacterianas

Para la transformación de células bacterianas se descongeló en hielo una alícuota de 40  $\mu$ L de células competentes, a la cual se le adicionó 1  $\mu$ L del plásmido llevando la construcción de interés. La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue transformada mediante choque térmico. Después de añadir el plásmido a la alícuota de células competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 20 min, luego se incubó durante 30 s en un baño de agua a 42  $^{\circ}$ C. Inmediatamente, la mezcla se introdujo en hielo.

En el caso de las cepas de *E. coli* DH10B y *A. tumefaciens* (LBA4404 y C58) la transformación se llevó a cabo por electroporación. Tras añadir el DNA plasmídico a la alícuota de células competentes, la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación (BioRad®) previamente enfriada en hielo, luego se aplicó un pulso eléctrico a través del equipo Gene Pulse (BioRad®). Para la cepa DH10B las

condiciones de electroporación fueron 200  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  y 1,8 kV y para *A. tumefaciens* 400  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  y 1,8 kV.

En los todos los casos las células bacterianas transformadas se resuspendieron en 700  $\mu\text{L}$  de medio LB sin antibióticos, y se incubaron en agitación constante durante 1 h a 37 °C, para *E.coli* y 3 h a 28 °C para *A. tumefaciens*. Tras la incubación sin presión de selección, las células bacterianas se plaquearon en medio LB suplementado con antibiótico, con el fin de seleccionar las células transformadas.

#### 4.4.1. Selección de recombinantes bacterianos

La selección de recombinantes se llevó a cabo mediante la siembra del sedimento bacteriano procedente del cultivo transformado en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado según el plásmido utilizado. En la tabla 7 se muestran los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y las concentraciones usadas.

Antibiótico	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )				
	<i>E. coli</i>		<i>A. tumefaciens</i>		
	DH10B	DH5 $\alpha$	AGL1	C58	LBA4404
Espectinomicina	100		100	100	100
Rifampicina	-		20	40	50
Kanamicina	50		50	50	50
Ampicilina	100		-	-	-

**Tabla 7. Antibióticos utilizados para la selección de colonias bacterianas recombinantes.**

En los casos en que el vector empleado permitía seleccionar las células transformadas por  $\alpha$ -complementación, se añadió al medio 20 mg/ml del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal) y de IPTG 0,5 mM.

#### 4.5. Secuenciación

La secuenciación de fragmentos se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de DNA del instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), donde se utilizó un secuenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los oligonucleótidos usados se indican en la tabla 4.

### 4.5.1. Análisis de secuencias

Para el análisis de secuencias se utilizaron distintos programas que se describen en la tabla 8.

Página web / Programa	Organización/ referencia	Programa	Uso
<a href="http://www.bioinformatics.org/">http://www.bioinformatics.org/</a>	<i>Bioinformatics</i>	Reverse complement	Generar secuencias reversas y/o complementarias
<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	<i>Uniprot</i>	Uniprot	Alineamiento de secuencias
<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>	<i>ExpASy Swiss Institute of Bioinformatics</i>	Translate	Traducción de cDNA a proteína/ análisis de proteína
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>	BLAST	Búsqueda de homologías
<a href="http://www.ebi.ac.uk">www.ebi.ac.uk</a>	<i>European Bioinformatics Institute (EMBL)</i>	Align	Alinear dos secuencias
		ClustalW2	Alinear varias secuencias

**Tabla 8. Programas utilizados en este trabajo.**

### 4.6. Análisis de la actividad GUS

Las muestras se recolectaron en fresco y se fijaron inmediatamente en acetona 90% durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se hicieron dos o tres lavados con la solución de revelado sin el sustrato (Tabla 9), después se sumergieron en la solución de revelado con sustrato y se aplicaron 3 pulsos de vacío de 5 min cada uno, y se incubaron a 37 °C durante 16 horas (aproximadamente). Finalmente el tejido se lavó con concentraciones crecientes de etanol (15, 30 y 50 %). La fijación de las muestras se realizó con FAE (50% etanol absoluto; 10% ácido acético glacial; 5% formaldehído) aplicando nuevamente tres pulsos de vacío de 5 min, y dejándolos 16 horas a 4 °C. Finalmente las muestras se llevaron a etanol al 70% y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Productos	Concentración
Tampón fosfato sódico pH:7,0	50mM
Ferricianuro de potasio	0,5 a 1mM
Ferrocianuro de potasio	0,5 a 1mM
Tritón X-100	0,1% v/v
EDTA	10mM
X- gLuc*	2mM

Tabla 9. Solución de revelado utilizada en la tinción GUS. El asterisco (\*) señala el sustrato.

## 5. Transformación genética de plantas

### 5.1. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas de *Medicago sativa*

#### 5.1.1. Solución mineral y vitamínica del medio de propagación clonal *in vitro* (SH10b)

Macronutrientes	Cantidad
KNO <sub>3</sub>	50 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4 g/L
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g/L
Micronutrientes	
KI	0,1 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
Vitaminas	
Ácido nicotínico	0,5 g/L
Piridoxina	0,025 g/L
Tiamina	0,5 g/L

#### 5.1.2. Obtención de réplicas por estaquillado

Para la obtención de réplicas por estaquillado se utilizaron fragmentos de tallo con

yemas (o esqueje) de cada una de las líneas transgénicas de 2-3 semanas de edad que se encontraban en el invernadero. Para ello, una vez elegida la línea transgénica, se realizó un corte horizontal bajo un nudo para cada uno de los tallos que contenga el ápice. Un ejemplo sería el que se muestra en el primer paso de la Figura 24, donde tenemos una línea transgénica con 3 tallos y al realizar el corte, obtenemos 3 esquejes con ápices. A continuación, la zona de corte se puso en contacto con una mezcla de hormonas comercial [INABAR PLANT: ácido indolbutírico (IBA) 0,1% y ácido naftalenacético (NAA) 0,1%]] y se introdujo en una maceta con sustrato. Hay que tener especial cuidado a la hora de introducir el esqueje en el sustrato para que no pierda la mezcla de hormonas incorporadas en la zona de corte. Para ello, abrimos un hueco en la tierra, y una vez introducido el esqueje, cerramos con ayuda de los dedos (Figura 29).



**Figura 29. Propagación clonal de plantas de alfalfa utilizando una mezcla de hormonas IBA+IAA.**

Seguidamente, las macetas se cubrieron con un plástico durante 2 semanas, y se fue agujereando durante una semana más. Después de las 3 semanas, se retiró el plástico y de este modo, de cada uno de los esquejes propagados obtuvimos clones de la línea transgénica. Como se observa en el ejemplo descrito en la Figura 30, tuvimos que repetir el proceso varias veces hasta poder conseguir 6 clones de cada línea.

Una vez obtenido el número de clones de la línea transgénica necesario para la caracterización fenotípica, se realizó la poda (como se muestra en el ejemplo de la Figura 30) y que se describe a continuación.

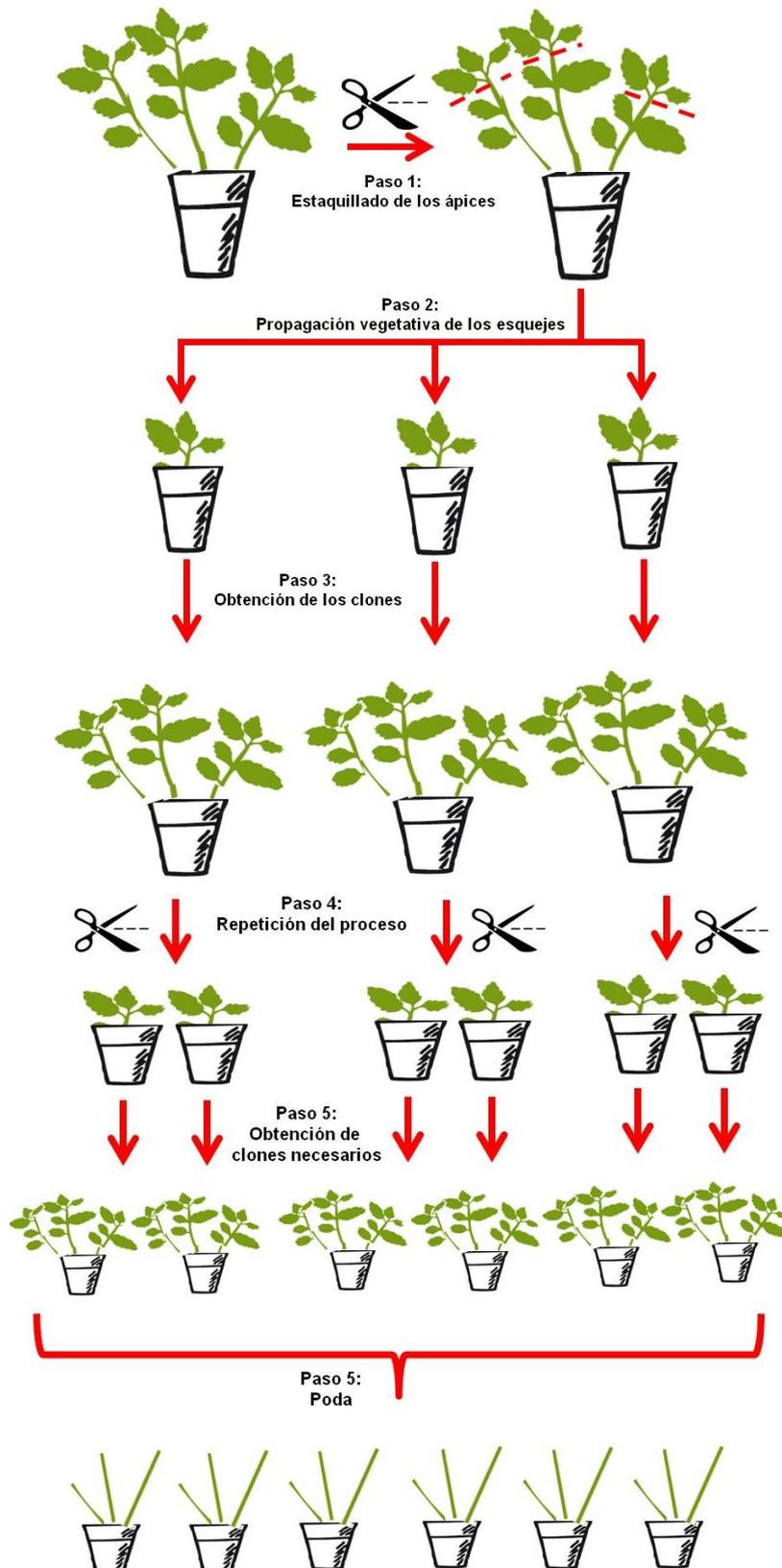
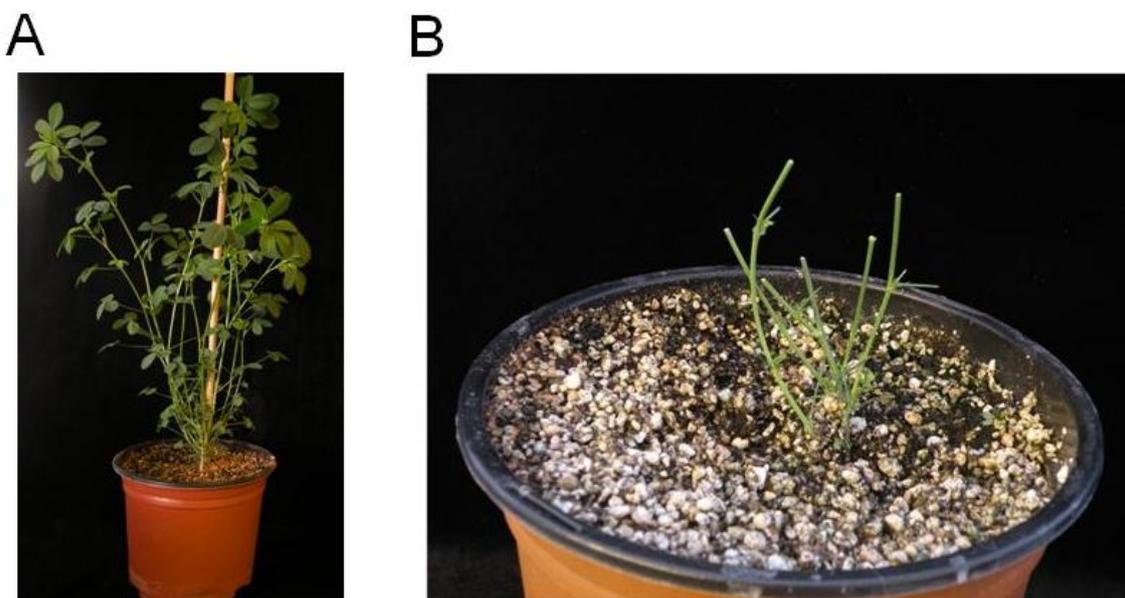


Figura 30. Esquema de propagación clonal de plantas de alfalfa por estaquillado.

### 5.1.3. Poda de las plantas transgénicas para fenotipado

Como no pudimos conseguir semillas de las líneas transgénicas RSY27 y RSY4D debido a su poca fertilidad, tuvimos que realizar la poda de las plantas transgénicas para su fenotipado. La poda de las plantas transgénicas se realiza con el fin de conducir el desarrollo de la planta, desde el principio, para un crecimiento de ramas bien dispuestas y equilibradas, y de este modo, conseguir una homogeneidad entre los distintos clones para cada línea transgénica. Así, la poda bien hecha favorece la adecuada distribución de las ramas, lo cual garantiza que la luz del sol llegue también al interior de la planta, crezca de manera armónica y florezca mejor.

Para ello, fue necesario hacer un corte en el 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> nudo de cada tallo de la planta, cuando éstas tenían 6 ó más nudos. Además, fue necesario que al tallo podado se le quitase todas las hojas (Figura 31).



**Figura 31. Poda de las plantas transgénicas para fenotipado (A).** Planta con 6 o más nudos **(B).** Planta que se ha podado haciendo cortes en el 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> nudo de cada tallo y que se han quitado todas las hojas.

De esta forma, repitiendo este proceso 2 ó 3 veces, pudimos utilizar a continuación los tallos nuevos que se desarrollaron para la caracterización fenotípica de las plantas. Para ello, se estableció como tiempo 0 la fecha de la última poda (Comunicación personal de la Dra. Lina Gallego y del Prof. R. Dixon, North Texas University, USA).

#### 5.1.4. Evaluación del nivel de ploidía

Las plantas transgénicas regeneradas se sometieron a un análisis para medir su nivel de ploidía antes de transferirlas al invernadero, ya que se han descrito posibles variaciones en el nivel de ploidía en plantas transgénicas de alfalfa regeneradas *in vitro*. Esto podría afectar al fenotipo de la planta y por ello es mejor asegurarse antes de seleccionar las líneas que vamos a retener para su evaluación fenotípica. El nivel de ploidía de cada planta fue analizado por citometría de flujo. Este método permite la cuantificación del contenido de DNA nuclear de las células según el método de Smulders *et al.* (1994). Los núcleos fueron extraídos de células de hojas transgénicas y de plantas control. Un trozo de hoja de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> se cortó en pequeños trozos con la ayuda de una cuchilla y se les añadió 200 µl de tampón de extracción de núcleos (Partec) y 800 µl de una solución para teñir el DNA que contiene: 1 mg/l de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al DNA emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de DNA del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de DNA en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas. El sistema se calibra previamente utilizando un material vegetal del que se conoce su nivel de ploidía (planta madre). Una vez ajustado, el resto de muestras se analizan de la misma forma que el testigo para poder comparar las gráficas resultantes.

#### 5.1.5. Caracterización morfológica de las líneas transgénicas de *Medicago sativa* 35S::*MtTFL1a*

##### 5.1.5.1. Caracterización macroscópica

Para la caracterización de las plantas transgénicas de *M. sativa* se evaluaron

diferentes caracteres fenotípicos, tanto de desarrollo vegetativo como de desarrollo reproductivo. En la Tabla 10 se muestran los caracteres que se evaluaron en las plantas 35S::*MsTFL1a* y en las plantas silvestres:

<b>Categoría</b>	<b>Carácter</b>
<b>Desarrollo vegetativo</b>	Altura total planta Número entrenudos Longitud entrenudos Área hojas Biomasa Longitud peciolo Diámetro tallo
<b>Desarrollo reproductivo</b>	Tiempo floración Tamaño inflorescencias Número flores por inflorescencia Separación entre flores Órganos flores

**Tabla 10. Caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo utilizados para fenotipar las plantas 35S::*MsTFL1a* y compararlas con los de las plantas silvestres.**

### **A. Desarrollo vegetativo**

Para evaluar caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo, se aclimataron 6 clones procedentes de estaquillado pertenecientes a cada línea transgénica 35S::*MsTFL1a*. Su aclimatación se acopló con el crecimiento, en invernadero, de plantas silvestres procedentes también de clones por estaquillado. El diseño experimental fue el que se explica a continuación: las plantas se dispusieron en bandejas, con 6 macetas por bandeja, alternando 2 plantas por línea transgénica-2 plantas silvestres y se cultivaron hasta la transición floral bajo condiciones de invernadero. En este tiempo se evaluaron los distintos caracteres vegetativos. Para la caracterización del desarrollo vegetativo, recolectamos aquellos tallos de cada clon que había florecido, de este modo, caracterizamos un total de 10 tallos florecidos para cada línea transgénica y para las plantas silvestres.

El peso fue evaluado en seco (3 semanas en estufa a 50 °C) mediante una balanza analítica, mientras que el resto de atributos físicos cuantitativos se evaluaron mediante un pie de rey (nonius) y una regla. Además, se desarrolló un procedimiento

para la medición del área foliar mediante el uso de un escáner de mesa y el software IDRISI® (Lallana 1999).

## **B. Desarrollo reproductivo**

Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de *MsTFL1a* sobre el tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* se utilizó como medida del tiempo de floración el recuento del número de nudos formados. Para hacer este recuento se midió en cada uno de los 10 tallos escogidos de cada clon el número de nudos formados desde la base del tallo hasta la primera inflorescencia.

Por otro lado, teniendo en cuenta que se determinó como día 0 el día en que se realizó la última poda, se fijaron 3 tiempos distintos (20, 27 y 41 días) para calcular el porcentaje de clones que habían florecido para cada una de las líneas transgénicas en comparación a las plantas control.

### **5.1.5.2. Caracterización microscópica**

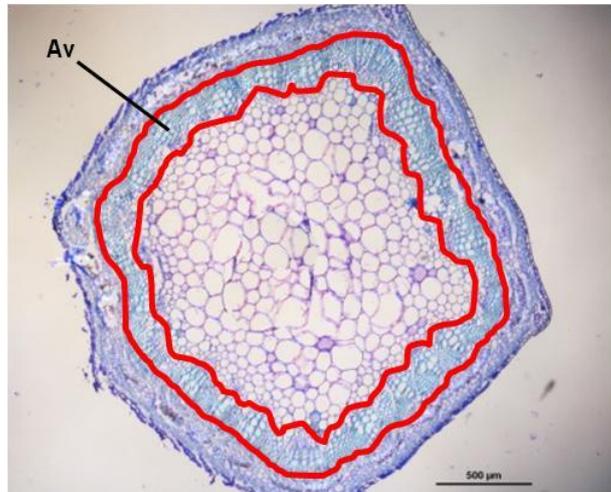
Para la caracterización microscópica de las plantas transgénicas de *M. sativa* se realizaron cortes transversales y longitudinales de tallos incluidos en parafina. Para ello se escogió un tallo de cada clon, siendo un total de 6 para cada línea transgénica, y se realizaron cortes transversales (3 por tallo) en el penúltimo entrenudo de cada tallo (entrenudo 13 para los tallos de las plantas transgénicas y 17 para las silvestres). Además, se hicieron cortes longitudinales (3 por tallo) también en el penúltimo y último entrenudo de otros 6 tallos para cada línea. Las secciones obtenidas, se incluyeron en parafina, se procesaron mediante una tinción con toluidina 0,5 % (Materiales y Métodos, apartados 2.2 y 2.3) y finalmente se visualizaron mediante microscopía óptica.

A continuación, se muestran los caracteres que se evaluaron en las plantas 35S::*MsTFL1a* y en las plantas silvestres:

#### **A. Área del anillo vascular**

Para evaluar el área del anillo vascular se tomaron imágenes de los cortes transversales visualizados mediante microscopía óptica fijando una escala adecuada.

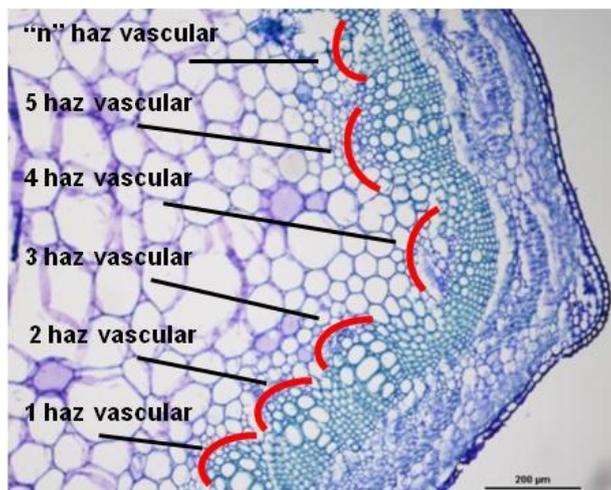
Posteriormente las imágenes se trataron con el programa ImageJ utilizando la opción que nos permite medir áreas con una escala previamente fijada.



**Figura 32. Caracterización del anillo vascular del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MstFL1a* y plantas silvestres.** En rojo se muestra el área del anillo vascular de un corte transversal de tallo. Anillo vascular (Av).

## B. Número de haces vasculares

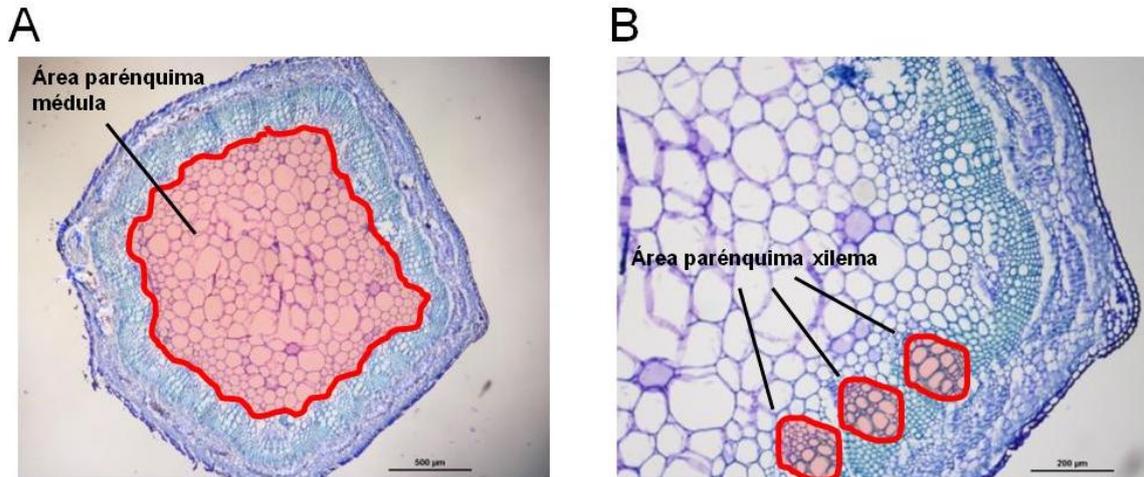
Para contar el número de haces vasculares se usaron las imágenes utilizadas anteriormente.



**Figura 33. Caracterización del número de haces vasculares del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MstFL1a* y plantas silvestres.** En rojo se muestra el conteo del número de haces vasculares de un corte transversal de tallo.

### C. Área del parénquima de la médula y del xilema

Para evaluar el área del parénquima de la médula y del xilema se utilizaron las mismas imágenes y se trataron con el programa ImageJ mediante la opción que nos permite medir áreas.



**Figura 34. Caracterización del parénquima de médula y de xilema del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MstFL1a* y plantas silvestres. (A).** En rojo se muestra el área del parénquima de médula en un corte transversal de tallo. **(B).** En rojo se muestra el área del parénquima de xilema en un corte transversal de tallo.

### D. Longitud de las células del parénquima de la médula y del xilema

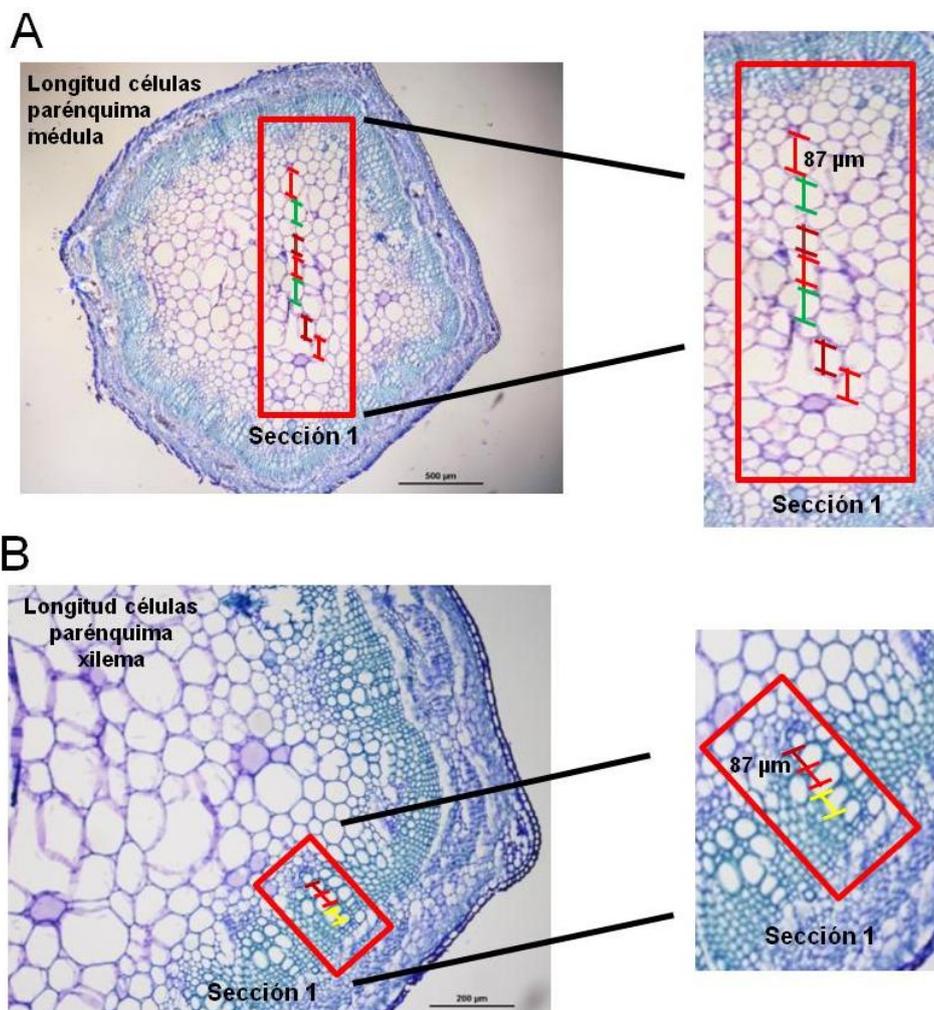
Para evaluar la longitud de las células del parénquima de la médula y del xilema se utilizaron las imágenes anteriormente descritas. En este caso se utilizó en el ImageJ la opción que nos permite medir segmentos con una escala previamente fijada. Para ello, se midieron las células de 5 hileras distintas por corte transversal y se realizaron dos repeticiones del experimento (Figura 35).

### E. Número de células del parénquima de la médula y del xilema

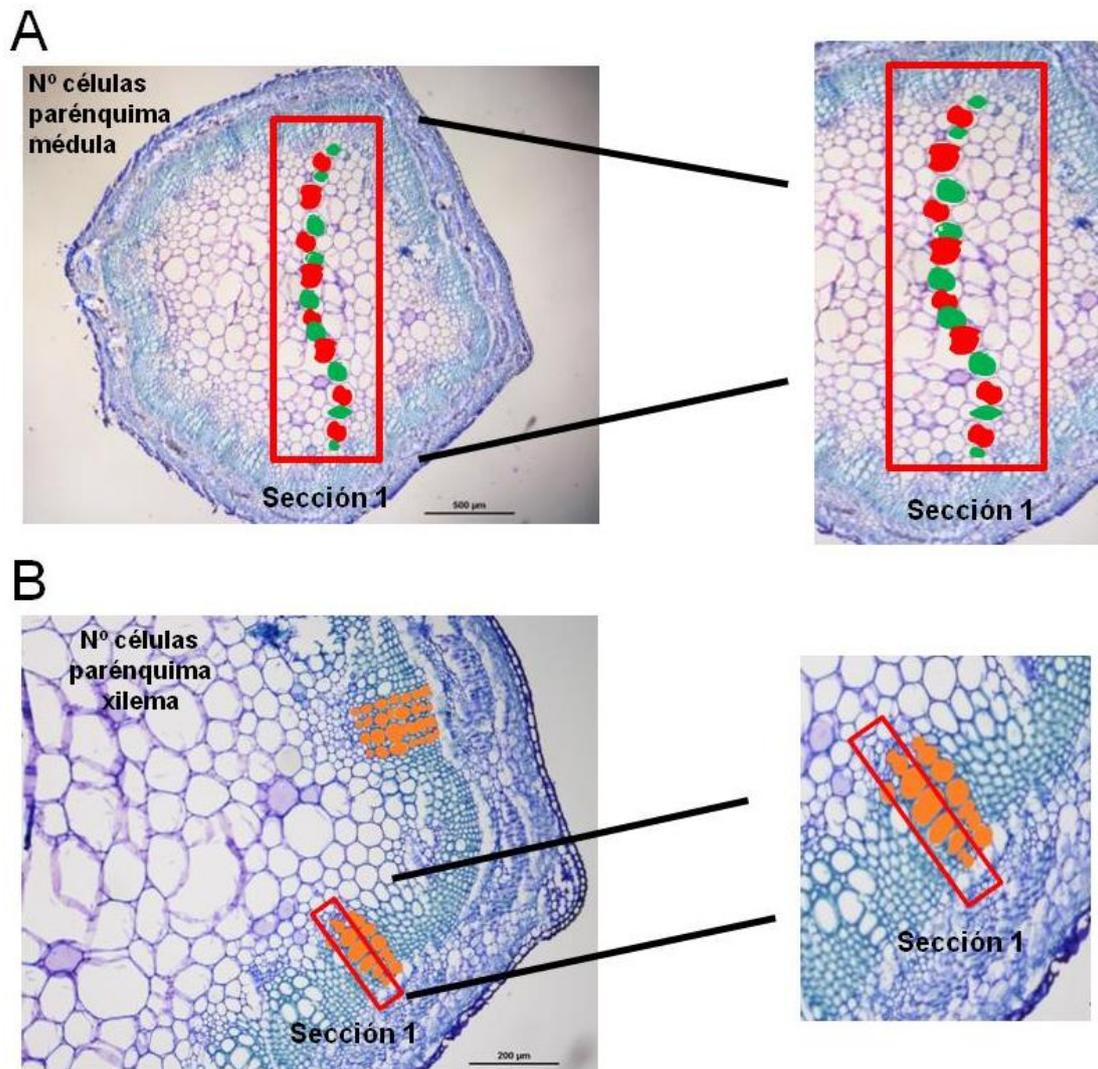
Para contar el número de células del parénquima de la médula y del xilema se utilizaron las mismas imágenes. En esta ocasión se contó el número de células que había en 6 hileras distintas por corte transversal a lo largo del diámetro. Se realizaron dos repeticiones del experimento (Figura 36)

## F. Longitud de las células del penúltimo y último entrenudo

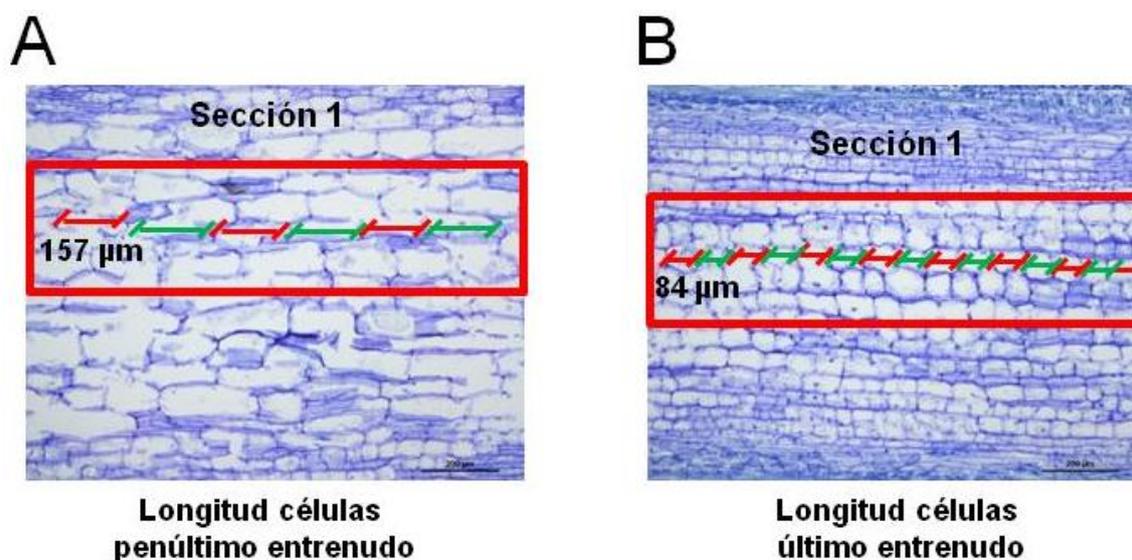
En este caso, para evaluar la longitud de las células del penúltimo y último entrenudo se tomaron imágenes de los cortes longitudinales de ambos entrenudos visualizados mediante microscopía óptica fijando una escala adecuada. Hicimos coincidir su longitud con su diámetro horizontal. Posteriormente las imágenes se trataron con el programa ImageJ utilizando la opción que nos permite medir segmentos con una escala previamente fijada. Para ello, se midió las células de 4 hileras distintas por corte longitudinal y se realizaron dos repeticiones del experimento (Figura 37).



**Figura 35. Caracterización de la longitud de las células del parénquima de médula y de xilema del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MtFL1a* y plantas silvestres. (A).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para medir la longitud de las células del parénquima de médula en un corte transversal de tallo. **(B).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para medir la longitud de las células del parénquima de xilema en un corte transversal de tallo.



**Figura 36.** Caracterización del número de células del parénquima de médula y de xilema del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MSTFL1a* y plantas silvestres. **(A).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para contar el número de células del parénquima de médula en un corte transversal de tallo. **(B).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para contar el número de células del parénquima de xilema en un corte transversal de tallo.



**Figura 37.** Caracterización de la longitud de las células del penúltimo y último entrenudo del tallo en plantas de sobreexpresión del gen *MsTFL1a* y plantas silvestres. **(A).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para medir la longitud de las células en el penúltimo entrenudo en un corte longitudinal del tallo. **(B).** En rojo se muestra la sección 1 utilizada para medir la longitud de las células en el último entrenudo en un corte longitudinal del tallo.

#### 5.1.6. Evaluación de la ruta de biosíntesis de flavonoides

Para detectar la síntesis *de novo* de proantocianidinas (PAs) en plantas transgénicas de *M. sativa* se llevaron a cabo distintas técnicas: el análisis colorimétrico por DMACA, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la hidrólisis de Bate-Smith.

##### 5.1.6.1. Extracción y cuantificación de PAs solubles por DMACA

Para la determinación específica de flavanoles (monómeros y condensados) se ha utilizado un método basado en su reacción con aldehídos para dar lugar a la formación de compuestos coloreados. Este análisis colorimétrico es conocido como reacción con DMACA (p-dimetilaminocinnamaldehído).

La extracción de flavanoles de las hojas de *N. benthamiana* y *M. sativa* se realizó según el protocolo descrito por Pang *et al.* (2007). La extracción se realizó a partir de 2 g de material fresco que se maceraron con nitrógeno líquido y se extrajeron con 8 ml de solución de extracción (acetona 70%:1% de ácido acético). Los extractos se agitaron vigorosamente en un vórtex, posteriormente se sonicó la mezcla a 30 °C

durante 30 min y después se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min para eliminar los restos celulares. El sedimento se resuspendió en 4 ml de solución de extracción y se repitieron los mismos pasos de nuevo como anteriormente. Los sobrenadantes de ambas extracciones (12 ml) se recogieron y se transfirieron a vasos de precipitados de vidrio de 25 ml en los que la acetona se evaporó bajo presión reducida. La fase acuosa restante se extrajo dos veces con 10 ml de diclorometano y tres veces con hexano. Las muestras finalmente se evaporaron a sequedad y se disolvieron en 1 ml de la primera solución de extracción para la reacción colorimétrica. Las PAs solubles fueron cuantificadas por la reacción DMACA utilizando estándares de catequina, según el protocolo descrito por Pascual-Teresa *et al.* (1998). 20 µl del extracto final se mezcló con 980 µl de reactivo DMACA (0,2% [w / v] DMACA en una mezcla de metanol y HCl 3N [1:1]) en cubetas del espectrofotómetro. Para realizar los blancos, las muestras fueron reemplazadas por 20 µl de solución de extracción. La absorbancia se midió a 640 nm después de 5 min usando un Pharmacia Biotech Ultrospec 1000E UV/Visible spectrophotometer, y el contenido de PAs se calculó, después de restar las muestras en blanco, como equivalentes de catequina.

#### **5.1.6.2. Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS)**

##### **5.1.6.2.1. Análisis directo**

Esta analítica se realizó a partir de hojas agroinfiltradas y de hojas control de *N. benthamiana*. Dichos tejidos foliares fueron macerados con nitrógeno líquido, posteriormente se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para la extracción de fenoles se disolvió 0,02 g del liofilizado en 1 ml de metanol 50% y la mezcla se agitó con vórtex durante 2 minutos. A continuación, dicha mezcla se sometió a ultrasonidos durante 15 min (Sonicator Branson 5510, Emerson, Danbury, CT) y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C (Centrífuga 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los sobrenadantes se filtraron con un filtro de PVDF de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA) y se inyectaron en LC / MS.

La identificación de los fenoles se realizaron con un equipo Agilent 1100 Series (Agilent, Santa Clara, USA) equipado con bomba binaria G1312A, un muestreador

automático G1313A, un detector de fotodiodo G1315B, y un desgasificador G1322A controlado por el software Agilent v. A08.03. El detector de fotodiodo se acopló con un detector de Masas tipo Trampa MSD 1100 Series (Agilent) con un sistema de ionización por electrospray (ESI), con las siguientes condiciones: el capilar se encontraba a 350 °C y 3-3,5 kV de tensión, y la exploración de masas (MS) y MS / MS se midió entre 100-1500 m/z. Los experimentos de fragmentación se realizaron en la trampa de iones utilizando helio como gas de colisión, y la energía de colisión se fijó en 75%. Los datos de espectrometría de masas se adquirieron en los modos de ionización negativa. Se utilizó una columna Pursuit XRs C18 250 x 4,6 mm, 5µm de tamaño de partícula de Varian (Agilent, Santa Clara, CA) con un flujo de la fase móvil de 0,8 ml/min. Los disolventes de la fase móvil fueron ácido fórmico 1% en agua (A) y acetonitrilo (B) que se usaron con el siguiente gradiente: 2% de B y 98% de A a los 0 min, 32% B y 68% de A a los 30 min, 40% de B y 60 % de A a los 40 minutos, y 95% de B y 5 % de A a los 50 minutos, seguido por pasos de lavado y acondicionamiento. Los datos del fotodiodo se registraron entre 250 nm-700 nm y los compuestos fenólicos se identificaron a 280 nm, 320 nm, 360 nm, y 520 nm. Las integraciones fueron realizadas por Agilent ChemStation para LC 3D, Rev. B.01.03 SR1.

#### **5.1.6.2.2. Análisis por floroglucinolisis**

Por otro lado, en hojas transformadas y en hojas control de *N. tabacum*, se llevó a cabo la identificación de compuestos fenólicos mediante el análisis directo anteriormente descrito. Además, se realizó también un análisis de dichos compuestos mediante el uso del método de floroglucinolisis en el que se utilizó una optimización del método descrito por Kennedy y Taylor (2003). Para ello, a 100 µl de extracto metanólico de cada una de las muestras se le añadió 100 µl del reactivo de floroglucinolisis conteniendo 100 g/L de floroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico en HCl 0,2N en metanol. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2 volúmenes de acetato de sodio 200 mM para parar la reacción. Después las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13000 rpm y colocadas en viales para su posterior inyección en el HPLC. La separación de los productos de reacción (unidades terminales y aductos con el floroglucinol) se realizó en un cromatógrafo líquido Waters 2695 (Waters, PA, USA), equipado con un detector de fotodiodo Waters 2696. La columna utilizada fue una Atlantis C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) protegida con una precolumna del mismo material (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Waters, Milford, USA) y con un flujo de la fase móvil de 1ml/min. Los disolventes de la fase

móvil fueron 2,5% de ácido acético en H<sub>2</sub>O (A) y aceto nitrilo (B) por el siguiente gradiente: 3% de B y 97% de A a los 0 min, 9% de B y 91% de A a los 5 min, 16% de B y 84% de A a los 15 min y 50% de A y B a los 45 min seguido de lavado y acondicionamiento.

### 5.1.6.3. Reacción Bate-Smith

El método butanol-HCl originalmente propuesto por Bate-Smith (1973) para la medición de taninos condensados es simple y específico. Este ensayo colorimétrico implica la escisión oxidativa de proantocianidinas con la reacción butanol-HCl. La hidrólisis de las proantocianidinas es un requisito previo para la determinación de estas moléculas en un extracto.

La reacción se llevó a cabo con 5 ml de extracto acuoso de hojas y tallos de alfalfa, que fueron introducidos en tubos de ensayo de vidrio pyrex de 10 ml. El extracto acuoso de la planta se mezcló con 2,5 ml de HCl / butanol (HCl:butanol = 19: 1) y se incubaron en un baño de agua a 88 °C durante 30 minutos sin agitación. Un extracto de hojas de té verde (rico en taninos condensados) se usó como control positivo.

## 5.2. Transformación transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Para este ensayo se utilizaron las construcciones multigénicas 35S::*Rosea1-Delila*::T35S, 35S::*Rosea1-Delila-MtANR*::T35S, 35S::*Rosea1-Delila-MtLAR*::T35S y 35S::*Rosea1-Delila-MtANR-MtLAR*::T35S generadas mediante el sistema de multiclonaje por módulos GoldenBraid (ver apartado 4.3.5). Cada construcción se introdujo en la cepa bacteriana C58 de *A. tumefaciens* por separado con objeto de realizar un experimento de agroinfiltración por cada construcción. En primer lugar la bacteria que portaba la construcción de interés, se cultivó en medio LB suplementado con los antibióticos de selección, a 28°C durante 16 horas. Al día siguiente, se midió la Densidad Óptica (OD) a 600 nm, y a partir de esta lectura se hicieron los cálculos para obtener una OD<sub>600</sub> de 0,3 diluyendo con medio líquido LB. El cultivo (a la concentración adecuada) se centrifugó a 5000 r.p.m durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2ml de la solución de infiltración (1mM MES; 0,1mM MgCl<sub>2</sub>; Acetosiringona 200µM). La incubación se realizó a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación constante durante dos horas. Posteriormente con una jeringuilla sin aguja, se agroinfiltraron mediante presión sectores del envés de

hojas de *Nicotiana benthamiana*. En total se agroinfiltraron 3 hojas por cada planta (de 3 semanas de edad). Después de cinco días, se observó si las hojas presentaban pigmentación antocianica. Se tomaron porciones circulares de hojas agroinfiltradas de aproximadamente 1 cm de diámetro para posteriores análisis. De algunos de estos sectores se extrajo RNA que se utilizó para la síntesis de cDNA necesario para los experimentos de RT-PCR semicuantitativa. Otros sectores se utilizaron para los ensayos de detección de compuestos fenólicos mediante DMACA y HPLC.

### 5.3. Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* se utilizó el ecotipo silvestre Columbia (Col-0). La transformación se realizó según el protocolo de infiltración descrito por Bechtold y Pelletier (1998) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se sembraron 20 semillas de *Arabidopsis* en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de día largo. Tras 4 semanas de cultivo aproximadamente, las plantas presentaban la primera inflorescencia y ya estaban listas para ser transformadas.

Tres días antes de la infiltración, se preparó un precultivo de 5 ml de *A. tumefaciens* cepa C58 que llevaba la construcción de interés. El medio se suplementó con los antibióticos indicados y se incubó durante una noche a 28°C. Al día siguiente se preparó un cultivo de 500 ml de LB, suplementado con los antibióticos correspondientes, el cual se inoculó con los 5 ml del precultivo y se incubó durante 48 horas a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 15 min. El sedimento se resuspendió en 500 ml de medio de infiltración (2,2 g/L MS; sacarosa 5% (p/v); 0,5 g/L MES; 0,03% Silwet L-77; a pH 5,7). Las plantas se sumergieron en la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las plantas se secaron ligeramente en un papel absorbente, y se cubrieron con bolsas de plástico. Luego se llevaron al invernadero y un día después se les retiró el plástico. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la recolección de las semillas. Una vez recolectadas las semillas se secaron a 37°C durante 5 días.

### 5.3.1. Selección de transformantes

Para la selección de transformantes primarios las semillas se esterilizaron en una solución con 30% lejía y 0,01% de Tritón X-100, durante 10 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua estéril para eliminar la solución anterior. Las semillas se sembraron en el medio de germinación suplementado con Higromicina (2,2 g/L MS; 20g/L sacarosa; 0,1g/L MES a pH: 5,9; con 0,6 % agar; 20 mg/L Higromicina; 300mg/L Timentina). Las semillas se estratificaron a 4°C durante 4 días, y luego se incubaron en condiciones de fotoperiodo estándar, 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad a  $26 \pm 2$  °C. Después de 7-10 días, las plantas resistentes a la Higromicina se pasaron al invernadero en las condiciones normales de cultivo, allí permanecían hasta la obtención de semillas. Cada planta se consideró una línea transgénica independiente (T1).

## 5.4. Transformación estable de *Nicotiana tabacum*

### 5.4.1. Cultivo de explantes primarios

Los explantes de partida para la transformación fueron hojas jóvenes del cv. Otawa. Cada hoja se cortó en cuadrados de 1 cm para facilitar la entrada de *Agrobacterium tumefaciens*. Los explantes se pusieron con el envés en contacto con el medio de inducción de organogénesis IK 4.0/4.0 dispuesto en placas Petri, suplementado con 200µM de acetosiringona, un compuesto fenólico que favorece la infección de la bacteria en el tejido vegetal. La incubación se realizó en oscuridad durante 24 h a  $26 \pm 2$  °C.

### 5.4.2. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

La cepa utilizada para la transformación fue *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía las construcciones de interés. El cultivo bacteriano se incubó a 28°C en oscuridad y agitación constante, en medio LB suplementado con espectinomicina (100 µg/µl) como presión de selección y se hicieron subcultivos cada 48 h durante ocho días. El octavo día se transfirieron 200 µl del cultivo bacteriano a 200 ml de medio LB suplementado con acetosiringona a una concentración de 200 µM, manteniendo las

mismas condiciones de incubación, hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0,2-0,3, correspondiente a una concentración de inóculo de  $10^2 - 10^3$  UFC/ml.

#### **5.4.3. Cocultivo y lavado de explantes**

Transcurridas las 24 h de cultivo, los explantes se sumergieron durante 5 min en 150 ml de cultivo de *A. tumefaciens*, agitando eventualmente (cocultivo). Tras la inoculación, se escurrieron en un bote con malla, en la cual quedaban retenidos los explantes y se colocaron con el envés en contacto con el medio de organogénesis IK 4.0/4.0 suplementado con 200  $\mu$ M acetosiringona. La incubación duro 48 h con las mismas condiciones descritas para el cultivo de explantes primarios. Pasado el tiempo de incubación los explantes se lavaron en medio de lavado (ML) suplementado con cefotaxima (300 mg/L) a fin de detener el crecimiento bacteriano.

#### **5.4.4. Inducción de organogénesis**

Tras el lavado, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se incubaron en medio organogénico IK 4.0/4.0 suplementado con cefotaxima, sin presión selectiva durante 48 horas en condiciones estándar. Transcurrido el tiempo, se pasaron a medio organogénico IKZ 4.0/4.0/1.0 con presión de selección (Higromicina 25  $\mu$ g/mL). Este medio de cultivo permitió la formación de callos organogénicos. El subcultivo se realizó cada dos semanas alternando el antibiótico que detiene el crecimiento de la bacteria (cefotaxima y timentina). Cuando aparecían brotes individuales estos se separaban del callo organogénico y se subcultivaban en medio de elongación (MEL) hasta alcanzar un tamaño mayor o igual a 1 cm, posteriormente se transferían a medio de enraizamiento (ME).

#### **5.4.5. Aclimatación de plantas en invernadero**

Una vez se observaban las primeras raíces, las plantas se encontraban en condiciones adecuadas para ser transferidas al invernadero. Se eliminaron con agua los restos de agar que estaban adheridos a las raíces, después se transfirieron a macetas con fibra de coco y se cubrieron con un vaso de plástico transparente que fue levantado paulatinamente hasta completar las dos semanas de aclimatación.

### 5.4.6. Soluciones y medios de cultivo utilizados

#### 5.4.6.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

<b>Micronutrientes</b>	
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025

<b>FeNa.EDTA</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> .EDTA	37,3

#### 5.4.6.2. Solución vitamínica

<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/L)</b>
Rivoflavinas	0,25
Ácido nicotínico	2,5
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Ácido fólico	0,5
Biotina	0,05
D-Pantotenato cálcico	0,5
Colina Clh	0,1
Glicina	0,5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0,5

Nota: Las vitaminas se disolvieron en agua. Se prepararon soluciones stock concentradas 100X que fueron almacenadas a – 20°C y se añadieron al medio antes de ajustar el pH.

### 5.4.6.3. Medios de cultivo para transformación estable de *N. tabacum*

Medio de germinación (MG)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa (g)	10
Agar (g)	8

	(g/L)	Medio de lavado	Medios de inducción organogénica	
		(ML)	IK 4.0/4.0	IKZ 4.0/4.0/1.0
Solución mineral	MS	X	X	X
Sacarosa	30	X	X	X
Myo-inositol	0,1	X	X	X
Tiamina-HCl	0,001	X	X	X
Vitaminas SH	SH	X	X	X
IAA	0,004	X	X	X
Kinetina (K)	0,004	X	X	X
Zeatina (Z)	0,001			X
Agar (g)	8		x	X

Medio de enraizamiento (ME)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
IAA	0,0001
Agar	8

Tabla 18. Medios de cultivo para transformación estable de *N. tabacum*: medio de germinación (MG), medio de lavado (ML), medios de inducción organogénica (IK, IKZ) y medio de enraizamiento (ME).

Notas:

- El pH del medio se ajustó a 5,7 con KOH y HCl antes de añadir el agar.
- La esterilización se llevó a cabo por calor húmedo en autoclave, a 15 libras de presión a 120°C durante 20 min.
- La zeatina se esterilizó por microfiltración y se agregó al medio inmediatamente antes de servir en placas.

#### 5.4.6.4. Medios de cultivo estándar

Etapa del proceso	Medio de cultivo	Antibiótico (mg/L)		
		Higromicina	Timentina	Cefotaxima
Precultivo	IK(4,0/4,0)	-	-	-
Cocultivo	IK (4,0/4,0) + Acetosiringona (200 µM)	-	-	-
Lavado	IK (4,0/4,0) líquido	-	-	300
Cultivo sin presión selectiva	IK (4,0/4,0)	-	-	300
Cultivo con presión selectiva	IKZ (4,0/4,0/1,0)	25	300*	300*
Elongación	Medio de elongación (MEL) IK (4,0/4,0)	25	300*	300*
Enraizamiento	ME	25	300*	300*

Nota:

La timentina y la cefotaxima se iban alternando a fin de que la bacteria no creara resistencia al antibiótico.

## 6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante el transcurso de este trabajo se analizaron mediante el programa STATGRAPHS Centurion XVI versión 16.1.15. Cuando se compararon las muestras, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) considerando un valor de  $P < 0,05$ . En este caso el método empleado para discriminar entre medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

---

# CAPÍTULO I

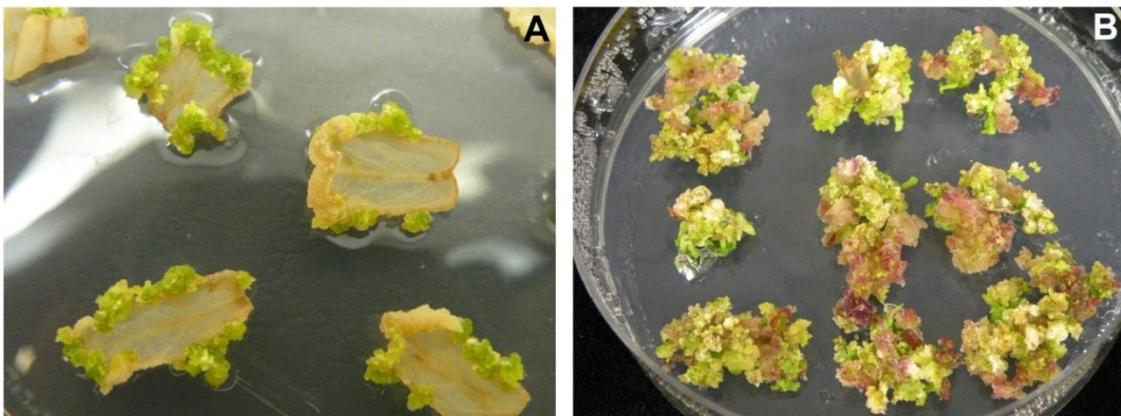
---

*Diseño de una metodología eficiente para la transformación genética de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens**



## CAPÍTULO I: *Diseño de una metodología eficiente para la transformación genética de la alfalfa (Medicago sativa L.) mediada por Agrobacterium tumefaciens*

En el inicio de este trabajo y tras fallidos intentos de reproducir eficazmente dos protocolos de transformación de alfalfa mediados por *Agrobacterium tumefaciens* que habían sido anteriormente descritos, uno mediante embriogénesis somática (Samac 2004) y el otro por transformación *in planta* a partir de plántulas infiltradas (Weeks 2008), decidimos plantear como primer objetivo la puesta a punto de un protocolo de transformación que nos permitiera la obtención de plantas transgénicas vía *A. tumefaciens* mediante embriogénesis somática y con una eficiencia de transformación elevada. De este modo, podríamos disponer de una herramienta imprescindible para la realización de los otros dos objetivos. Para ello, y basándonos fundamentalmente en nuestra experiencia previa utilizando la metodología desarrollada para la transformación genética de *Medicago truncatula* (Trinh *et al.* 2001; Cosson *et al.* 2006; Chabaud 2007), hemos puesto a punto un protocolo para la transformación genética de esta leguminosa forrajera, utilizado inicialmente explantes de hoja del genotipo Regen-SY de alfalfa (Bingham 1991; Samac *et al.* 2004), (Figura 38). En la figura 38 se pueden observar las fases inicial y final de este protocolo para producir embriones transgénicos.



**Figura 38. Fases inicial y final de la regeneración *in vitro* vía embriogénesis somática a partir de secciones de hoja de alfalfa. (A).** Secciones de hoja en medio de inducción de callos con higromicina para seleccionar transformantes, los callos comienzan a formarse en los bordes de los explantes. **(B).** Callos embriogénicos en medio de germinación de embriones.

## **1. Elección del genotipo de alfalfa, de la estirpe de *Agrobacterium* y del agente de selección de transformantes**

### **1.1. Selección del genotipo de alfalfa para los ensayos de transformación**

Para desarrollar la metodología de transformación genética de alfalfa hemos utilizado inicialmente explantes de hojas procedentes de plantas del genotipo Regen-SY27 (Bingham 1991) propagadas *in vitro* y aclimatadas en invernadero. El genotipo RSY27 presenta buenas tasas de regeneración, si bien las plantas obtenidas tienen una fertilidad muy reducida, motivo por el cual los estudios de fenotipos en una segunda generación y la comprobación del mantenimiento de los transgenes de una generación a otra son casi imposibles debido a la escasez de semillas en las plantas transgénicas. Por este motivo, las plantas madre deben mantenerse por propagación *in vitro* de esquejes o mediante estaquillado de brotes apicales o laterales como se explica en la correspondiente sección de Materiales y Métodos. Más recientemente hemos incorporado a nuestros ensayos una nueva línea del genotipo Regen-SY, denominada RSY4D (The Samuel Roberts Noble Foundation, USA), obteniéndose una alta capacidad de embriogénesis *in vitro* similar a la del genotipo RSY27 original. Este mismo protocolo lo estamos utilizando actualmente para transformar el genotipo comercial Aragón, el más cultivado en nuestro país, con el que ya hemos realizado distintas pruebas de proembriogénesis y embriogénesis con resultados parecidos.

### **1.2. Elección de la estirpe de *Agrobacterium* más infectiva para la alfalfa y del agente de selección de transformantes**

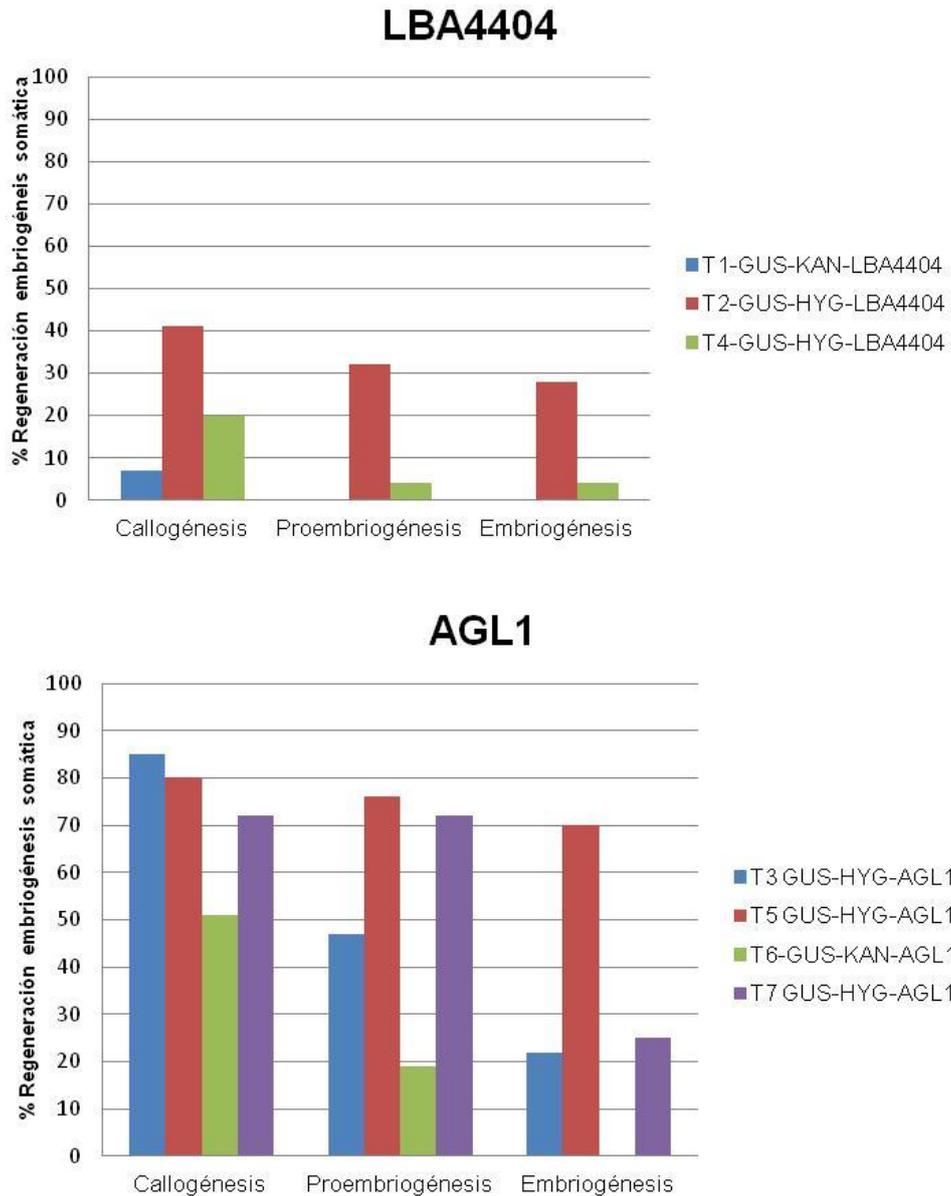
En la mayoría de trabajos publicados con anterioridad para la puesta a punto de la metodología para la transformación genética de la alfalfa, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Samac *et al.* 2004), al igual que el gen *nptII* (*neomicina fosfotransferasa*) que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Nosotros añadimos a nuestros ensayos para la elección de la cepa de *Agrobacterium* una cepa más infectiva, la AGL1 (Lazo 1991).

En muchos de estos trabajos se indica que la selección con 50 mg/L de kanamicina propicia la aparición de escapes que tienen como consecuencia la obtención de falsos transformantes o quimeras en los que posteriormente se

comprueba la ausencia de los transgenes. En nuestra experiencia previa con *Medicago truncatula*, ya habíamos comprobado que las construcciones que portaban el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (50 mg/L) daba lugar a la aparición de escapes, y concentraciones superiores del antibiótico resultaban letales para la planta. Por tanto, decidimos probar otros agentes de selección alternativos como es el caso de la resistencia al antibiótico higromicina mediante el uso del gen *hptII* (*higromicina fosfotransferasa*) en nuestras construcciones. La ventaja de este antibiótico es que se puede utilizar a bajas concentraciones (15 mg/L) y por tanto resulta menos tóxico para la planta (Cosson *et al.* 2007; Chabaud *et al.* 2008).

Así pues, se realizaron distintos ensayos de transformación de alfalfa utilizando inicialmente explantes de hojas procedentes de plantas del genotipo Regen-SY27 en los que se utilizaron combinaciones de las dos cepas de *A. tumefaciens* (LBA4404 y AGL1). Estas a su vez portaban dos tipos de construcciones, una de ellas llevaba el gen reportero GUS y la resistencia a kanamicina para la selección de transformantes, y la otra portaba también el gen reportero GUS y la resistencia a higromicina como agente de selección.

Con los resultados de estos ensayos, se concluyó que utilizando la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* y la resistencia a higromicina (15 mg/L) se obtenían los mejores resultados en las distintas fases de la regeneración de transformantes (calogénesis, proembriogénesis y embriogénesis), en comparación con la cepa LBA4404 y la resistencia a kanamicina (50 mg/L). En la figura 39 se puede ver un resumen gráfico de estos resultados.



**Figura 39. Combinaciones de las dos cepas de Agro LBA4404 y AGL1 con la selección a kanamicina o higromicina y su efecto en las distintas fases de la regeneración *in vitro*.** Los valores representan el porcentaje de callos regenerados en las distintas fases de la regeneración por embriogénesis somática: callogénesis, proembriogénesis y embriogénesis. La combinación de la cepa AGL1 con la resistencia a higromicina es la que da mayor porcentaje de regeneración.

## 2. Protocolo detallado para la transformación genética estable de alfalfa mediada por *A. tumefaciens*

### 2.1. Germinación de semillas de alfalfa

**Escarificación:** se pusieron alrededor de 20-30 semillas en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado en un tubo falcon de 50 ml y se dejaron sumergidas durante 5 minutos (es mejor no agitar ya que las semillas se pegan a las paredes del tubo).

**Lavado:** se retiró el ácido y se añadieron unos 45 ml de agua destilada estéril. Se volteó la mezcla durante dos minutos y, seguidamente, se retiró el agua. Este proceso se repitió 3-4 veces.

**Germinación:** se preparó un papel de filtro humedecido en una placa Petri. Esta placa debía contener alrededor de unos 5-6 ml de agua (evitando que hubiese un exceso de agua). A continuación, se vertieron las semillas en el papel humedecido y se cerró la placa sellándola con film de plástico. Finalmente se tapó la placa con papel de aluminio y se dejó a temperatura ambiente durante 2-3 días.

**Aclimatación de plantas en el invernadero:** las plántulas que habían germinado se transfirieron a alveolos de plástico o a pequeñas macetas con sustrato (50% de turba rubia, 25% de vermiculita nº 3 y 25% de perlita) en el invernadero. Se taparon con un film de plástico para mantener las condiciones de humedad. A la semana, se realizaron pequeños orificios en el film de plástico y éste finalmente se retiró. De este modo, se mantuvieron las plantas de alfalfa en condiciones de invernadero a la espera de su crecimiento y desarrollo para poder utilizarlas como fuentes de explantes para la transformación genética.

### 2.2. Preparación del inóculo de *A. tumefaciens* AGL1

El protocolo comenzó 5 días antes del co-cultivo sembrando una placa con medio LB y el correspondiente antibiótico de selección con la estirpe de *A. tumefaciens* AGL1 que contenía la construcción génica de interés conservada en stock de glicerol a -80 °C. Para ello, se realizó una triple estría en una placa que se cultivó en estufa a 28 °C durante 72 horas. De este modo, pudimos aislar colonias.

Dos días antes del co-cultivo se picó una colonia de la placa anterior, se inoculó en 3 ml de medio estéril LB con el antibiótico correspondiente y se cultivó *overnight* (o/n) a 28 °C en un agitador a 200 rpm. A la mañana siguiente el cultivo debía de estar turbio, de este modo, obteníamos el pre-inóculo. Utilizando 1:300 v/v de este pre-inóculo, se inoculó 25-40 ml de medio estéril LB con el antibiótico correspondiente en un matraz de 250 ml y se dejó crecer la bacteria mediante agitación a 200 rpm a 28 °C dejándolo o/n hasta llegar a una OD<sub>600</sub>: 1.0.

El día de la infección, se mezcló bien el cultivo que dejamos crecer o/n y se vertió en un tubo de centrifuga de 250 ml. Se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y se eliminó con cuidado el sobrenadante. Dejamos el pellet que quedó en el tubo de centrifuga a 4 °C hasta su uso. Justo antes de la infección resuspendimos el pellet agitándolo suavemente con el medio líquido de infección CoM sin sacarosa ni hormonas pero sí con acetosiringona (100µM) para inducir el T-DNA, hasta que llegó a una OD<sub>600</sub>: 0.5.

### **2.3.Preparación de los explantes de hoja de alfalfa (cvs. Regen-SY 27, RSYD4)**

Se utilizaron explantes de hoja de plantas de alfalfa crecidas en condiciones de invernadero. A diferencia de lo que está descrito en algunos de los protocolos de transformación genética de alfafa donde utilizan como explante hojas procedentes de plantas propagadas mediante cultivo *in vitro*, nuestra experiencia con *M. truncatula* nos mostró que el uso de explantes de hojas crecidas en condiciones de invernadero resulta más conveniente. Estas hojas son más saludables, más desarrolladas y más fuertes para tolerar el proceso de infección con la estirpe de *A. tumefaciens* elegida.

Para preparar los explantes de hoja de alfalfa, en cada experimento de transformación se recolectaron alrededor de 30 folíolos jóvenes que estuviesen completamente estirados. De cada hoja trifoliada se pueden obtener de 3 a 6 explantes dependiendo del tamaño de la hoja elegida.

A continuación se lavaron las hojas con lejía al 10 % con una gota de Tween 20 durante 15 min en tarros magenta estériles (10 hojas por tarro), con el fin de que las hojas no se apelmazaran, y se volvieron a lavar con agua estéril tres veces consecutivas (Chabaud *et al.* 2008).

## 2.4. Disección de las hojas trifoliadas e infección

Una vez lavadas las hojas de alfalfa, se transfirieron a placas de Petri estériles para llevar a cabo su disección. Para ello, se comenzó por individualizar los tres folíolos que componen una hoja seccionando los peciolo con un bisturí y finalmente los folíolos se colocaron con el envés hacia arriba sobre la placa. A continuación, se cortaron las hojas con un bisturí estéril retirando los bordes laterales (Figura 40). Los cortes así producidos facilitan la entrada de las bacterias en el tejido vegetal.

Las hojas diseccionadas se incubaron con la suspensión de *A. tumefaciens* que contenía el plásmido de interés en placas Petri con **medio líquido de infección CoM** durante 10 minutos. Este medio líquido no contenía ni sacarosa ni hormonas pero sí acetosiringona 100µM que fue esterilizada por microfiltración (Tabla 11).

<b>CoM: medio de co-cultivo</b>	<b>Cantidad</b>
MS (mezcla de sales)	4,30 g/L
Hidrolizado de caseína	0,25 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5 de Gamborg	1 ml/L
2,4-D (10 mM)	1 ml/L
BAP (10 mM)	0,5 ml/L
Phytigel (Sigma)	8 g/L

**Tabla 11. Medio de co-cultivo (CoM).** pH= 5,7 con NaOH 1M.

Una vez finalizado ese tiempo, se secaron las secciones de hoja con papel de filtro estéril y se colocaron en **medio CoM sólido** sin selección con el parte abaxial de los folíolos hacia arriba. En este medio de cultivo se sustituyó la kinetina como fuente de citoquininas (Samac *et al.* 2004) por 6-bencilaminopurina (BAP). Los explantes inoculados se mantuvieron durante 5 días en oscuridad a 22 °C, en lugar de 24°C como se describe en la mayoría de los protocolos. Disminuir la temperatura nos ha servido para que el crecimiento del *Agrobacterium* sea lento y dañe lo menos posible al explante (condición fundamental para un resultado óptimo). Durante este tiempo, Samac *et al.* (2004) eliminaban el exceso de *Agrobacterium* de los explantes mediante una descontaminación manual utilizando agua. Introducían los explantes en un tubo falcon con agua y agitaban durante 20 segundos. Pasado este tiempo, secaban con papel de filtro estéril y lo colocaban de nuevo en el medio anterior. Este proceso lo repetían cada dos días. Nosotros, cambiamos este proceso de descontaminación tras

los 5 días de co-cultivo, llevando a cabo una incubación en medio líquido CoM suplementado con 250 mg/L de ticarcilina (que inhibe el crecimiento de *A. tumefaciens*) o/n a 28 °C y en agitación a 180-200 rpm. Con la eliminación del Agro en medio líquido, evitábamos la manipulación excesiva del explante mediante la técnica de arrastre, procediendo así, la eliminación del *Agrobacterium* es del 100 % en los sucesivos subcultivos.

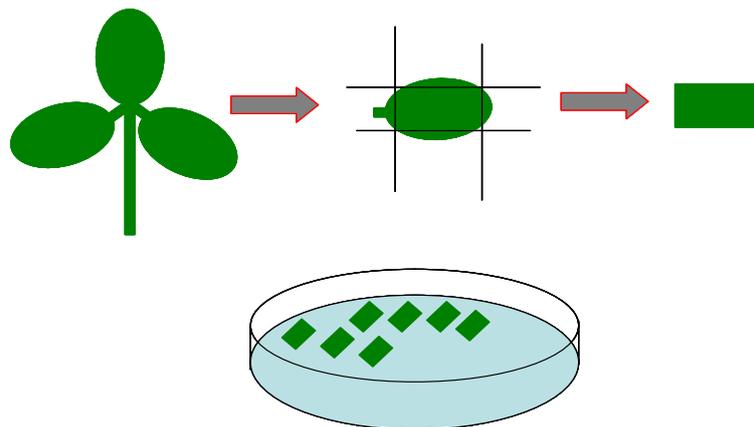


Figura 40. Esquema del proceso de disección de hojas de alfalfa y co-cultivo con Agro.

## 2.5. Inducción de callos embriogénicos y selección de transformantes

A continuación, se transfirieron los explantes de hoja a **medio sólido de inducción de callos (ICM)** suplementado con 250 mg/L de ticarcilina y con la concentración adecuada del agente selectivo según el plásmido utilizado (en nuestro caso higromicina 15 mg/L o kanamicina 50 mg/L), (Tabla 12). Se incubaron a 24 °C en luz suave ( $30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), subcultivándose cada dos semanas. Al igual que el anterior, este medio también contenía auxinas sintéticas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D) y citoquininas (BAP) que permitían la desdiferenciación de las células vegetales y su proliferación. A los pocos días de cultivo se produjo un engrosamiento de las zonas de corte, que derivó en callo. Finalmente, se extendió por todo el explante (Figura 41 A y B). Además, con el traslado a condiciones de luz, el callo tomó un color amarillo verdoso con zonas de color verde más intenso.

IcM: medio de inducción de callos	Cantidad
MS (mezcla de sales)	4,30 g/L
Hidrolizado de caseína	0,25 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5 de Gamborg	1 ml/L
2,4-D (10 mM)	1 ml/L
BAP (10 mM)	0,5 ml/L
Phytigel (Sigma)	8 g/L

Tabla 12. Medio de inducción de callos (IcM). pH= 5,7 con NaOH 1M.

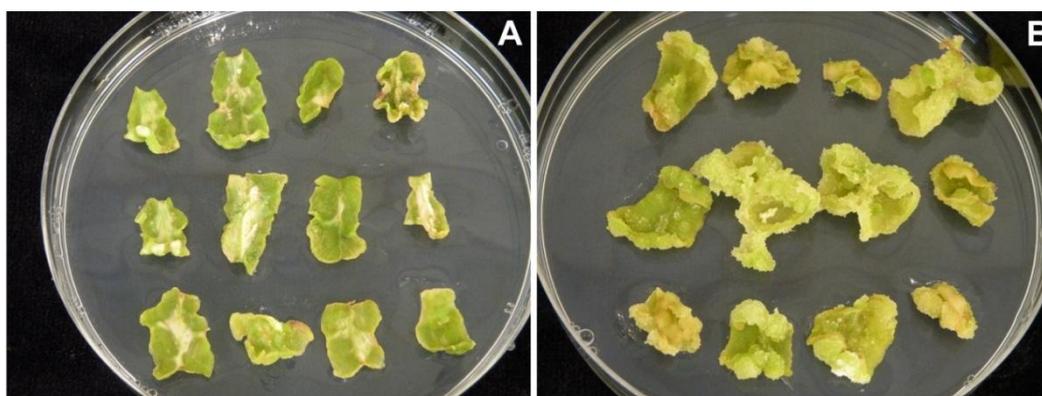


Figura 41. Fases iniciales de la regeneración *in vitro* a partir de explantes de hoja de alfalfa. (A). Explantes de hoja en medio de selección en la fase inicial de formación de callos. (B). Calogénesis en los bordes de los explantes en medio IcM.

A las cuatro o cinco semanas de cultivo en medio IcM, se comenzaron a formar las masas proembriónicas (Figura 41). Estos callos se transfirieron a **medio de desarrollo de embriones (DeM)** suplementado con 250 mg/L de ticarcilina, el agente de selección, y con 6M de prolina, ya que se ha descrito que la adición de prolina a los medios de cultivo incrementa la producción de embriones somáticos a partir de masas proembriónicas (Baeksed *et al.* 1997), (Tabla 13). Además, a diferencia de lo que está descrito en el protocolo de Samac *et al.* (2004), seguimos manteniendo el suplemento con auxinas. Estos callos se cultivaron con luz fuerte (60-80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) a 24 °C en condiciones de 16 h de fotoperiodo. Finalmente, en este medio de cultivo se produjo la diferenciación y posterior desarrollo de embriones globulares (Figura 42).



**Figura 42. Callos proembriogénicos en medio de desarrollo de embriones (DeM).** Explantes de hoja en medio DeM en la fase inicial de formación de embriones (proembriogénesis).

<b>DeM: medio de desarrollo de embriones</b>	<b>Cantidad</b>
MS (mezcla de sales)	4,30 g/L
Hidrolizado de caseína	0,25 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5 de Gamborg	1 ml/L
2,4-D (10 mM)	0,3 ml/L
Phytigel (Sigma)	7,5 g/L

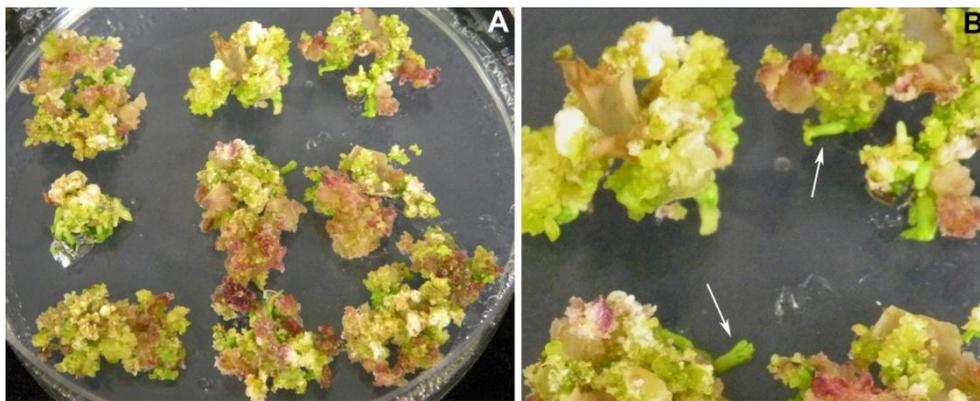
**Tabla 13. Medio de desarrollo de embriones (DeM).** pH= 5,7 con NaOH 1M.

## 2.6. Desarrollo y germinación de embriones para producir plántulas

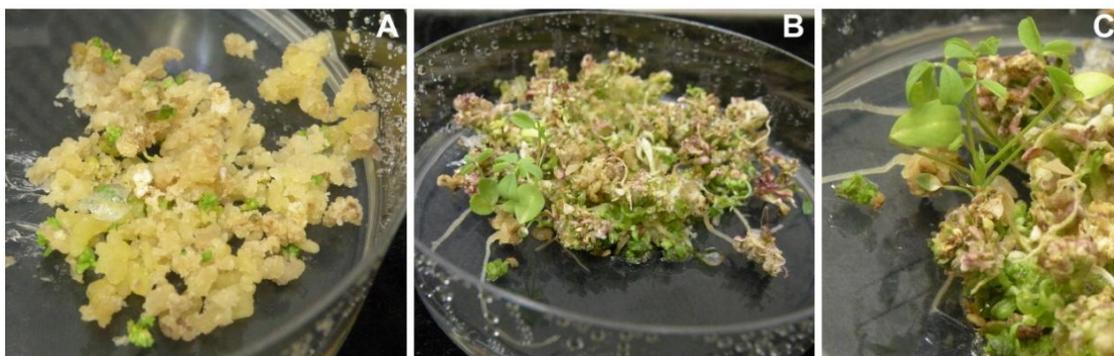
Unas 4 semanas después de transferir a medio DeM, se observó la formación de embriones globulares. Cuando observamos esta formación, se transfirieron a **medio de germinación de embriones (GeM)** sin hormonas y suplementado con 6M de prolina (Tabla 14) para que los embriones continuaran su desarrollo (Figura 43 A y B). En el protocolo descrito por Samac *et al.* (2004), no se suplementa este medio con prolina. Para que se llevase a cabo un buen desarrollo embrionario, disgregamos los callos para poner bien en contacto a los embriones en desarrollo con el medio selectivo para evitar la aparición de escapes, pero identificando aquellos que procedían de un mismo explante (Figura 44 A).

<b>GeM: medio de germinación de embriones</b>	<b>Cantidad</b>
MS (mezcla de sales)	4,30 g/L
Hidrolizado de caseína	0,25 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5 de Gamborg	1 ml/L
Phytigel (Sigma)	7,5 g/L

**Tabla 14. Medio de germinación de embriones (GeM).** pH= 5,7 con NaOH 1M.



**Figura 43. Callos embriogénicos en medio de germinación de embriones GeM. (A).** Callos con embriones en distintas fases de desarrollo. **(B).** Embriones en fase cotiledonar (flechas) antes de germinar y desarrollar plántulas.



**Figura 44. Desarrollo de plántulas a partir de embriones germinados *in vitro*. (A).** Callos embriogénicos disgregados mostrando los embriones en desarrollo en contacto con el medio de selección. **(B).** Plántulas desarrolladas a partir de embriones germinados, se observa la formación de raíces y la aparición de las primeras hojas trifoliadas. **(C).** Detalle de una planta en desarrollo mostrando tallo con hojas trifoliadas y raíz.

En este estadio, se podían separar los embriones en fase cotiledonar (Figura 45 D, E y F) para que continuaran germinando por separado o se podían dejar en este mismo medio hasta que la raíz se desarrollara unos 2-5 mm de largo y la primera hoja trifoliada también se desarrollara (Figura 44 B y C).

Una vez formadas las plántulas de alfalfa, se transferían a un **medio de desarrollo de plantas (DpM)** sin prolina y sin selección (Tabla 15), en contenedores más altos (tipo Magenta) para que se desarrollara bien la raíz y la parte vegetativa de la planta creciera en altura (Figura 45 G).

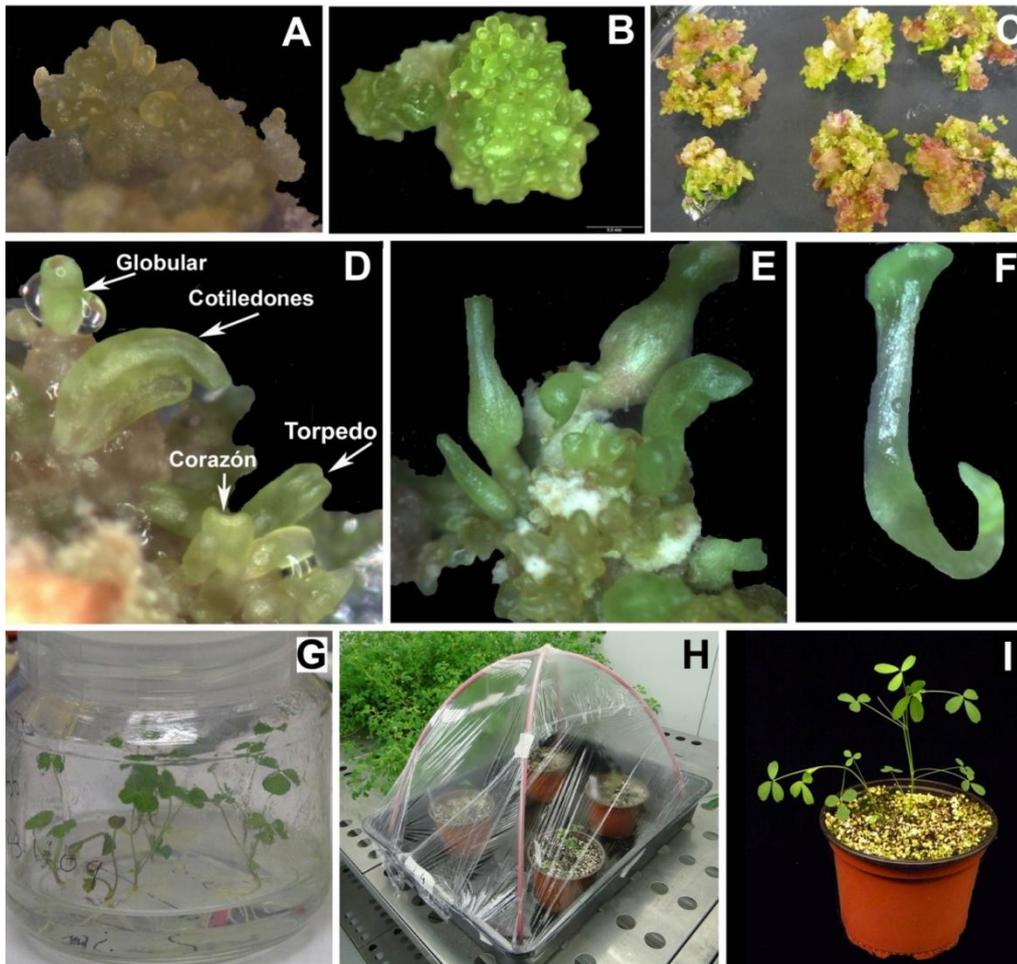
<b>DpM: medio de desarrollo de plantas</b>	<b>Cantidad</b>
MS (mezcla de sales)	4,30 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5 de Gamborg	1 ml/L
Phytigel (Sigma)	7,5 g/L

**Tabla 15. Medio de desarrollo de plantas (DpM).** pH= 5,7 con NaOH 1M.

## 2.7. Aclimatación de plantas a condiciones de invernadero

Las plantas bien enraizadas en los contenedores *in vitro* se transfirieron a alveolos o a pequeñas macetas con sustrato (50% de turba rubia, 25% de vermiculita nº 3 y 25% de perlita) cuando ya tenían formadas 2-3 hojas trifoliadas. Se taparon con un film de plástico para mantener las condiciones de humedad y se aclimataron a condiciones de invernadero progresivamente (Figura 45 H). La aclimatación se realizó abriendo pequeños orificios en el film plástico para que en unos días las plantas cerraran sus estomas y se acostumbraran a la humedad ambiental del invernadero (Figura 45 I).

La duración del protocolo de transformación desde que se inicia el co-cultivo de los explantes hasta la aclimatación de las plantas es de unas 20-25 semanas.



**Figura 45. Diferentes etapas del protocolo de transformación de alfalfa y fases del desarrollo embrionario. (A).** Detalle de callo proembriónico desarrollado en medio de inducción (IcM). **(B).** Callo embriogénico en medio de desarrollo (DeM). **(C).** Callos embriogénicos en medio de germinación (GeM). **(D).** Detalle de callo embriogénico en medio de germinación (GeM) mostrando diferentes estadios del desarrollo embrionario. **(E).** Detalle de callo con embriones germinado en fase cotiledonar. **(F).** Detalle de un embrión germinando con radícula. **(G).** Plántulas de alfalfa procedentes de la germinación de embriones en medio de desarrollo de plantas (DpM). **(H).** Aclimatación de plantas transgénicas enraizadas en maceta en un mini-invernadero. **(I).** Planta transgénica aclimatada y en desarrollo (invernadero).

Es conveniente mantener plantas stock mediante enraizamiento de esquejes en **medio de mantenimiento *in vitro* de esquejes (SH10b)** (Chaubaud *et al.* 2008), (Tabla 16). El objetivo de la propagación clonal es la obtención de genotipos idénticos al original a través de la multiplicación vegetativa (a partir de las yemas axilares o del meristemo caulinar). Otra ventaja de realizar esta práctica es la producción de clones de una determinada planta transgénica de interés con objeto de disponer de planta

abundante para la realización de análisis fenotípicos o moleculares (Figura 46). También se pueden obtener clones mediante enraizamiento en maceta de yemas axilares o apicales de plantas cultivadas en invernadero utilizando una mezcla de hormonas de enraizamiento (IBA+IAA) como se describe en Materiales y Métodos.

Medio de propagación clonal <i>in vitro</i>	Cantidad
Macronutrientes 20x	50 ml/l
Micronutrientes 100x	10 ml/l
Vitaminas 100x	10 ml/l
Myo-inositol	1 g/l
Fe EDTA	5,5 ml/l
Sacarosa	10 g/l
Phytigel (Sigma)	7 g/l

Tabla 16. Medio de propagación clonal *in vitro* (SH10b). pH= 5,7 con NaOH 1M.

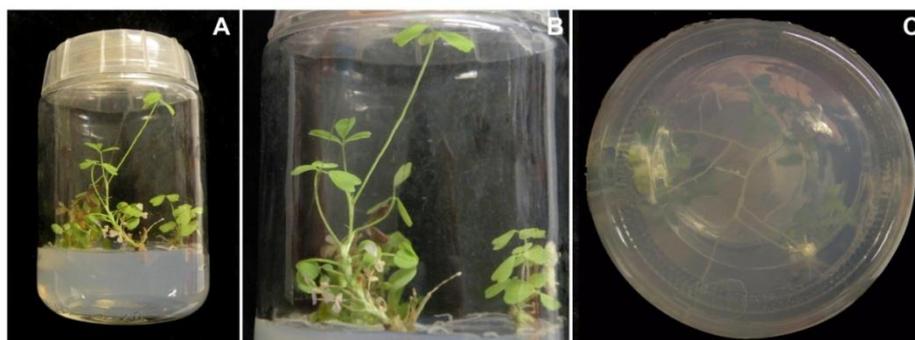
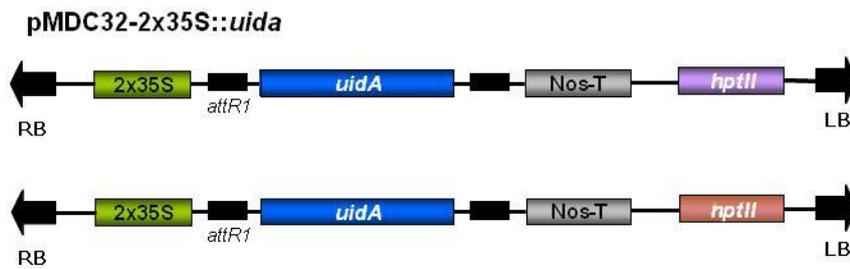


Figura 46. Plántulas en desarrollo procedentes de la germinación de embriones aislados en medio de desarrollo de plantas (DpM). (A). Contenedor tipo Magenta con medio DpM. (B). Detalle de las plantas en desarrollo. (C). Detalle de las raíces de una planta en desarrollo.

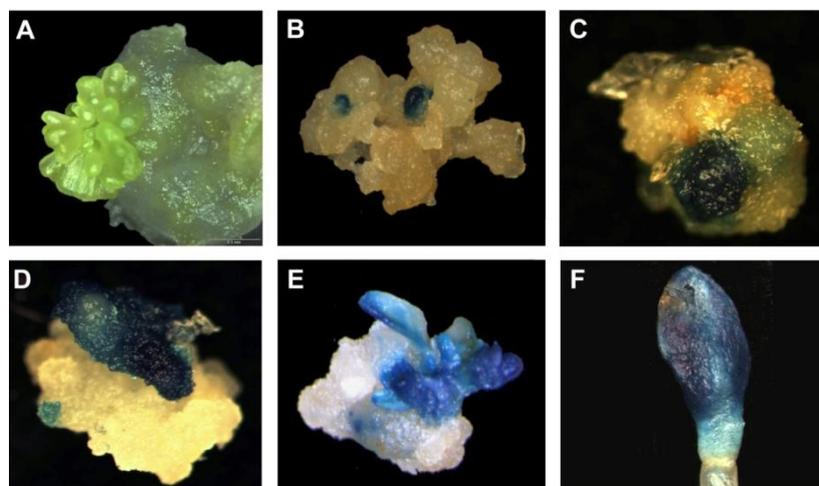
### 3. Ensayos de GUS para el seguimiento del protocolo de transformación

Con objeto de realizar un seguimiento del protocolo de transformación y evaluar la eficiencia del mismo, realizamos dos construcciones en el vector pMDC32 que contenían el gen *uidA* (GUS-intrón) bajo el control de un doble promotor CaMV35S de expresión constitutiva. Una construcción también llevaba el gen *hptII* y la otra el gen *nptII* que confieren resistencia a higromicina y a kanamicina, respectivamente, con objeto de seleccionar las células transformantes (Figura 47).



**Figura 47. Construcciones en el vector pMDC32 del gen *uidA* (GUS-intrón) bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (2x) y con los genes de selección *hptII* y *nptII* que confieren resistencia al antibiótico higromicina y kanamicina, respectivamente.**

En la Figura 48 se pueden observar distintas tinciones de GUS correspondientes a diferentes estadios de la regeneración de embriones transgénicos a partir de callos proembriogénicos. Observamos que ambas construcciones con sus respectivos agentes de selección, dieron lugar a masas proembriogénicas y embriogénicas transgénicas. Como ya habíamos comprobado anteriormente en *M. truncatula*, en los callos de alfalfa que se desarrollan en medios con kanamicina aparece una mayor proporción de falsos transformantes, llegando a una proporción de 1:5 respecto a los callos transgénicos resistentes al antibiótico higromicina (Figura 48 C).



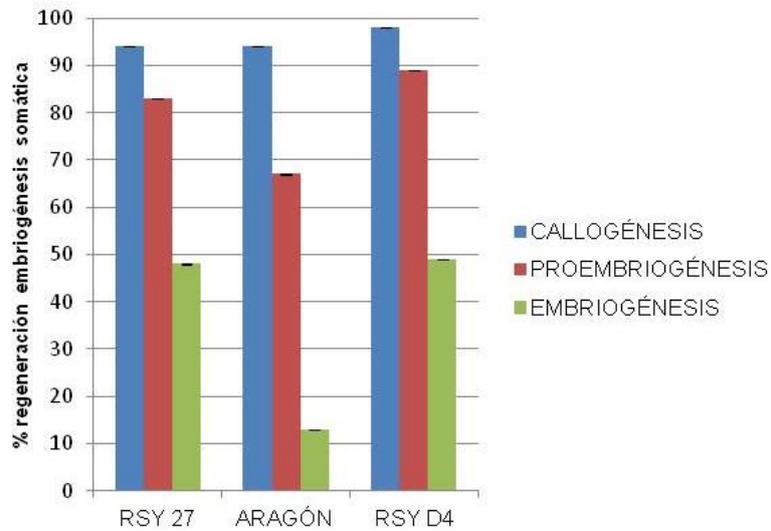
**Figura 48. Resultados de la transformación de alfalfa Regen-SY27 con el gen delator *uidA* (GUS).** La tinción GUS (azul) indica la presencia de células transformadas. **(A).** Callo embriogénico sin transformar. **(B).** Formación inicial de masas embriogénicas transgénicas resistentes a higromicina. **(C).** Masa embriogénica transgénica (azul) resistente a kanamicina junto a una no transgénica (verde). **(D).** Callo embriogénico en los primeros estadios de formación de embriones en un callo resistente a higromicina. **(E).** Germinación embriones transgénicos en medio con higromicina. **(F).** Embrión transgénico en fase cotiledonar resistente a higromicina.

#### 4. Evaluación de la eficiencia del protocolo de transformación

La evaluación de la eficacia del protocolo descrito en este capítulo, se ha realizado en el contexto de un proyecto de investigación realizado durante cinco años en nuestro laboratorio y en el que se han transformado tres variedades de alfalfa, Regen-SY 27, RSY 4D y el genotipo comercial Aragón, con distintas construcciones génicas introducidas vía *A. tumefaciens* AGL1 y utilizando el gen de selección *hptII* (resistencia a higromicina).

Los datos correspondientes a los tres procesos de regeneración de embriones, callogénesis, proembriogénesis y embriogénesis, proporcionados por distintos eventos de transformación, han sido utilizados para realizar la estimación de la eficiencia del protocolo de transformación desarrollado. La formación de callos (callogénesis) ocurrió entre el 91-100% de los explantes inoculados y en la proembriogénesis se observaron eficiencias cercanas al 60-80% para los tres genotipos. La formación de callos embriogénicos viables resultó en una eficiencia en torno al 50 % tanto para la Regen-SY27, como para la RSY 4D. Este porcentaje de embriogénesis se refiere a la formación de embriones en fase cotiledonar (maduros) que continuaron su desarrollo hasta la producción de plantas completas. Este proceso se ve disminuido en el caso de la variedad comercial Aragón donde el porcentaje de embriogénesis es en torno al 13 % (Figura 49).

La eficiencia de transformación medida como la obtención de plantas transgénicas completas a partir de un explante inicial, es difícil de precisar debido a la variabilidad de cada ensayo de transformación. Esta variabilidad está posiblemente determinada por las diferencias en la producción y maduración de embriones dependiendo del estado fisiológico del material de partida y de las diferencias que en algunas ocasiones mostraron las plantas madre de un mismo genotipo en cuanto a su capacidad de regeneración. Así pues, podemos concluir que el 50 % de los explantes inoculados tuvieron la capacidad de regenerar embriones maduros vía embriogénesis somática, y que el 80-100 % de las plantas que se obtuvieron de esos embriones, contenían el T-DNA con el conjunto de transgenes introducidos.



**Figura 49. Media de los diferentes eventos de transformación para evaluar la eficiencia del protocolo en tres cultivares de alfalfa: RSY 27, Aragón y RSY 4D, utilizando la cepa AGL1 y el gen de selección *hptII* (resistencia a higromicina).** Los valores medios representan el porcentaje de regeneración en las distintas fases del proceso de embriogénesis somática (callogénesis, proembriogénesis y embriogénesis) en tres cultivares de alfalfa: RSY 27, Aragón y RSY 4D. La combinación de la cepa AGL1 con la resistencia a higromicina en el cultivar RSY 4D es la que da mayor porcentaje de regeneración, seguida de RSY 27 y por último, del cultivar Aragón.



---

# **CAPÍTULO I**

---

## **DISCUSIÓN**

---



La alfalfa es el forraje más cultivado en el mundo y por ese motivo ha atraído el interés de las compañías de semillas desde hace muchos años, habiéndose realizado importantes programas de mejora genética convencional encaminados fundamentalmente a conseguir variedades más productivas con elevado valor alimenticio. Más recientemente muchas de esas compañías, especialmente norteamericanas, han puesto en marcha importantes programas de mejora biotecnológica enfocados a aumentar la digestibilidad de este forraje por el ganado mediante la obtención de variedades con bajo contenido en lignina, alfalfas “*long life*” con senescencia retardada o variedades capaces de producir taninos condensados para impedir el meteorismo en el ganado rumiante y la excesiva desaminación de las proteínas en el rumen (efecto *by-pass*). Estos programas de mejora están sustentados por técnicas de ingeniería genética y metabólica, necesitándose además eficaces protocolos de transformación genética que permitan la obtención de gran cantidad de plantas genéticamente modificadas. Con estas consideraciones queremos significar que, aunque esta tecnología se ha debido desarrollar ampliamente en los últimos años, existe muy poca información disponible sobre los resultados obtenidos ya que mucha de la metodología desarrollada por las empresas no se publica o como mucho aparece descrita dentro del contexto de una determinada patente. Por este motivo, y tras no poder reproducir dos protocolos de transformación de alfalfa que habían sido anteriormente descritos, uno por embriogénesis somática (Samac 2004) y el otro por transformación *in planta* a partir de plántulas obtenidas por germinación de semillas (Weeks 2008), nos planteamos desde el principio poner a punto un protocolo de transformación mediante embriogénesis somática que fuera realmente eficaz y que nos permitiera obtener un número elevado de plantas transgénicas para poder validar las herramientas moleculares que pretendíamos diseñar para introducir nuevos caracteres en este forraje.

### **Puesta a punto de un protocolo de transformación mediante embriogénesis somática en *M. sativa***

En primer lugar, para elegir el promotor constitutivo que íbamos a utilizar para la realización de nuestras construcciones, nos basamos en el trabajo publicado por Samac *et al.* (2004). En este trabajo compararon la eficiencia de cinco promotores de expresión constitutiva en alfalfa RSY introduciendo el gen de una quitinasa de *Trichoderma atroviridae* (*ech42*) que confería resistencia al ataque de hongos: el promotor del gen de la subunidad 35S del virus de mosaico de la coliflor (35S de CaMV), el del virus de mosaico de la nevadura de la Cassava (CsVMV), el del virus

baciliforme de la caña de azúcar (ScBV), el del virus del mosaico de la escrafularia (FMV) y el de la subunidad pequeña de la Rubisco (RbcS). De estos estudios se dedujo que cuando se utilizaba el promotor constitutivo CaMV35S dirigiendo la expresión del gen de la quitinasa, las plantas transgénicas mostraban una mayor resistencia al ataque de hongos, por tanto incorporamos este promotor a nuestras construcciones.

Por otro lado, en trabajos sobre transformación genética de alfalfa, el gen marcador más usado ha sido el *uidA* (GUS) y para seleccionar los transformantes el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y en algunos casos el *ppt* que confiere resistencia al herbicida glufosinato (Basta) (Zhang 2010), (Tabla 17). En cambio, trabajos anteriores en nuestro laboratorio con *Medicago truncatula* han mostrado que las construcciones que portaban el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (50 mg/L) daban lugar a la aparición de escapes. Por ello, incorporamos el gen *hptII* que confiere resistencia a higromicina a nuestras construcciones, ya que resultaba más efectivo para la selección de transformantes utilizado a bajas concentraciones (15 mg/L).

En algunos trabajos, se han utilizado distintas cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (Spano *et al.* 1987; Lu *et al.* 2000), pero en general, la mayoría de los protocolos desarrollados en los últimos años se basan en la utilización de distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que se co-cultivan con diferentes tipos de explantes. Sin ninguna duda la estirpe más utilizada de *A. tumefaciens* ha sido la LBA4404, si bien las eficiencias de transformación conseguidas con esta cepa no son en general demasiado altas, alcanzándose un máximo del 50% en el mejor de los casos (Atif *et al.* 2013). En algunas ocasiones se han utilizado, entre otras, las cepas de *Agrobacterium* C58 y AGL1, alcanzándose un máximo del 60% de eficiencia en algunos casos (Tabla 17). Nosotros hemos ensayado fundamentalmente dos cepas de Agro, la LBA4404 y la AGL1, ya que esta última se ha mostrado más infectiva en distintas especies de plantas (Lazo 1991).

<i>Agrobacterium</i> strain	Genotype	Explants	Selection marker and reporter genes	Transformation efficiency (%)	References
LBA4404	Regen-SY	Leaves	<i>GUS</i>		Samac et al. (2004)
<i>A. rhizogenes</i> NCPPB 1855.	Europe and Adriana	Roots	<i>Agropine/T-DNA</i>	–	Spano et al. (1987)
pUC19	<i>Not given</i>	Protoplasts	<i>CAT</i>	–	Harrison et al. (1991)
C58-R1000	Rangelander, Regen-S/C2-4	Petiole and stem	<i>T-DNA, NPT-II</i>	20	Du et al. (1994)
LBA4404	Moapa 69 and Cuf-IO1	Leaf and petiole	<i>npII</i>	10	Thomas et al. (1994)
LBA4404	RYS1 and RSY27	Ovaries and leaves	<i>npIII/GUS</i>	–	Micallef et al. (1995)
LBA4404	Regen-SY-27	Leaves	<i>npIII</i>	20–50	Austin et al. (1995)
C58, A281, LBA4404	1.5, 8.8 and 11.9	Leaves	<i>npIII</i>	60	Desgagnés et al. (1995)
A281 and LBA 4404	Zajcarska 83	Somatic embryos	<i>npIII</i> and/or <i>GUS</i>	30	Ninkovic et al. (1995)
pKANGUS and pPF19K	C2-4	Petioles and stems	<i>npIII/GUS</i>	–	Pereira and Erickson (1995)
LBA 4404, ABI and AGL1	Rangelander, <i>M. falcata</i> Ladak,	Leaves	<i>npIII/GUS</i>	60	Samac (1995)
<i>A. rhizogenes</i> 9402	Baoding, Rangelander	Hairy roots	<i>NPT II</i>	43–60	Lü et al. (2000)
LBA4404 and EHA101	<i>M. falcata</i> 47/1-5 and 47-150	Leaves	<i>npIII/GUS</i>	5–10	Shao et al. (2000)
LBA4404/pB11	Zajcarska 83	Immature embryos	<i>hpt gene/GUS</i>	1–14	Ninkovic et al. (2004)
LBA4404	Regen-SY	Leaves	<i>npIII/GUS</i>	–	Samac et al. (2004)
vector pLTAB357	Regen-SY	Leaf disks	<i>npII</i>	–	Tesfaye et al. (2005)
vector PSG529	RegenSY-27	Leaves	<i>NptII</i>	–	Calderini et al. (2007)
pPZP-hemL-nptII LBA4404	RSY1	Leaves	<i>NptII</i>	54	Rosellini et al. (2007)
LBA 4404	WL357HQ	Young seedlings	<i>GUS</i>	17.5	Weeks et al. (2008)
LBA 4404 vector p2GS-P5CS	Xinjiang Daye	Cotyledons, hypocotyls	<i>PPT</i>	6	Zhang et al. (2010)
LBA4404 and AGL1	RSY1	Leaves	<i>npIII/GUS</i>	10.4	Ferradini et al. (2011a)
AGL1	RSY1	Leaves	<i>MsGSAgr</i>	42–43	Ferradini et al. (2011b)

**Tabla 17. Cuadro comparativo de las publicaciones realizadas hasta el año 2013 sobre protocolos aplicables a la transformación genética de la alfalfa, donde se indican las cepas de Agro utilizadas, el genotipo de alfalfa, el tipo de explante inicial, los genes marcadores y de selección usados, la eficiencia de transformación del protocolo descrito y las referencias de sus autores (Adaptado de Atif *et al.* 2013).**

La mayoría de los protocolos para la transformación genética de la alfalfa que se han publicado hasta la fecha (Tabla 17) utilizan como material de partida explantes del genotipo Regen-SY (Bingham 1991; Goose y Bingham 1991) que presenta buenas tasas de regeneración mediante embriogénesis somática *in vitro*. Una carencia importante de la mayoría de los protocolos de transformación descritos es que son muy dependientes del genotipo utilizado y son poco aplicables a cultivares comerciales, teniéndose que desarrollar a posteriori complejos programas de mejora para conseguir una variedad comercial, ya que las líneas transgénicas obtenidas deben ser retrocruzadas con variedades de élite cultivadas para crear nuevos cultivares comerciales que porten los caracteres transgénicos deseados. Hace unos años, Weeks *et al.* (2008) publicaron un método de transformación *in planta* independiente del genotipo de alfalfa utilizado y aplicable a genotipos comerciales. Utilizando este método, la producción de plantas transgénicas era baja (17,5% de

eficiencia), (Tabla 17). El método se basa en la utilización de plántulas procedentes de semilla, y previamente tratadas con frío, a las que se retira el meristemo apical antes de infiltrar la planta decapitada con una solución de *Agrobacterium* de modo similar al protocolo utilizado para *Arabidopsis thaliana*. Tras varios días en cultivo *in vitro*, la zona seccionada comienza a regenerar brotes transgénicos sin necesidad de utilizar ningún tipo de agente selectivo en el medio de cultivo, lo cual propicia la aparición de numerosos escapes (Weeks *et al.* 2008). En el inicio de los trabajos de esta Tesis intentamos reproducir éste protocolo de transformación *in planta* sin demasiado éxito, ya que la mayoría de los brotes obtenidos no portaban el T-DNA. También ensayamos con poco éxito el protocolo de transformación genética por embriogénesis somática publicado por Samac *et al.* (2004), donde utilizan explantes de hojas como material inicial si bien no dan datos sobre la eficiencia de transformación de esta metodología (Tabla 17). Por ello, tuvimos que llevar a cabo la puesta a punto un protocolo de transformación genética de alfalfa basándonos inicialmente en el protocolo descrito por Samac *et al.* (2004), en el que hemos introducido distintas modificaciones.

A la hora de afrontar el desarrollo del protocolo de transformación se decidió utilizar como material de partida explantes de hojas, al igual que ocurre con el protocolo descrito por Samac *et al.* (2004). Sin embargo, a diferencia de lo que está descrito en otros protocolos, no utilizamos hojas procedentes de plantas propagadas mediante cultivo *in vitro*, sino hojas de plantas crecidas en condiciones de invernadero. Esto es debido a que nuestra experiencia anterior con *M. truncatula* nos mostró que estas hojas son más saludables, están más desarrolladas y son más fuertes, motivo por el cual toleran mejor los procesos de esterilización y de infección con *Agrobacterium*. Otros autores también han utilizado las hojas con o sin peciolo como fuente de explantes, aunque también se usaron en ocasiones plántulas, raíces, embriones inmaduros, tallos, ovarios, cotiledones o hipocotilos. En cambio, el uso de protoplastos para transformar está muy limitado en alfalfa, no existiendo prácticamente referencias sobre el uso de esta tecnología (Tabla 17).

En nuestros ensayos de regeneración a partir de explantes de hojas, la descontaminación por incubación en medio líquido suplementado con 250 mg/L de ticarcilina inhibió el crecimiento de *A. tumefaciens* y evitó que se manipularan de forma excesiva los explantes reduciendo los daños en el material. Además, se sustituyó la kinetina por BAP para que se llevara a cabo la desdiferenciación de las células vegetales y su proliferación. También el hecho de que se mantuviera el uso de la auxina sintética 2,4-D y de la citoquinina BAP en el medio de desarrollo de embriones

(DeM), así como la presencia de prolina en el medio de germinación de embriones (GeM), cosa que no ocurre en el protocolo descrito por Samac *et al.* (2004), daba lugar a que los embriones se desarrollaran y se multiplicaran de una forma más eficaz.

En resumen, nuestros resultados muestran que la combinación del uso de explantes de hojas jóvenes crecidas en condiciones de invernadero, procedentes de los genotipos Regen SY27 ó SY4D de alfalfa con alta capacidad de regeneración mediante embriogénesis somática, co-cultivados con la estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* que porta el gen *hptII* de resistencia a higromicina y la puesta a punto del protocolo de transformación genética, dio lugar a una buena eficiencia de transformación, obteniendo buenas tasas de calogénesis, proembriogénesis y embriogénesis. La duración del protocolo de transformación fue de unas 20-25 semanas y aproximadamente el 50% de los explantes inoculados producen embriones maduros viables tras el proceso de selección. La gran mayoría de las plantas (80-100%) que se desarrollaron a partir de dichos embriones contenían el T-DNA con los transgenes introducidos, no detectándose prácticamente la presencia de quimeras o escapes entre las plantas transgénicas generadas. Además, la puesta a punto de este protocolo de transformación nos ha proporcionado un buen número de plantas transgénicas de alfalfa y nos ha permitido disponer de una herramienta imprescindible para la realización de los otros dos objetivos y dotar de una herramienta eficaz a la comunidad científica para la introducción de nuevos transgenes en esta especie.

Actualmente estamos aplicando esta metodología en nuestro laboratorio para la obtención de plantas transgénicas del genotipo comercial Aragón que, como ya se ha comentado anteriormente, es el más cultivado en España. Hasta la fecha solo existe en el mercado una variedad comercial de alfalfa (*Roundup Ready; RR*) que ha sido modificada por ingeniería genética para hacerla resistente al herbicida glifosato. La reciente autorización de esa alfalfa transgénica por parte de las autoridades norteamericanas después de algunas moratorias, abre nuevas expectativas sobre el futuro de la mejora biotecnológica de este y otros forrajes, animando a las grandes compañías de semillas y a los grupos de investigación a iniciar programas de mejora en este campo.



---

## CAPÍTULO II

---

*Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen **TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)** de *M. sativa* para su posible uso como herramienta biotecnológica para retrasar el tiempo de floración en la alfalfa*



**CAPÍTULO II: Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* de *M. sativa* para su posible uso como herramienta biotecnológica para retrasar el tiempo de floración en la alfalfa**

**1. Aislamiento de los ortólogos de *TFL1* de *M. sativa*. Diseño de construcciones y obtención de plantas transgénicas con ganancia de función**

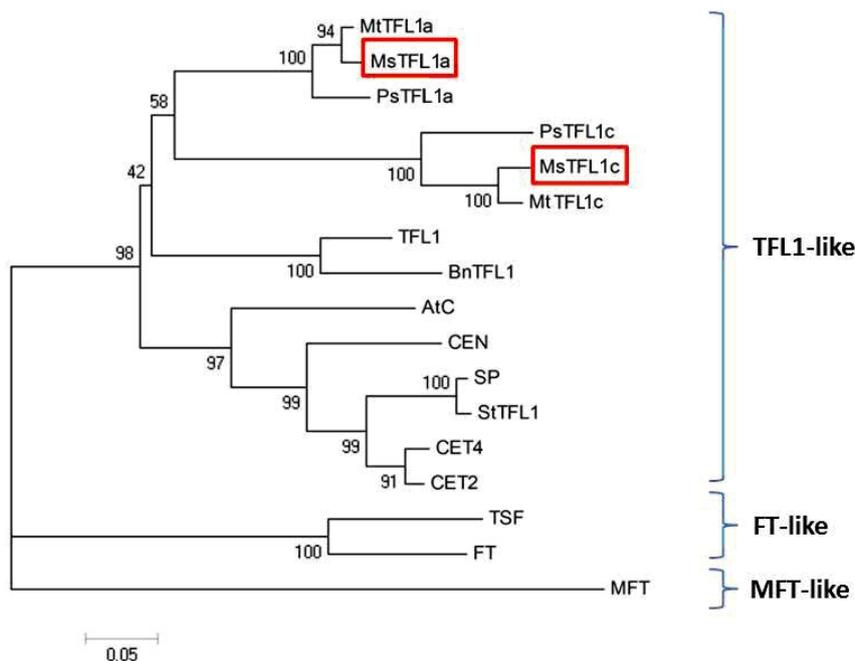
Los estudios realizados en *Arabidopsis*, indican que el gen *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* es un represor de la floración y un determinante clave de la arquitectura de la inflorescencia (Bradley *et al.* 1997; Ratcliffe *et al.* 1999). La sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis* extiende las fases vegetativas e inflorescente y retrasa la aparición de las flores. En este capítulo se describe el aislamiento de los ortólogos de *TFL1* en *M. sativa*, y los efectos de su expresión constitutiva en *Arabidopsis thaliana* y en alfalfa.

**1.1. Aislamiento de los ortólogos de *TFL1* de *M. sativa***

Se han aislado dos ortólogos de *TFL1* en *M. sativa*, a los que se denominaron *MsTFL1a* y *MsTFL1c*, manteniendo la nomenclatura usada en *Pisum sativum* (Foucher *et al.* 2003). Las secuencias codificantes de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* se aislaron a partir de RNA de ápices florales de *M. sativa* cv. RSY27 mediante RT-PCR. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias codificantes de *MtTFL1a* y *MtTFL1c* en *M. truncatula*, respectivamente (Comunicación personal Ana Berbel y Francisco Madueño).

Para el aislamiento de *MsTFL1a* se utilizaron los oligonucleótidos: *MsTFL1a* ATG DIR y *MsTFL1a* STOP REV (Tabla 4) que amplificaban la secuencia desde el ATG hasta el codón de parada. Se amplificó un fragmento de 525 pb que corresponde al cDNA completo del gen. Para el aislamiento del gen *MsTFL1c* se utilizaron los oligonucleótidos: *MsTFL1c* ATG DIR y *MsTFL1c* STOP REV (Tabla 4), con los que se amplificó un fragmento de 534 pb correspondiente a la secuencia codificante completa de este gen. Los cDNAs de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* se clonaron en el vector pCR8 con el fin de analizar sus secuencias.

Usando las secuencias protéicas completas de estos genes y de otros pertenecientes a la familia de proteínas CETS de diferentes especies, se realizó una reconstrucción filogenética (Figura 50). La topología del árbol filogenético muestra que los genes *MsTFL1a* y *MsTFL1c* están ubicados en el clado que incluye a los genes *TFL1*-like. Cada uno de ellos presenta una estrecha relación con sus respectivos ortólogos en las leguminosas *Medicago truncatula* (*MtTFL1a* y *MtTFL1c*) y *Pisum sativum* (*PsTFL1a* y *PsTFL1c*). Esta filogenia muestra que la duplicación que dio lugar a los ortólogos de *TFL1* en *M. sativa* (Figura 50), es relativamente reciente y precede a la especiación de las leguminosas.



**Figura 50. Análisis filogenético de proteínas de la familia CETS de diferentes especies de plantas.** El número próximo a los nodos indican los valores de bootstraps de 1000 réplicas. Se utilizaron las secuencias completas de las siguientes proteínas: *Medicago truncatula*: *MtTFL1a*, *MtTFL1c*; *Pisum sativum*: *PsTFL1a* (AY340579), *PsTFL1c* (AY343326); *Arabidopsis thaliana*: *TFL1* (U77674), *FT* (AB027504), *AtC* (AB024712), *MFT* (AF147721), *TSF* (AB027506); *Solanum tuberosum*: *StTFL1* (NM\_001288549); *Nicotiana tabacum*: *CET4* (AF145261), *CET2* (AF145260); *Solanum lycopersicum*: *SP* (U84140); *Antirrhinum majus*: *CEN* (AJ251994); *Brassica napus*: *BnTFL1* (BAA33415); *Medicago sativa*: *MsTFL1a*, *MsTFL1c*.

## 1.2. Sobreexpresión de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* en *Arabidopsis thaliana*

Para producir líneas de sobreexpresión de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* generamos las construcciones 35S::*MsTFL1a* y 35S::*MsTFL1c* usando el vector binario pH7WG2. En

ambas construcciones la expresión de las regiones codificantes de ambos genes estaba dirigida por una copia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), (Figura 51).



**Figura 51. Esquema de las construcciones generadas para la sobreexpresión de los genes *MsTFL1a* y *MsTFL1c*.** Construcciones utilizadas para la sobreexpresión de *MsTFL1a* (35S::*MsTFL1a*) y *MsTFL1c* (35S::*MsTFL1c*). 35S: promotor constitutivo 35S de CaMV; T35S: terminador 35S de CaMV; *hptII*: gen de selección por resistencia a higromicina.

Estas construcciones se usaron para transformar plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col). Como resultado de la transformación se obtuvieron 9 plantas capaces de crecer en medio de selección con higromicina para la construcción 35S::*MsTFL1a* y 10 plantas para la construcción 35S::*MsTFL1c*. Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de ambos genes sobre el tiempo de floración se estimó el mismo mediante el conteo del número total de hojas en el momento de la floración en las plantas transgénicas crecidas bajo condiciones de día largo. Los resultados de dichos conteos, así como otros aspectos relacionados con el fenotipo de estas líneas transgénicas, se muestran en la tabla 18. En las plantas 35S::*MsTFL1a* se observó un incremento tanto en el número de hojas caulinares como en el de roseta en todas las líneas analizadas con respecto a las plantas silvestres (Tabla 18). Estas plantas florecen tras producir un número total de hojas que oscila entre 22-32, mientras que las plantas silvestres lo hacen tras producir unas 9-11 hojas (Tabla 18 y figura 52). Las plantas control hicieron el “bolting” tras 16-17 días mientras que las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* tardaron entre 20-28 días (Tabla 18).

Además, las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* también mostraron cambios en la arquitectura de la inflorescencia. En la inflorescencia de las plantas silvestres de *A. thaliana* se observan dos fases. La primera da lugar a hojas caulinares que desarrollan inflorescencias secundarias o coflorescencias, y posteriormente una segunda fase en la que se producen flores únicas no sustentadas por hojas. Sin embargo, en las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* se alarga la duración de ambas

fases, y aparece una nueva que consiste en el desarrollo de coflorescencias no sustentadas por hojas caulinares (Tabla 18 y Figura 52 B).

	Plantas	Hoja de roseta	Hoja caulinar	Hojas totales	Días de bolting	Coflorescencias no sustentadas por hojas
<b>Silvestre</b>	1	8	2	10	17	0
	2	7	3	10	15	0
	3	8	3	11	16	0
	4	7	3	10	15	0
	5	8	2	10	16	0
	6	6	3	9	15	0
	7	7	2	9	16	0
	8	7	3	10	16	0
	9	8	3	11	16	0
	10	8	3	11	16	0
<b>35S::MsTFL1a</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	6	22	<b>20</b>	15
	2	16	6	22	20	16
	<b>3</b>	<b>23</b>	7	30	<b>27</b>	7
	4	17	7	24	20	16
	5	26	5	31	28	5
	6	20	6	26	21	8
	7	18	7	25	20	16
	8	19	7	26	20	15
	9	26	6	32	28	6
<b>35S::MsTFL1c</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	3	12	<b>17</b>	0
	<b>2</b>	<b>8</b>	3	11	<b>16</b>	0
	3	9	3	12	17	0
	4	9	3	12	17	0
	5	8	3	11	16	0
	7	8	3	11	16	0
	8	9	3	12	17	0
	9	9	3	12	16	0
	10	8	3	11	16	0

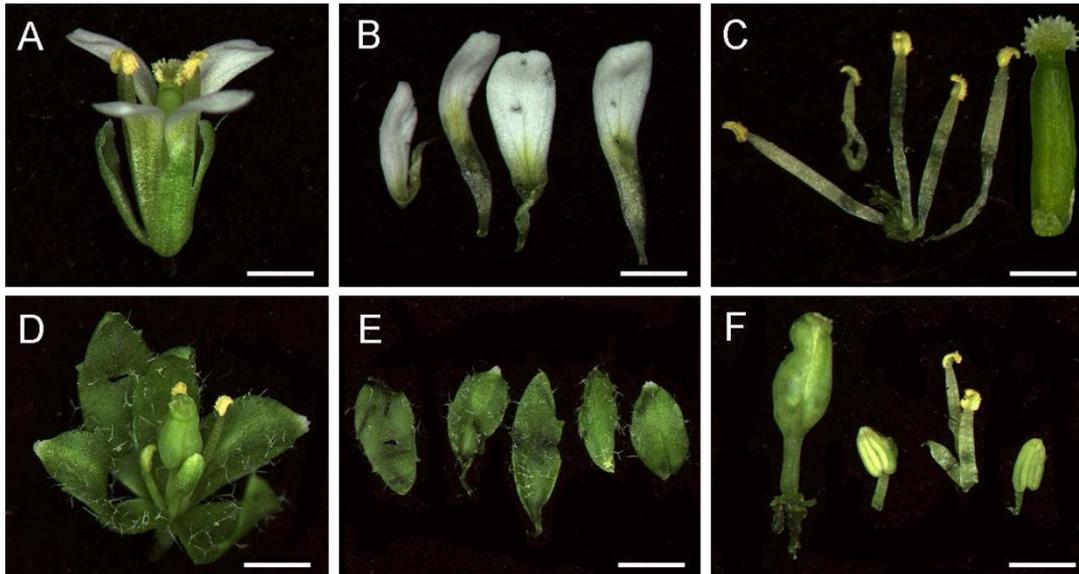
**Tabla 18. Fenotipo de floración en día largo de las líneas de sobreexpresión de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* en *A. thaliana*.** Se analizaron 9 líneas transgénicas independientes 35S::*MsTFL1a*, 10 líneas 35S::*MsTFL1c*, y 10 plantas silvestres cultivadas en condiciones estándar de día largo. En cada una de ellas se contó el número de hojas de roseta, el número de hojas caulinares del tallo principal, el número total de hojas (roseta + caulinares) producidas por el tallo principal, el número de días desde la germinación hasta que el tallo de inflorescencia elongó hasta un tamaño de  $\approx 0,5$  cm (días de bolting) y el número de coflorescencias no sustentadas por hojas caulinares.



**Figura 52. Fenotipo de las plantas 35S::MsTFL1a y 35S::MsTFL1c de *A. thaliana*. (A).** Plantas de una línea control (izquierda), de la líneas 35S::MsTFL1a 3 y 1 (centro) y de la línea transgénica 35S::MsTFL1c 1 (derecha) de 32 días de edad cultivadas bajo condiciones de día largo. Nótese que mientras que las plantas control y las plantas transgénicas 35S::MsTFL1c han florecido y ya han formado frutos, las línea transgénica 35S::MsTFL1a 3 acaba de realizar el “bolting” y la línea 35S::MsTFL1a 1 que aún no ha entrado en la segunda fase inflorescente, durante la cual se forman las flores que son aparentemente normales **(B)**. Nueva fase inflorescente compuesta por coflorescencias no sustentadas por hojas caulinares en las plantas transgénicas 35S::MsTFL1a (flecha blanca).

En estas plantas se forman flores anómalas. Estas flores presentan órganos semejantes a hojas en el primer verticilo, y carecen de pétalos (Figura 53). Eventualmente, las plantas 35S::MsTFL1a acaban por alcanzar la segunda fase inflorescente durante la cual se generan flores que son aparentemente normales. Las inflorescencias de roseta repiten el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal, obteniéndose una planta más grande y con una arquitectura muy ramificada.

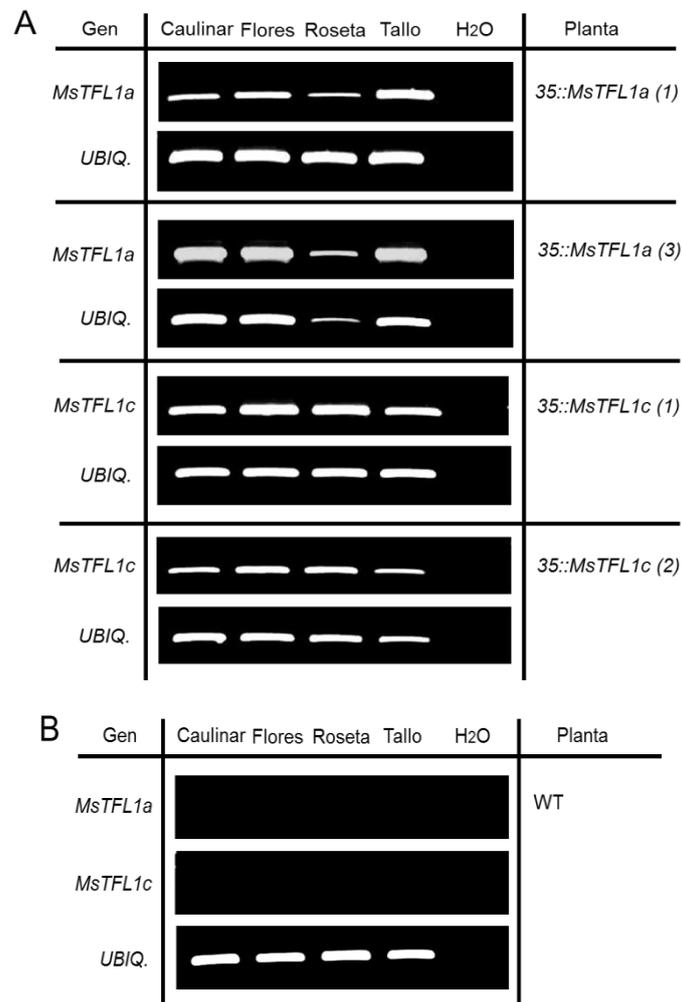
En cambio, en las plantas transgénicas 35S::MsTFL1c de *A. thaliana* no se observó un incremento notable en el número de hojas de roseta o caulinares comparado con el de las plantas silvestres. Además, no se observaron apenas diferencias entre estas líneas y las plantas control con respecto a los días transcurridos desde la germinación hasta el alargamiento del tallo (bolting), (Tabla 18).



**Figura 53. Fenotipo de las flores de las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* en *A. thaliana*.** (A). Flor de planta control. (B). Pétalos de planta control. (C). Estambres (izquierda) y carpelo (derecha) de planta control. (D). Flor de planta transgénica 35S::*MsTFL1a* con órganos anormales. (E). Pétalos de planta transgénica 35S::*MsTFL1a* con apariencia de sépalos (tricomas). (F). Estambres (derecha) y carpelo (izquierda) con alteraciones en una planta transgénica 35S::*MsTFL1a*.

Se evaluaron los niveles de expresión de los transgenes en distintos órganos de la planta en dos líneas independientes para cada construcción. Esto se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA procedente de hojas de roseta, de hojas caulinares, de tallo y de flores. Para el caso de la construcción 35S::*MsTFL1a* se pretendía comprobar si existe una correlación entre los niveles de expresión del transgén y la intensidad del fenotipo observado. Para ello se escogieron dos líneas transgénicas que diferían en el grado de retraso en el tiempo de floración: la línea 35S::*MsTFL1a* (1) presentaba un ligero retraso de aproximadamente 4 días y la línea 35S::*MsTFL1a* (3) presentaba un mayor retraso en el tiempo de floración de aproximadamente 11 días (Tabla 18). La línea 35S::*MsTFL1a* (1) mostró niveles variables de expresión de *MsTFL1a* entre los distintos tejidos. Se observaron unos niveles de expresión más fuertes en el tallo, seguido de las hojas caulinares y las flores, y por último, el tejido donde había menor expresión del transgén era en las hojas de roseta. En la línea 35S::*MsTFL1a* (3), se observaron niveles de expresión más altos en todos los tejidos de la planta en comparación con la línea 35S::*MsTFL1a* (1) (Figura 54), lo que indica que existe una correlación entre los niveles de expresión de *MsTFL1a* y el retraso en el tiempo de floración. Las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1c* (1) y (2) mostraron niveles similares del transgén en los tejidos de la

planta analizados. A pesar de ello, la expresión constitutiva de *MstTFL1c* en *Arabidopsis* no tuvo efecto sobre el tiempo de floración (Figura 54).



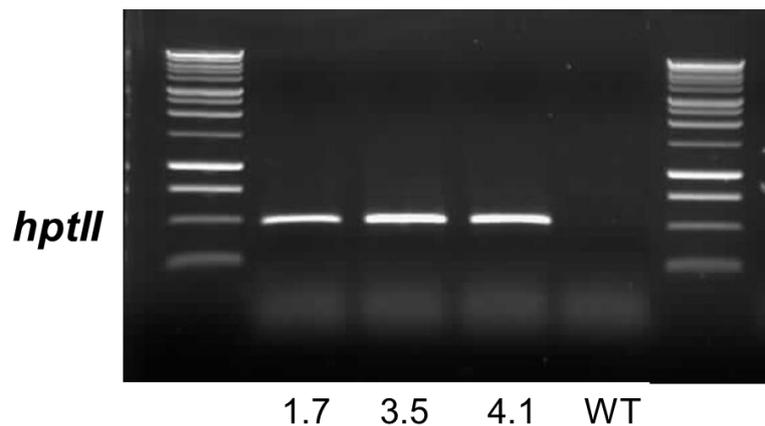
**Figura 54. Análisis de expresión de los transgenes *MstTFL1a* y *MstTFL1c* en sus respectivas líneas de sobreexpresión en *A. thaliana*. (A).** Expresión constitutiva de los genes *MstTFL1a* y *MstTFL1c* en hojas caulinares, hojas de roseta, tallo y flores transformadas de dos líneas distintas para cada construcción. **(B).** Ausencia de expresión de los genes *MstTFL1a* y *MstTFL1c* en las plantas silvestres. Los resultados de PCR se muestran a 25 ciclos de amplificación para todos los genes, excepto para el gen *AtUBIQUITINA* para el que se usaron 30 ciclos de amplificación.

Estos resultados confirman que la expresión constitutiva de *MstTFL1a* en *Arabidopsis* tiene un efecto, en forma de retraso, sobre el tiempo de floración, así como en la arquitectura de la inflorescencia. En cambio, la expresión constitutiva de su parálogo *MstTFL1c* en *A. thaliana* no tiene efectos ni en la arquitectura de la planta ni en el tiempo de floración.

## 2. Sobreexpresión del gen *MsTFL1a* en *M. sativa*

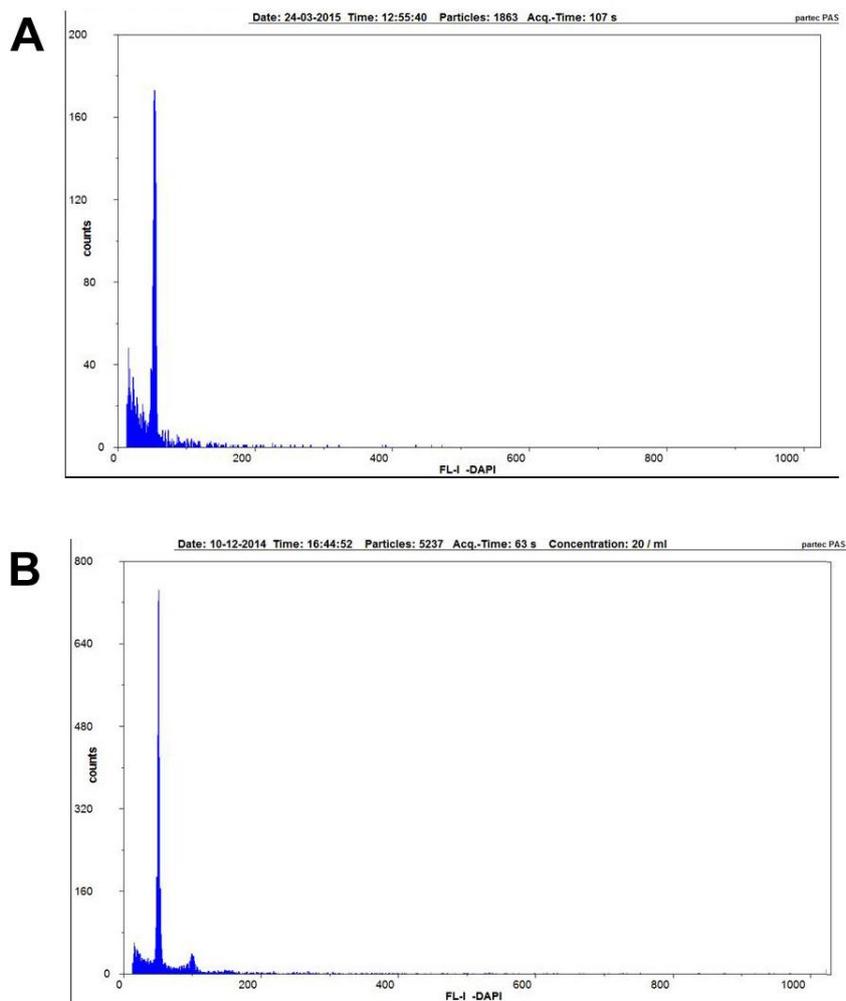
### 2.1. Obtención y caracterización de las plantas transgénicas

Para investigar si la construcción 35S::*MsTFL1a* es capaz de retrasar el tiempo de floración en alfalfa, y caracterizar el fenotipo resultante de la misma, se obtuvieron un total de 16 plantas transgénicas de *Medicago sativa* (Véase Apartado 2, Capítulo 1), pertenecientes a 3 líneas de *M. sativa* RSY4D independientes. De ellas se seleccionó una planta por cada línea independiente (1.7, 3.5 y 4.1) para su posterior caracterización fenotípica. Para corroborar la integración del T-DNA en las plantas transgénicas de alfalfa, se evaluó la presencia del gen *hptII*. Para ello se realizó una PCR a partir de DNA genómico aislado de hojas jóvenes de plantas transgénicas resistentes a higromicina usando oligonucleótidos específicos para este gen (Tabla 5). En todas las líneas se detectó la presencia del fragmento de 500 pb correspondiente al gen *hptII* que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Figura 55).



**Figura 55. Comprobación de la presencia del gen de selección de transformantes *hptII* en las plantas transgénicas seleccionadas mediante análisis de PCR.**

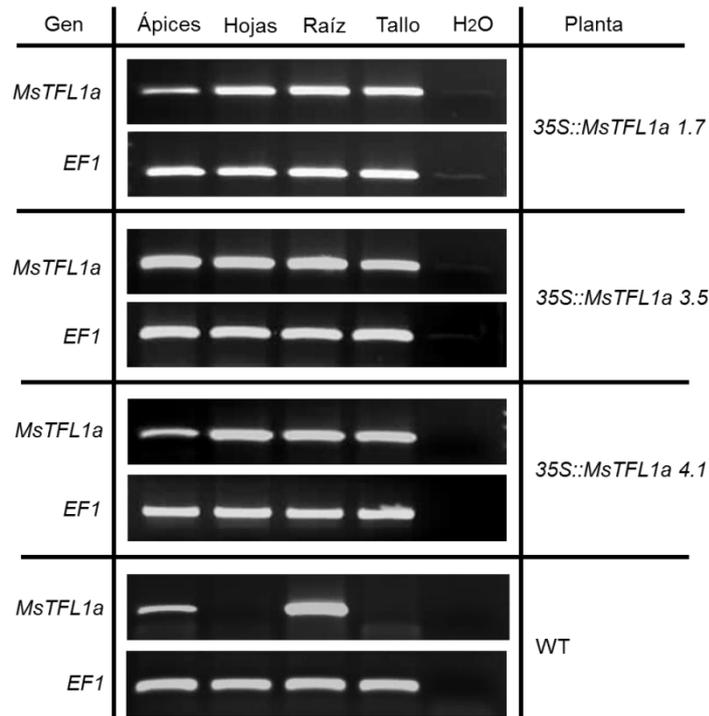
Las plantas seleccionadas se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo, a fin de evaluar su nivel de ploidía, resultando todas ellas tetraploides (4n) en comparación con el genotipo RSY4D de alfalfa utilizado como fuente de explantes para obtener las plantas transgénicas. Por tanto, las plantas producidas por embriogénesis somática no presentaban alteraciones en su nivel de ploidía y las posibles alteraciones fenotípicas que se pudieran observar no estarían relacionadas con este parámetro (Figura 56).



**Figura 56. Comprobación del nivel de ploidía en una de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a*.** (A). Planta control RSY4D tetraploide. (B). Planta 35S::*MsTFL1a* (3.5) del genotipo RSY4D (4n). Ambas plantas muestran el mismo nivel de ploidía (tetraploides).

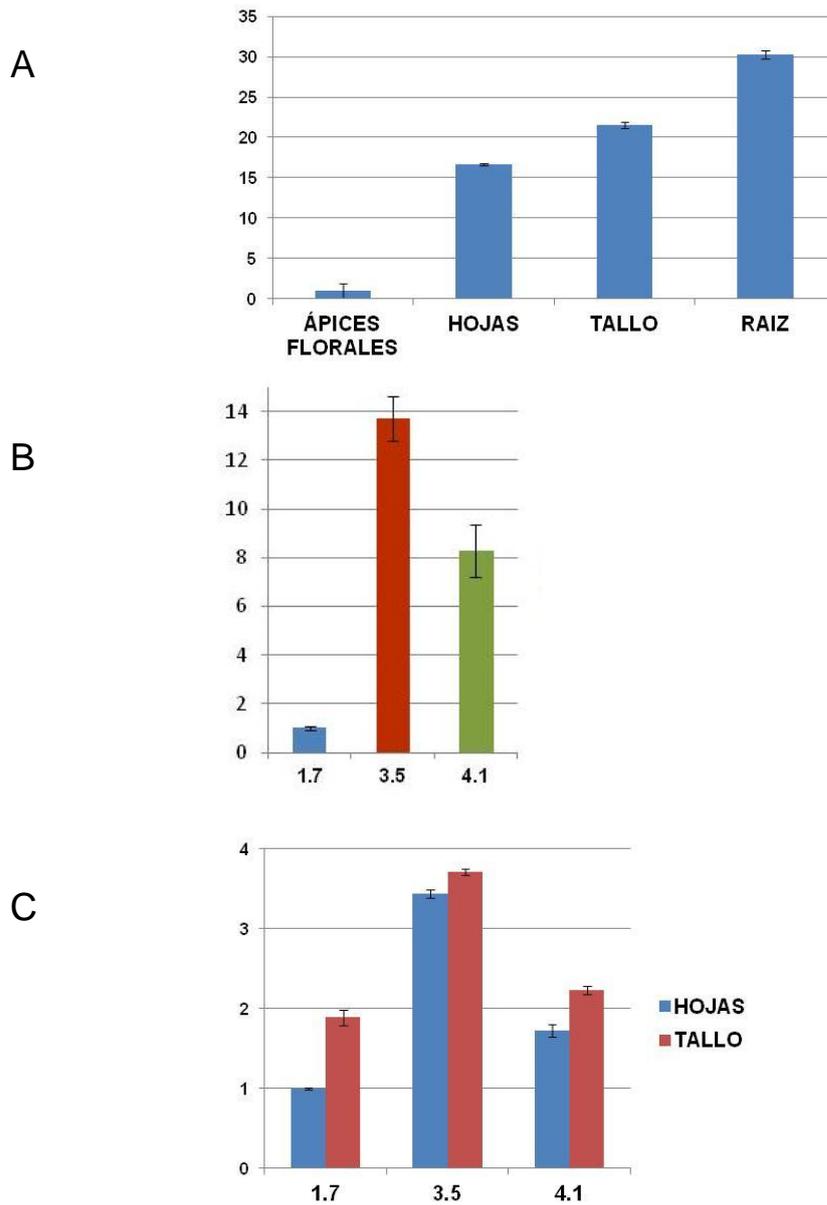
## 2.2. Análisis del nivel de expresión de *MsTFL1a* en las plantas transgénicas T1

Para analizar si las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* de *M. sativa* expresaban constitutivamente el transgén *MsTFL1a*, se analizaron sus niveles de expresión en las diferentes líneas. Esto se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA procedente de de ápices florales, hojas jóvenes, raíz y tallo para cada una de ellas las líneas transgénicas obtenidas (Figura 57). Los análisis muestran que el gen *MsTFL1a* se expresa constitutivamente en todos los órganos analizados de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a*.



**Figura 57. Expresión del transgén *MstFL1a* en distintos tejidos de las líneas transgénicas 35S::*MstFL1a*.** Se muestran los niveles de expresión de *MstFL1a* en ápices florales, hojas jóvenes, raíces y tallo en las líneas transgénicas y las plantas control mediante RT-PCR semicuantitativa. Como gen normalizador se utilizó el gen constitutivo endógeno *FACTOR DE ELONGACIÓN1* (*MseF1*). Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para *MstFL1a*, y 25 ciclos de amplificación para *MseF1*.

Sin embargo, estos niveles de expresión fueron más elevados en los tejidos no reproductivos como hojas, tallo y raíz (Figura 57). El nivel de expresión de *MstFL1a* en ápices florales apenas rebasaba el nivel de expresión alcanzado en este tejido en las plantas silvestres, con excepción de la línea 3.5 (Figura 57). Estas diferencias en los niveles de expresión del transgén entre los diferentes tejidos puede apreciarse en la figura 58, donde se comparan mediante qRT-PCR para la línea transgénica 35S::*MstFL1a* (4.1) a nivel de ejemplo (Figura 58 A). Para correlacionar posteriormente los niveles de expresión del transgén y la severidad de los fenotipos de las líneas transgénicas, se compararon los niveles de expresión de *MstFL1a* en los tallo, hoja y raíz (Figura 58 B) y en ápices florales (Figura 58 C); el análisis se llevó a cabo mediante qRT-PCR. Estos análisis mostraron que la línea transgénica 35S::*MstFL1a* (3.5) exhibe los mayores niveles de expresión de *MstFL1a* en los tejidos analizados.



**Figura 58.** Comparación entre los niveles de expresión del transgén *MstFL1a* entre diferentes tejidos de las líneas *35S::MstFL1a* cuantificados mediante qRT-PCR. **(A).** Se comparan los niveles de expresión del transgén *MstFL1a* en la línea *35S::MstFL1a* (4.1). Los niveles de expresión de *MstFL1a* se muestran relativos a los que presenta en ápices florales, que se ha igualado a 1. **(B).** Comparación entre los niveles de expresión del transgén *MstFL1a* en ápices florales entre las 3 líneas transgénicas *35S::MstFL1a* mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de *MstFL1a* se muestran relativos a los que presenta la línea *35S::MstFL1a* (1.7) que ha sido igualado a 1. **(C).** Se comparan los niveles de expresión en hojas y tallos entre las 3 líneas transgénicas *35S::MstFL1a* mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de *MstFL1a* se muestran relativos a los que presenta la línea *35S::MstFL1a* (1.7) en hojas que ha sido igualado a 1. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

## **2.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a***

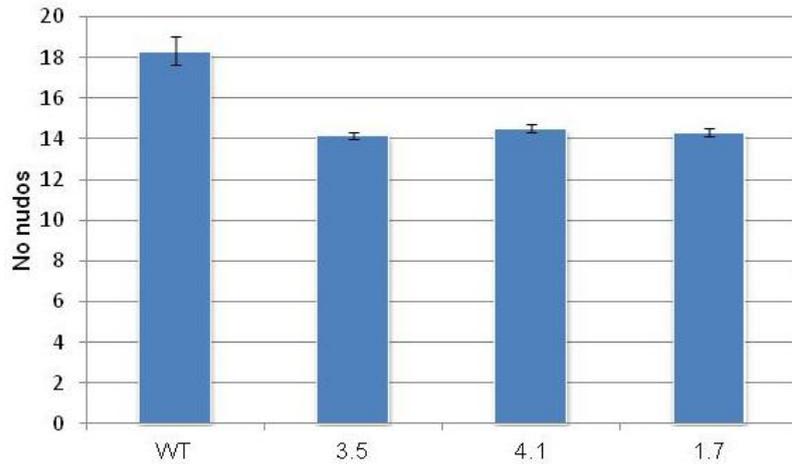
Como ya establecimos anteriormente, los genotipos de alfalfa Regen SY (4n) son bastante infértiles y es difícil obtener semillas a partir de las líneas transgénicas generadas. Al no poder obtener semillas de las distintas líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y de las plantas control y teniendo en cuenta que su pauta de crecimiento muy ramificado dificulta la estimación de parámetros referentes a caracteres vegetativos y reproductivos, las plantas se podaron en el mismo entrenudo con objeto de igualarlas como se explica convenientemente en el apartado 5.1.5 de Materiales y Métodos. De esta manera se pudo estimar con precisión todos los caracteres estudiados.

### **2.3.1. Características del desarrollo reproductivo**

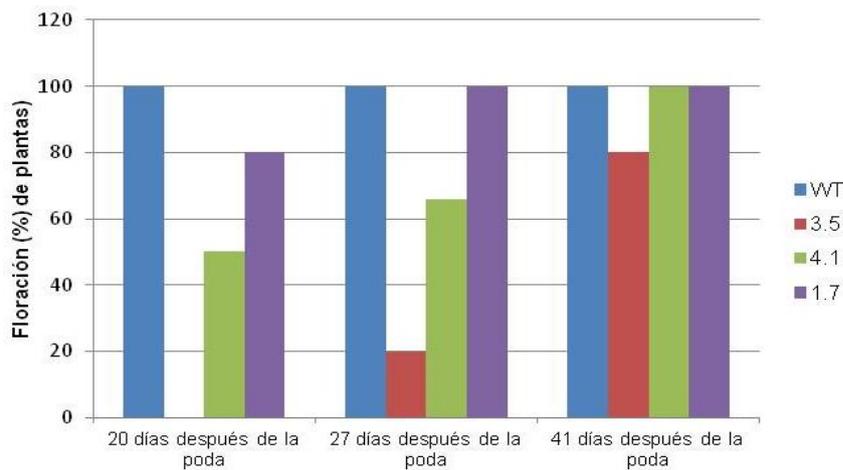
Respecto al desarrollo reproductivo, se evaluaron diferentes caracteres como el tiempo de floración, la arquitectura de la inflorescencia, el tamaño de las inflorescencias, el número de flores por inflorescencia y la morfología de la flor. Para todos estos caracteres se han observado diferencias entre las plantas transgénicas y las plantas control.

#### **2.3.1.1. Tiempo de floración**

Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de *MsTFL1a* sobre el tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* se utilizaron como medida del mismo el recuento del número de nudos formados desde la base de la planta hasta la primera inflorescencia. Se partió definiendo como día 0 el día en que se realizó la última poda, y se fijaron 3 tiempos distintos (20, 27 y 41 días) en los que se calculó el porcentaje de clones que habían florecido para cada una de las líneas transgénicas en comparación con las plantas control (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Los resultados se muestran en las figuras 59 y 60.



**Figura 59.** Número de nudos desde la base de la planta hasta la primera inflorescencia de las plantas transgénicas 35S::*MtFL1a* y las plantas control de *M. sativa*. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar.



**Figura 60.** Tiempo de floración medido a los 20, 27 y 41 días después de la poda para las plantas transgénicas 35S::*MtFL1a* y las plantas control de *M. sativa*. Las tres líneas transgénicas mostraron retraso de la floración, siendo más acusado en la línea 3.5.

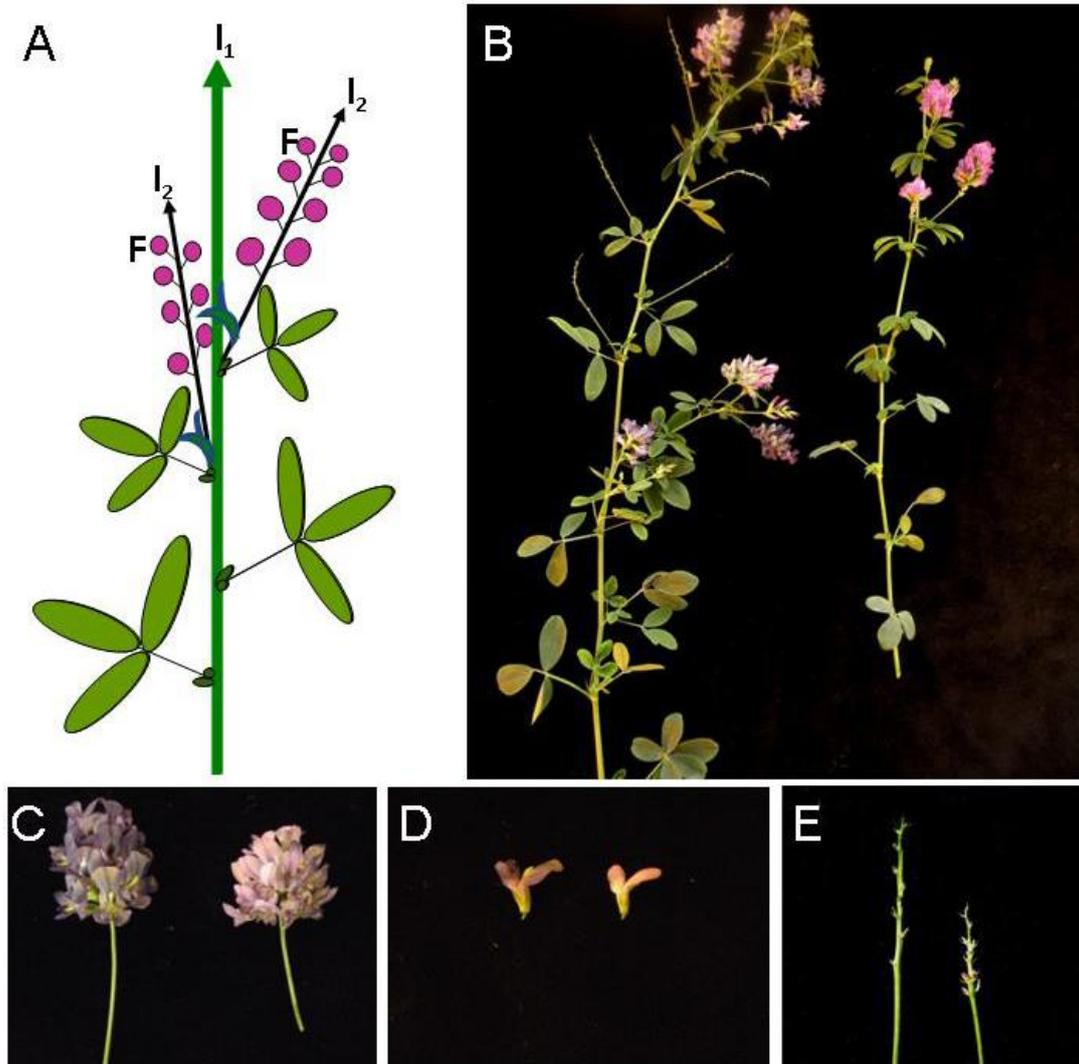
Se observó que en las plantas transgénicas la primera inflorescencia aparecía, como promedio, en el 14º nudo y en las plantas control en el 18º nudo (Figura 59). Por otro lado, cuando se contabilizó el porcentaje de plantas para cada una de las líneas que habían florecido, se observó que en las líneas transgénicas existía un retraso de la floración en comparación a las plantas control (Figura 60). El conjunto de plantas pertenecientes a la línea 35S::*MtFL1a* 3.5 exhibía un mayor retraso de la floración.

Esta línea exhibió mayores niveles de expresión del transgén (Figura 57), por lo que existe una correlación entre éstos y el retraso en el tiempo de floración.

### **2.3.1.2. Arquitectura de la inflorescencia**

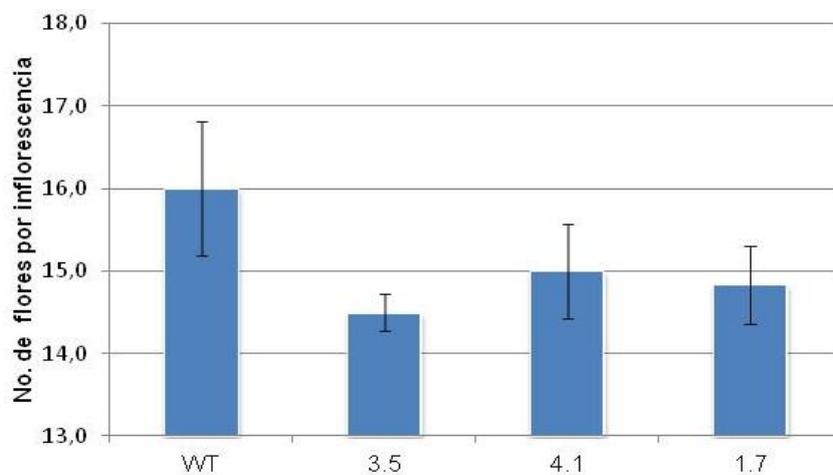
La arquitectura de la planta de *M. sativa* y el patrón de iniciación de órganos desarrollado por el meristemo apical se detalla a continuación. Los entrenudos vegetativos en *M. sativa* están compuestos de una hoja que desarrolla en su axila un meristemo, el cual se diferenciará formando una rama lateral. En los entrenudos reproductivos esta rama lateral se ve sustituida por una inflorescencia. En ambos tipos de entrenudos es frecuente la aparición de ramas laterales secundarias que se desarrollan a partir de meristemos accesorios en la axila de la rama lateral principal o de la inflorescencia. Este desarrollo de meristemos accesorios proporciona a *M. sativa* un porte mucho más ramificado.

La arquitectura de la inflorescencia en *M. sativa* es de tipo racimo compuesto. Tras la transición floral el meristemo apical del tallo se convierte en un meristemo inflorescente primario (I1) que produce, lateralmente, meristemos inflorescentes secundarios (I2) sustentados por hojas compuestas, constituidas por tres folíolos con los márgenes lisos y los bordes superiores ligeramente dentados. El I2 se diferencia en una inflorescencia secundaria que consta de un pedúnculo con racimos de flores. Finalmente, el I2 se agota diferenciándose en un órgano residual o “spike” (Figura 61 A). Las plantas transgénicas mostraron una arquitectura de la inflorescencia similar a la de las plantas no transformadas crecidas bajo las mismas condiciones (Figura 61). Sin embargo, el tamaño de las inflorescencias de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* es menor en comparación a una planta control (Figura 61 B). Para determinar si la reducción del tamaño de las inflorescencias de las plantas transgénicas que se observó cuando se compararon con las plantas control era reflejo de una reducción en el tamaño de las flores que compone el racimo, o si por el contrario era debido a una reducción en el número de flores, se comparó la apariencia de cada una de estas flores con la de las que se desarrollan en una planta control, y al mismo tiempo se contabilizó el número de flores producidas.



**Figura 61. Arquitectura de la inflorescencia en *M. sativa*. Las plantas transgénicas *35S::MsTFL1a* no presentan diferencias en la arquitectura de la inflorescencia, pero se aprecia un tamaño reducido de las mismas en comparación con los controles. (A).** Esquema de la organización de la inflorescencia de *M. sativa*. El meristemo vegetativo da lugar a un meristemo inflorescente primario ( $I_1$ ) tras la transición floral. Este  $I_1$  produce lateralmente meristemos inflorescentes secundarios ( $I_2$ ) que darán lugar a las flores (F). **(B).** Tallo principal de una planta control de *M. sativa* (izquierda) donde se han desarrollado inflorescencias comparado con un tallo inflorescente de una planta *35S::MsTFL1a* (derecha) que presenta un tamaño reducido en comparación con el control. **(C).** La inflorescencia de una planta *35S::MsTFL1a* (derecha) presenta un menor tamaño y un menor número de flores que la inflorescencia de una planta control (izquierda). **(D).** La flor de una inflorescencia de una planta *35S::MsTFL1a* (derecha) también presenta un menor tamaño en comparación a la flor de una planta control (izquierda). **(E).** El órgano residual (spike) de una planta *35S::MsTFL1a* es más corto (derecha) en comparación a una planta control (izquierda).

En general se observó que existía entre las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* una tendencia a producir flores de menor tamaño (Figura 61 D) y un menor número de flores por inflorescencia que las plantas control crecidas bajo las mismas condiciones (Figura 61 C). También el órgano residual o “spike” presentaba un tamaño más reducido al compararlo con el de una planta control (Figura 61 E). Mientras que en estas últimas el número medio de flores producidas era de 16, las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* producían entre 14,5 y 15 flores de media. También se observó que la línea transgénica 35S::*MsTFL1a* 3.5, que presentaba mayor retraso en el tiempo de floración, producía un menor número de flores en comparación con las otras líneas transgénicas (Figura 62).



**Figura 62. Número de flores por inflorescencia entre las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y las plantas control.** Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar.

### 2.3.1.3. Morfología de la flor

Las plantas transgénicas mostraron un desarrollo similar al de plantas no transformadas crecidas bajo las mismas condiciones. Las flores de las plantas control, al igual que las de las plantas 35S::*MsTFL1a*, desarrollaron los órganos característicos de la flor de *M. sativa*: cinco sépalos en el primer verticilo, cinco pétalos (un estandarte, que es el más grande, dos pétalos laterales, las alas, y dos pétalos cortos fusionados por el margen formando la quilla) en el segundo, diez estambres (nueve fusionan sus filamentos formando un tubo estaminal que rodea el carpelo y el décimo está libre) en el tercero y un carpelo central en el cuarto verticilo. Sin embargo, todas

las flores transgénicas mostraban una ligera reducción del tamaño de sus órganos en comparación con las flores control (Figura 63).



**Figura 63. Morfología de la flor de plantas transgénicas 35S::MsTFL1a de *M. sativa* y plantas control.** Reducción en el tamaño de los pétalos (A), los sépalos (B), el carpelo (C) y los estambres (tubo estaminal) (D), de las flores transgénicas 35S::MsTFL1a (derecha) en comparación con las flores control (izquierda).

### 2.3.2. Características del desarrollo vegetativo

#### 2.3.2.1. Crecimiento y desarrollo vegetativo

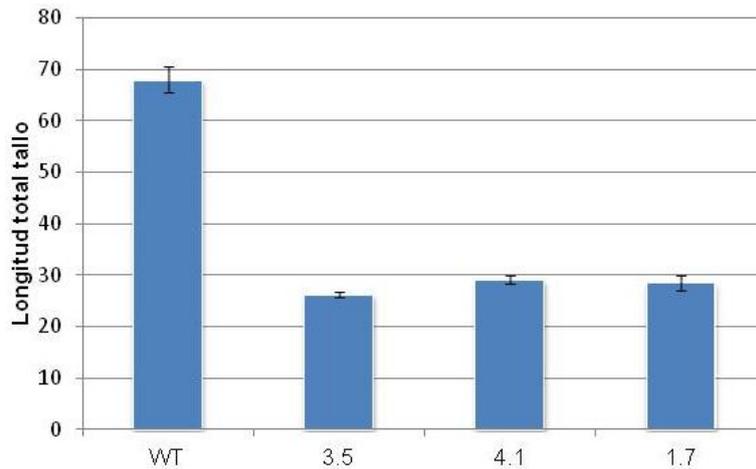
Además del fenotipo de retraso de floración mostrado por las plantas 35S::MsTFL1a, éstas presentaban un tamaño más reducido que los controles desde los primeros estadios de su desarrollo (Figura 64). Esta diferencia de tamaño se mantuvo durante todo el desarrollo de la planta, incluso después de la floración. La diferencia de tamaño se mantuvo incluso después de desarrollarse tras una poda.



**Figura 64. Crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas transgénicas 35S::*MtFL1a* (derecha) en comparación con las plantas control (izquierda).** Las plantas transgénicas muestran en general un tamaño más reducido comparadas con las plantas control desde estadios tempranos de su desarrollo hasta la floración.

### 2.3.2.2. Altura de las plantas

La altura de las plantas transgénicas se estimó tras la medición de 10 tallos florecidos de cada clon perteneciente a cada línea transgénica así como para las plantas silvestres (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Estos se midieron desde el segundo nudo hasta la primera inflorescencia.



**Figura 65. Altura media de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y las plantas control.** Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar. El promedio de la altura de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* era menor que las plantas control.

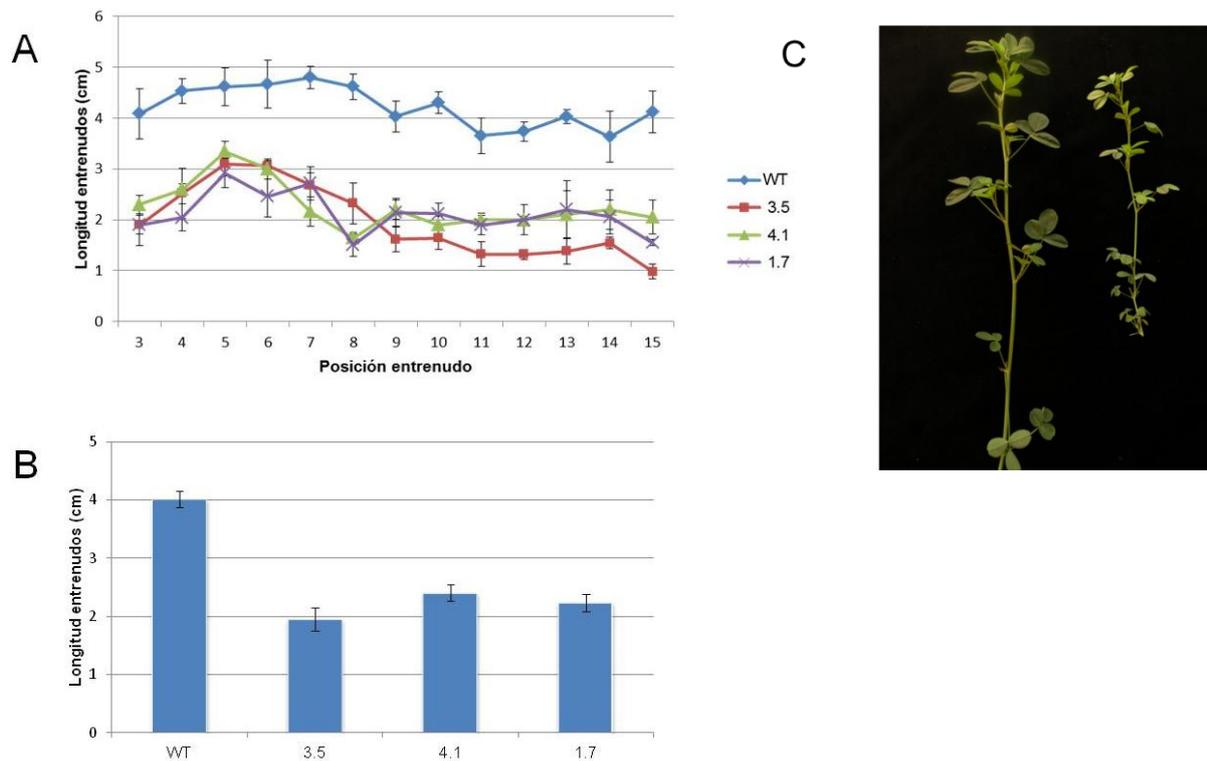
Los resultados mostraron que las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* presentaban menor altura que las plantas control crecidas bajo las mismas condiciones. Mientras que en estas últimas la longitud media oscilaba entre 65-70 cm, las líneas transgénicas presentaban una longitud media de 25-30 cm. Además, se observó que la línea transgénica 35S::*MsTFL1a* 3.5 presentaba una menor longitud del tallo en comparación con las otras líneas transgénicas (Figura 65).

### 2.3.2.3. Longitud de los entrenudos

La longitud de los entrenudos de las plantas transgénicas se estimó tras la medición de todos los entrenudos de 10 tallos florecidos de cada clon perteneciente a cada línea transgénica y para las plantas silvestres (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1).

Los resultados muestran que en las plantas control, la longitud de los entrenudos permanecía entre 4-5 cm y se reducía 0,2-0,5 cm a partir del 10º nudo. Por otro lado, la longitud de los entrenudos en las plantas 35S::*MsTFL1a* se mantenía entre 2,5-3 cm entre los entrenudos 3-8 y a partir de este punto fue decreciendo hasta mantenerse constante alcanzando 2 cm para las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* 1.7 y 35S::*MsTFL1a* 4.1. En el caso de la línea 35S::*MsTFL1a* 3.5, se mantenía entre 1,3-1,5 cm.

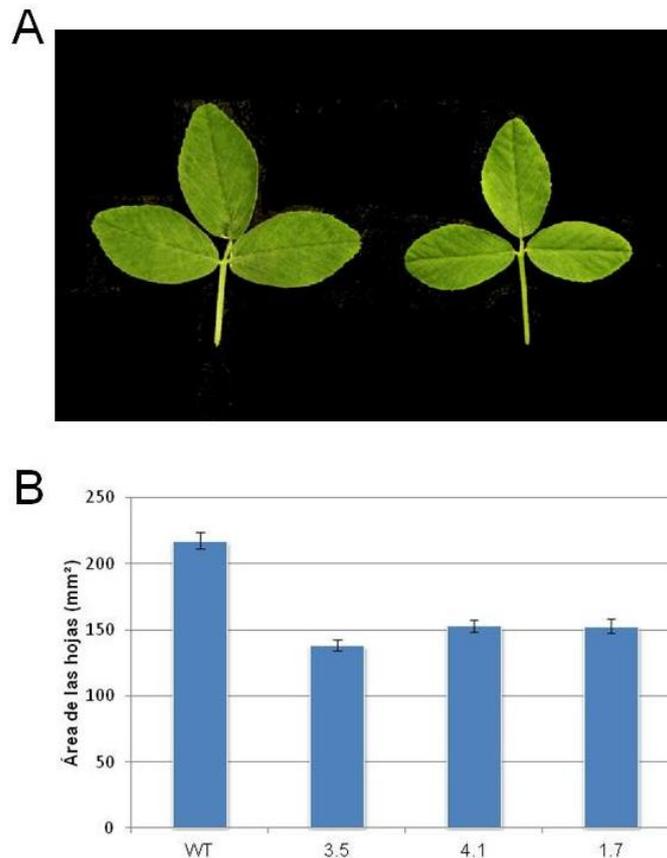
Los resultados mostraron que las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* presentaban menor longitud de los entrenudos que las plantas control. Mientras que en estas últimas la longitud media era de 4 cm, las líneas transgénicas presentaban una longitud media de 2-2,5 cm. Además, se observó que la línea transgénica 35S::*MsTFL1a* 3.5 presentaba una menor longitud de los entrenudos en comparación con las otras líneas transgénicas (Figura 66).



**Figura 66. Longitud de los entrenudos de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y las plantas control. (A).** Longitud de los entrenudos en cada una de sus posiciones a lo largo del tallo. Las barras de error indican el error estándar. **(B).** Longitud media de los entrenudos. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar. **(C).** Entrenudos de la planta 35S::*MsTFL1a* (derecha) y de la planta control (izquierda).

#### 2.3.2.4. Tamaño de las hojas

Se observó visualmente que las plantas 35S::*MsTFL1a* producían hojas de menor tamaño que las plantas control (Figura 67) y para corroborarlo experimentalmente se midió el área foliar de los tres folíolos que componen la hoja (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1).



**Figura 67. Comparación del área foliar de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y el área foliar de las plantas control (WT).** (A). Hoja de una planta transgénica 35S::*MsTFL1a* (derecha) comparada con una hoja de una planta control (izquierda). (B). Área foliar de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y de las plantas control. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar.

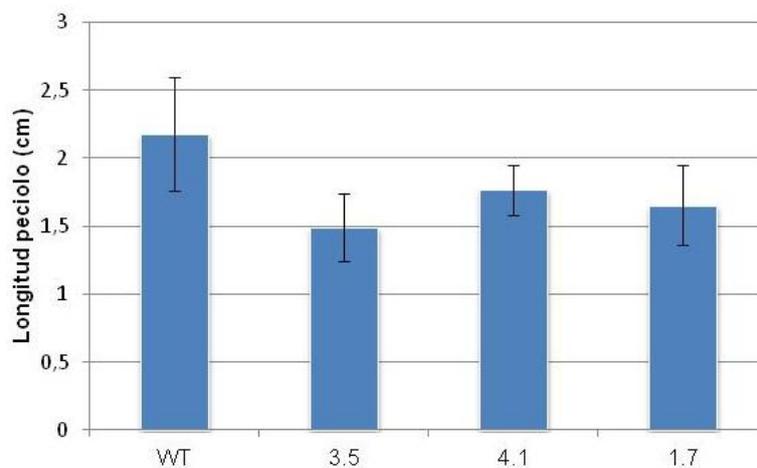
La cuantificación del área de las hojas mostró que el tejido foliar de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* era de menor tamaño que las plantas control crecidas bajo las mismas condiciones. La medida promedio del área de las hojas de las plantas control era de 220 mm<sup>2</sup>, mientras que las plantas transgénicas presentaban un área media de 140-153 mm<sup>2</sup>. La línea transgénica que presentaba un área foliar menor en comparación con las otras líneas transgénicas fue la línea 35S::*MsTFL1a* 3.5 (Figura 67 B).

### 2.3.2.5. Longitud del peciolo

Otro de los cambios morfológicos que observamos en las plantas transgénicas en comparación con las plantas control era una modificación en la longitud del peciolo de

las hojas. Para corroborarlo experimentalmente se midieron los peciolo de las hojas de 10 tallos florecidos de cada clon perteneciente a cada línea transgénica y para las plantas silvestres (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1).

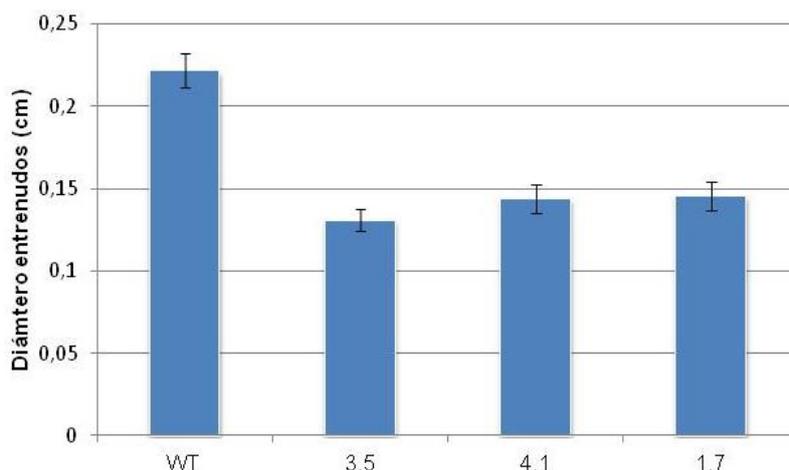
Los resultados mostraron que las líneas transgénicas *35S::MsTFL1a* presentaban una menor longitud del peciolo de las hojas en comparación con las plantas control. Mientras que en los controles la longitud media era de 2,2 cm, las plantas transgénicas presentaron una longitud media de 1,5-1,8 cm. Al igual que en los anteriores resultados, la línea transgénica *35S::MsTFL1a* 3.5 presentaba una menor longitud del peciolo de las hojas en comparación con las otras líneas transgénicas (Figura 68).



**Figura 68. Media de la longitud del peciolo de las hojas de las plantas transgénicas *35S::MsTFL1a* en comparación con las plantas control (WT).** Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar. El promedio de la longitud del peciolo de las plantas transgénicas *35S::MsTFL1a* era menor que las plantas control.

### 2.3.2.6. Diámetro de los entrenudos

Se observó visualmente que en las plantas *35S::MsTFL1a* la anchura del tallo también se veía afectada. Para corroborar esta observación se midió el diámetro de cada una de las líneas transgénicas y de las plantas control (Materiales y Métodos apartado 5.1.5.1).



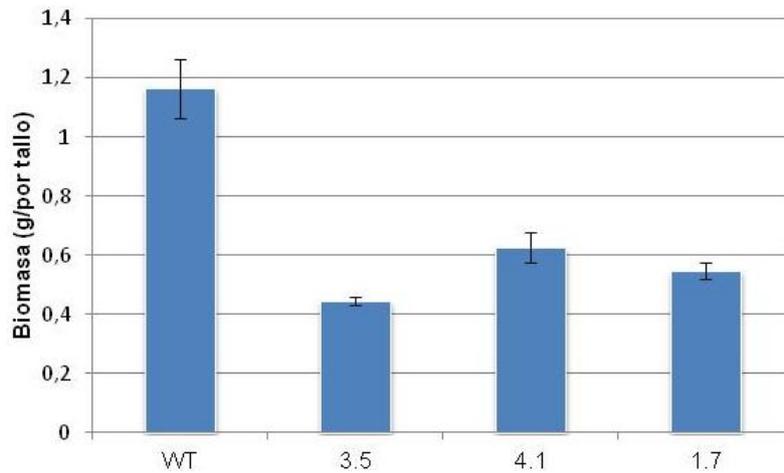
**Figura 69. Diámetro de los entrenudos de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* en comparación con las plantas control (WT).** Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar.

Los resultados obtenidos mostraron que las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a*, presentaban un menor diámetro de los tallos en comparación con las plantas control. Mientras que en éstas últimas la media del diámetro era de 0,23 cm, las plantas transgénicas presentaron una media de 0,13-0,15 cm, siendo la línea 35S::*MsTFL1a* 3.5 la que presentaba un menor diámetro de sus tallos en comparación con las otras líneas transgénicas (Figura 69).

### 2.3.2.7. Biomasa

Se realizó por último, una comparación entre la medida de la biomasa de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y las plantas control (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1).

Los resultados mostraron que la biomasa de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* era menor que la de las plantas control. Mientras que en estas últimas la media era de 1,2 gDM/por tallo, en las líneas transgénicas era de 0,4-0,6 gDM/por tallo (Figura 70).



**Figura 70. Biomasa de las plantas transgénicas 35S::*MtTFL1a* en comparación con las plantas control (WT).** Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 tallos con la primera inflorescencia (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.1). Las barras indican el error estándar.

Estos resultados demuestran que, en consonancia con la menor longitud de los entrenudos, la disminución en la longitud del tallo y en el tamaño de las hojas mostrados por las plantas transgénicas, se produce en dichas plantas una reducción en su biomasa en comparación con las plantas control. Además, los resultados mostraron que la línea transgénica 35S::*MtTFL1a* 3.5 presentaba una menor biomasa, siendo consecuente con una mayor reducción del tamaño de todos sus órganos, todo ello relacionado con una mayor expresión de *MtTFL1a* en cada uno de ellos en comparación con el resto de líneas transgénicas (Figura 70).

### 2.3.2.8. Crecimiento celular

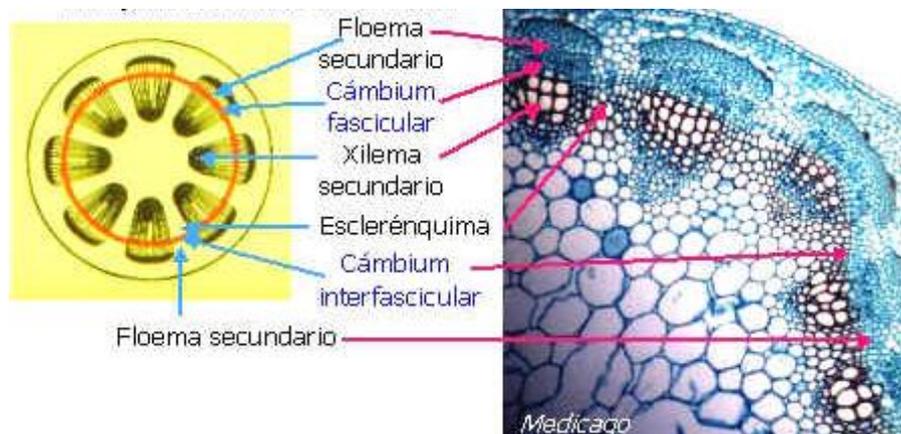
Hasta el momento, hemos demostrado que la sobreexpresión del gen *MtTFL1a* en *M. sativa* afecta de manera generalizada al tamaño de la planta. En las plantas transgénicas 35S::*MtTFL1a*, a pesar de que se produce un retraso en el tiempo de floración, no se producen los cambios deseados en la arquitectura de la planta, ya que no se produce una mayor ramificación ni un incremento del desarrollo vegetativo. Por este motivo, decidimos estudiar con más profundidad este fenotipo, ya que podría tener un gran interés desde el punto de vista básico, pudiéndonos aportar algunas pistas sobre la función biológica de este gen en el desarrollo de la planta.

Una planta crece por división celular y posterior elongación de las células hijas hasta alcanzar el tamaño original de la madre. Para determinar si las plantas transgénicas 35S::*MtTFL1a* estaban afectadas en la proliferación o en la elongación celular, visualizamos la composición celular (número y tamaño) de los tejidos del tallo mediante microscopía óptica. Para ello, se incluyeron en parafina secciones transversales y longitudinales de tallo que fueron teñidas con azul de toluidina para el análisis del número y tamaño de las células presentes en los tejidos (Materiales y Métodos, apartado 5.1.5.2).

### 2.3.2.8.1. Secciones transversales de tallos

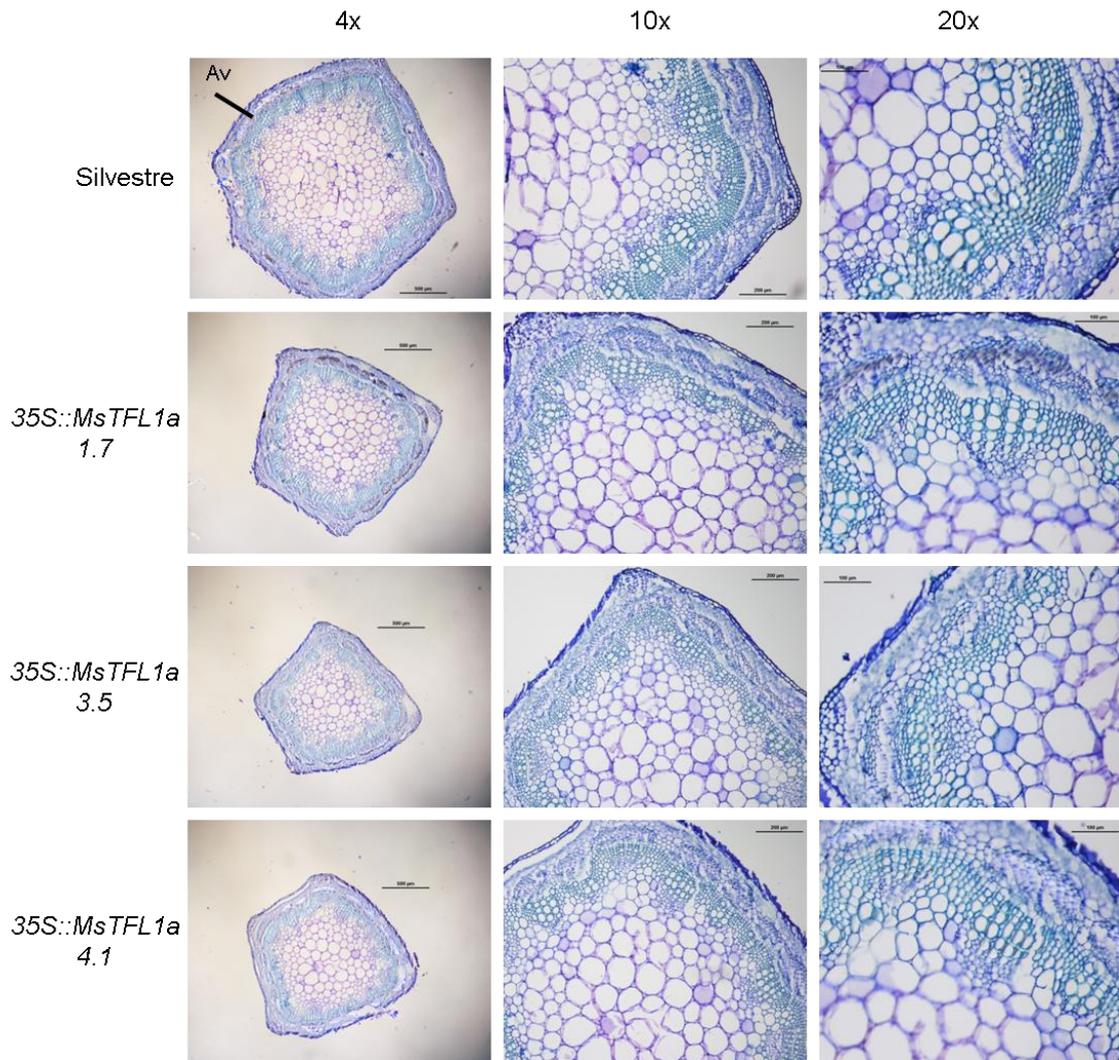
Los tallos de las plantas 35S::*MtTFL1a* presentaban un menor diámetro en comparación con el de las plantas control. El crecimiento radial de las plantas se consigue mediante la generación de nuevo tejido vascular que se produce a través de las divisiones celulares ordenadas en el meristemo vascular (Chaffey *et al.* 2002).

La organización estructural del tallo de alfalfa vista en sección transversal consta de un anillo de haces vasculares discretos separados por regiones interfasciculares que rodean las células de la médula (Figura 71).



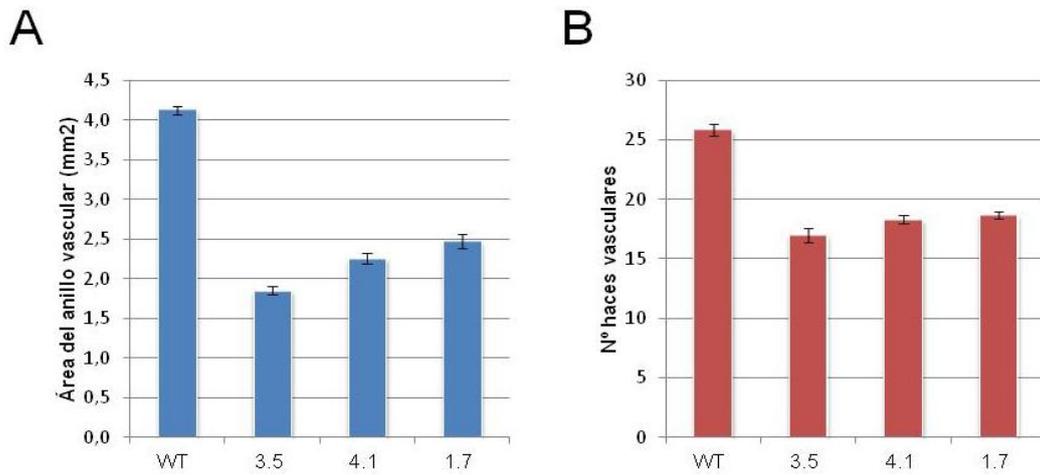
**Figura 71. Organización estructural del tallo de alfalfa en sección transversal.**

Para determinar si la disminución del diámetro del tallo de las plantas transgénicas 35S::*MtTFL1a* era debido a defectos en la proliferación o en la elongación celular, se realizaron diferentes mediciones sobre secciones transversales de tallo observadas mediante microscopía óptica (Figura 72).

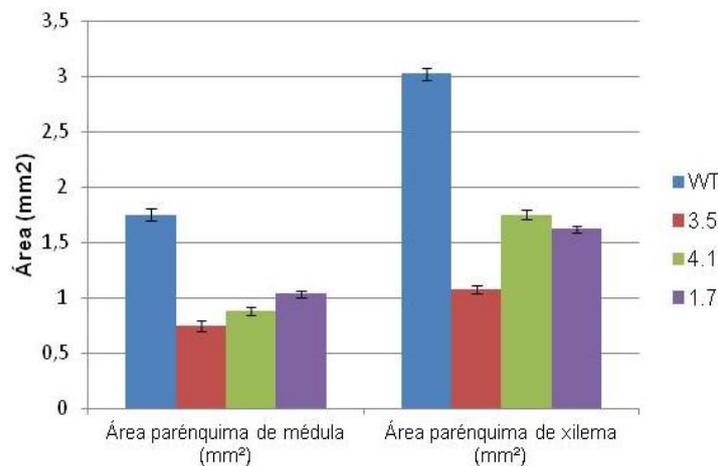


**Figura 72. Secciones transversales del tallo en plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y plantas control teñidos con toluidina.**

Se realizó una medición del área que ocupa el anillo vascular (Figura 73) así como del área que ocupan las células del parénquima de la médula y las del parénquima del xilema en las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y en las plantas control (Figura 74). Nuestros resultados indican que el área del anillo vascular de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* era menor que el de las plantas control (Figura 73 A), siendo consecuentes con un menor número de haces vasculares (17-19) presentes en las plantas transgénicas en comparación con las plantas control (25-27), (Figura 73 B). El área del parénquima de la médula y del xilema, también resultó menor en las plantas transgénicas en comparación con las plantas control (Figura 74).



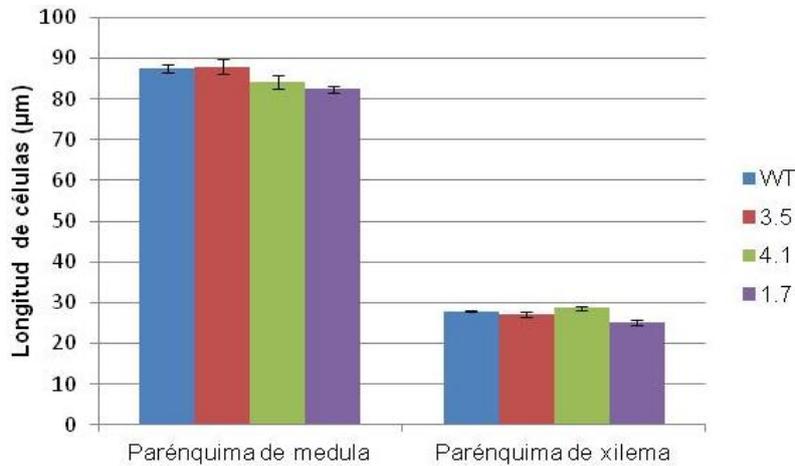
**Figura 73. Área del anillo vascular y número de haces vasculares de las líneas transgénicas 35S::MsTFL1a en comparación con los de las plantas control (WT).** (A). Promedio del área del anillo vascular en plantas transgénicas 35S::MsTFL1a comparado con el de las plantas control. (B). Número promedio de haces vasculares en plantas transgénicas 35S::MsTFL1a comparado con el de las plantas control. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de cortes transversales de 6 tallos en el penúltimo entrenudo. Las barras indican el error estándar.



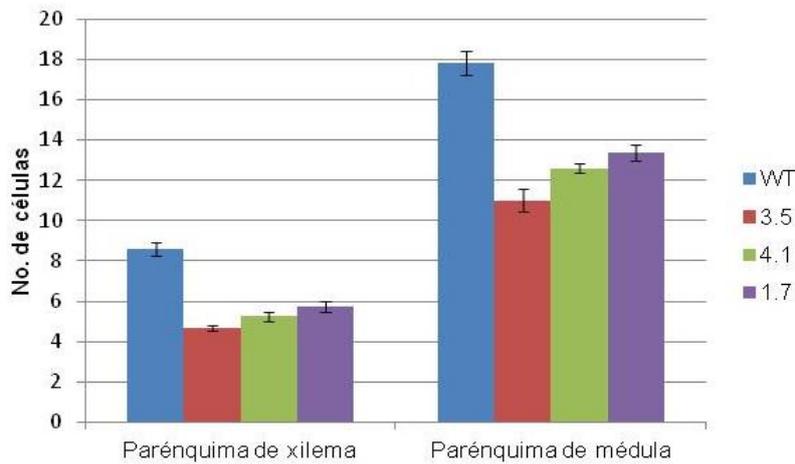
**Figura 74. Áreas del parénquima de la médula y del xilema de las líneas transgénicas 35S::MsTFL1a en comparación con los de las plantas control.** Promedio del área del parénquima de la médula y del xilema en plantas transgénicas 35S::MsTFL1a comparado con el de las plantas control. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de cortes transversales de 6 tallos en el penúltimo entrenudo. Las barras indican el error estándar.

Para determinar si la disminución del área era debida a una disminución en el número de células o en la longitud de las mismas se midió la longitud de las células del parénquima de la médula y del xilema (Figura 75) y se cuantificó el número de

células en cada una de ellas. Los resultados mostraron que la longitud de las células era similar a la de las plantas control, sin embargo el número promedio de células en las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* era menor que en las plantas control tanto en el parénquima de la médula como en la del xilema (Figura 76).



**Figura 75. Longitud de las células del parénquima de la médula y del xilema de las líneas transgénicas 35S::*MsTFL1a* y las plantas control.** Promedio de la longitud de las células del parénquima de la médula y del xilema en plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* comparado con el de las plantas control. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de cortes transversales de 6 tallos en el penúltimo entrenudo. Las barras indican el error estándar.



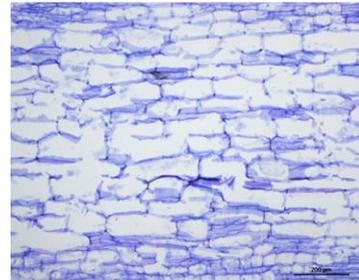
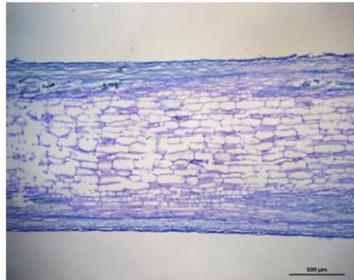
**Figura 76. Efecto de la sobreexpresión de *MsTFL1a* en alfalfa sobre el número de células en el parénquima xilemático y en el de la médula.** Los datos representan la media del número de células del parénquima de la médula y del xilema en plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* comparado con el de las plantas control (WT). Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de cortes transversales de 6 tallos en el penúltimo entrenudo. Las barras indican el error estándar.

### 2.3.2.8.2. Secciones longitudinales de tallos

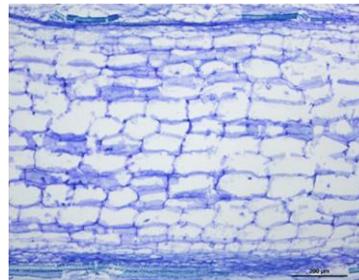
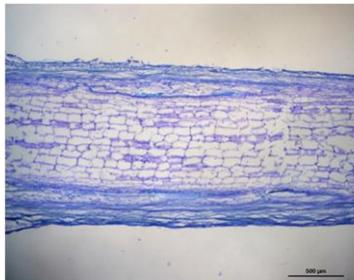
La reducción en la longitud del tallo de las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* se debió principalmente a la inhibición del crecimiento de los entrenudos (Figura 78 A y B). Para determinar si esta disminución era debido a defectos en la proliferación o en la elongación celular, se realizaron diferentes mediciones sobre secciones longitudinales del último y penúltimo entrenudo del tallo observadas mediante microscopía óptica (Figura 78). Dichas secciones mostraron que la elongación celular no estaba inhibida en los entrenudos de las plantas 35S::*MsTFL1a* (Figura 78 C). Por lo tanto, la construcción 35S::*MsTFL1a* inhibe el crecimiento del tallo limitando la proliferación celular.

**A**

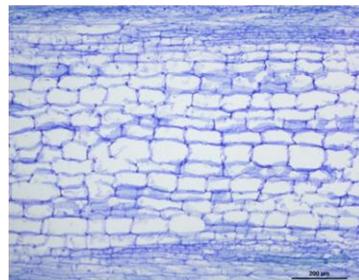
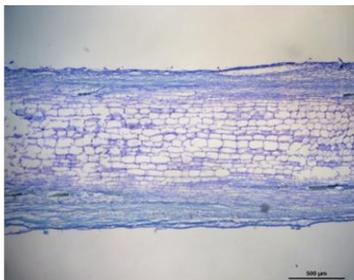
Silvestre  
penúltimo entrenudo



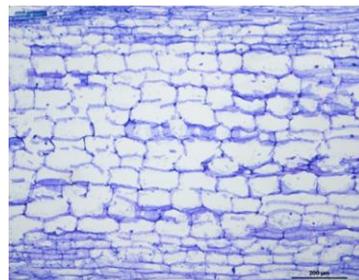
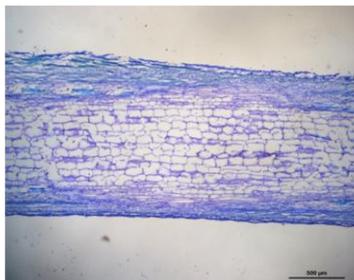
35S::*MsTFL1a* 1.7  
penúltimo entrenudo

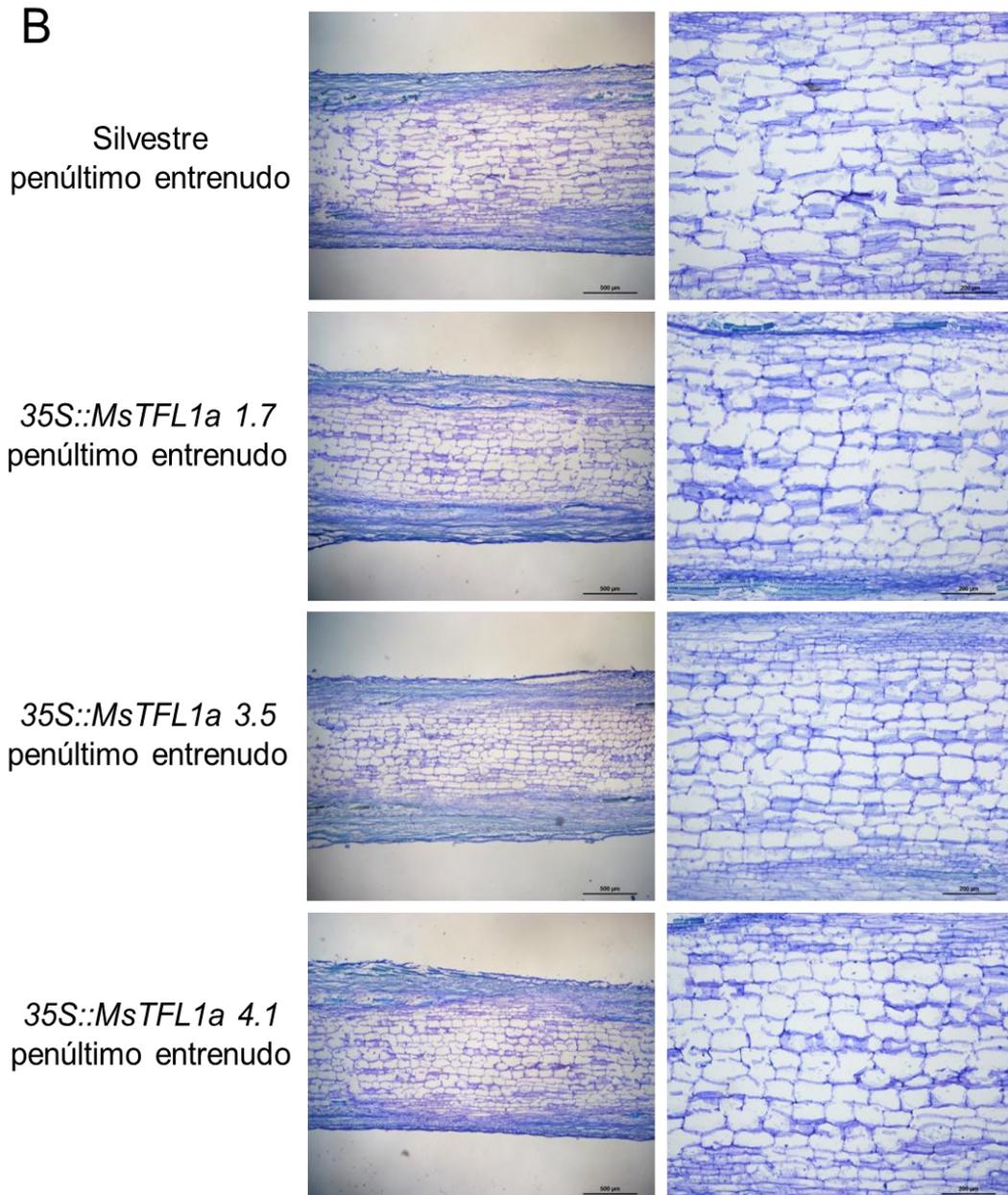


35S::*MsTFL1a* 3.5  
penúltimo entrenudo

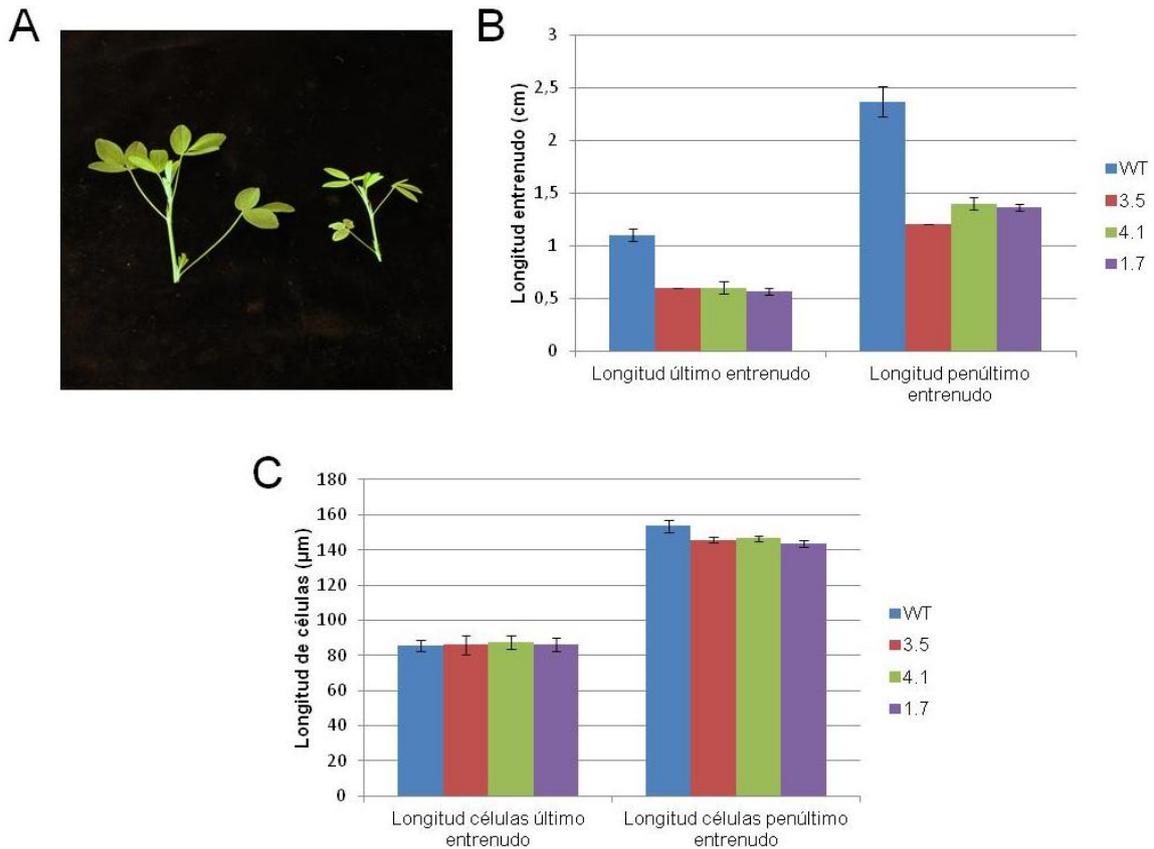


35S::*MsTFL1a* 4.1  
penúltimo entrenudo





**Figura 77. Secciones longitudinales del tallo en plantas transgénicas *35S::MsTFL1a* y plantas control teñidos con toluidina. (A).** Secciones longitudinales del último entrenudo en las líneas transgénicas y la planta control. **(B).** Secciones longitudinales del penúltimo entrenudo en las líneas transgénicas y la planta control.



**Figura 78. Efecto de la sobreexpresión de *MsTFL1a* en alfalfa sobre la longitud de los entrenudos del tallo. (A).** Longitud del último y penúltimo entrenudo de una planta transgénica 35S::*MsTFL1a* (derecha) y una planta control (izquierda). **(B).** Promedio de la longitud del último y penúltimo entrenudo en plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* comparado con el de las plantas control. **(C).** Promedio de la longitud de las células del último y penúltimo entrenudo en plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* comparado con el de las plantas control. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de cortes longitudinales de 6 tallos en el último y penúltimo entrenudo. Las barras indican el error estándar.

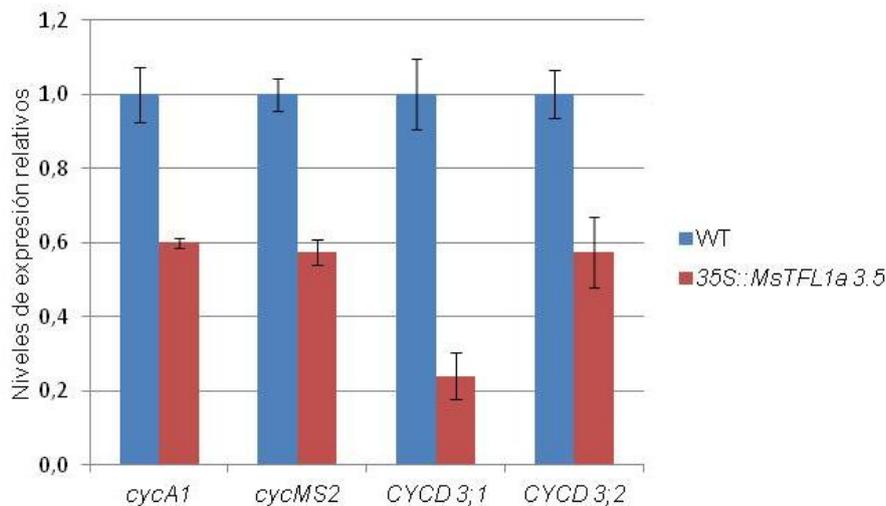
### 2.3.2.8.3. Análisis de expresión de genes efectores del ciclo celular en alfalfa

La expresión constitutiva de *MsTFL1a* en *M. sativa* inhibe el crecimiento mediante la limitación en la proliferación celular de todos los tejidos y órganos de la planta.

El crecimiento y desarrollo de la planta se basan en la coordinación entre la división y la expansión celular que se producen en las células madre de los meristemas. Las divisiones celulares están reguladas por quinasas dependientes de

ciclina (CDK) que requieren la unión de un regulador positivo (ciclina), (Gonzalez *et al.* 2012).

Para evaluar la proliferación celular en las plantas transgénicas respecto a las plantas control, se determinaron los niveles de expresión de cuatro genes efectores de la división celular en el meristemo apical del tallo de la línea transgénica *35S::MsTFL1a 3.5* y se compararon con sus correspondientes niveles en el mismo tejido en plantas control de *M. sativa*. La ciclina de tipo B *cycMs2* de alfalfa se detectó usando oligonucleótidos específicos de su secuencia nucleotídica (Hirt *et al.* 1992), (Tabla 5). La ciclina de tipo A, *cycA1* de alfalfa, se detectó usando oligonucleótidos específicos de su homóloga en *M. truncatula* (Número de acceso en el GenBank: AET04951.1), (Tabla 5). Las ciclinas de tipo D, homólogas a las ciclinas *CYCD3;1* y *CYCD3;2* de *Arabidopsis* (Dewitte *et al.* 2007), se detectaron usando oligonucleótidos específicos de sus secuencias homólogas en *M. truncatula* (Número de acceso en el GenBank: XM\_013614633.1 y XM\_013602001; respectivamente), (Tabla 5). El análisis se realizó mediante qRT-PCR.



**Figura 79. Niveles de expresión de genes efectores del ciclo celular en el meristemo apical de plantas *35S::MsTFL1a*.** Se compararon los niveles de expresión mediante qRT-PCR de los genes *cycMS2*, *cycA1*, *CDC3;1* y *CDC3;2* en meristemos apicales de la línea transgénica *35S::MsTFL1a 3.5* y plantas silvestres de alfalfa. Los niveles de expresión de las ciclinas en la línea *35S::MsTFL1a 3.5* se muestran relativos a los que presentan estos genes en las plantas control que ha sido igualado a 1. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

Los resultados muestran que los niveles de expresión de los genes *cycMS2*, *cycA1*, *CDC3;1* y *CDC3;2* disminuyen en el meristemo apical de plantas *35S::MsTFL1a* 3.5 comparados con los niveles mostrados en el mismo tejido en plantas control (Figura 79). Estas diferencias fueron más acentuadas para la ciclina *CDC3;1* (Figura 79). Estos resultados sugieren que la expresión constitutiva de *MsTFL1a* en alfalfa podría estar actuando como regulador negativo de la transcripción de genes efectores del ciclo celular como es el caso de las ciclinas.



---

# **CAPÍTULO II**

---

## **DISCUSIÓN**

---



La disminución del valor nutritivo en especies forrajeras se ve mermada con los procesos de crecimiento y por los recursos utilizados por la planta en el proceso de floración (Figura 5). Por tanto, un retraso en la transición floral, que a su vez estuviese asociado a un mayor crecimiento vegetativo, podría ser beneficioso al producirse un mayor contenido en proteína vegetal por planta para el consumo animal.

Las funciones de los ortólogos de *TFL1* en las leguminosas están poco estudiadas. Sólo se han descrito las funciones de los ortólogos de *TFL1* en *Pisum sativum* (Foucher *et al.* 2003). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la expresión constitutiva de estos genes en su propia especie o en sistemas heterólogos. Por ello, decidimos aislar los ortólogos de este gen en *Medicago sativa*. Si bien no se pretendía realizar un estudio funcional de estos genes, si que estábamos interesados en elucidar de manera aproximada su papel biológico en la planta mediante su expresión constitutiva en un sistema heterólogo (*A. thaliana*) y en *M. sativa*, así como evaluar su posible uso como herramienta biotecnológica para retrasar el tiempo de floración en la alfalfa.

### **1. La expresión constitutiva de uno de los dos ortólogos de *TFL1* de alfalfa modifica el tiempo de floración y la arquitectura de la planta en *Arabidopsis thaliana***

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* con sobreexpresión de *MsTFL1a* presentaron un retraso en el tiempo de floración y cambios en la arquitectura de la inflorescencia similares a los mostrados tras la expresión constitutiva de *TFL1* de *A. thaliana* (Ratcliffe *et al.* 1998). En concreto, se produce un alargamiento de todas las fases del desarrollo de la planta, como ocurre tras la expresión constitutiva de otros ortólogos de *TFL1* en esta especie modelo (Wang *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2005; Carmona *et al.* 2006; Guo *et al.* 2006; Foucher *et al.* 2003). Sin embargo, no se observaron diferencias ni en el tiempo de floración ni en la arquitectura de la inflorescencia con respecto a las plantas control para las líneas transgénicas que sobreexpresaron el gen *MsTFL1c*.

Estos resultados sugieren que la función biológica de *MsTFL1a*, pero no la de *MsTFL1c* está conservada con la del gen *TFL1* de *A. thaliana*. Estas diferencias podrían estar determinadas por una diferente capacidad de interacción de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* con la proteína FD en el meristemo inflorescente de *A. thaliana*. A pesar de

que la duplicación que dio lugar a los ortólogos de *TFL1* en *M. sativa* (Figura 50), es relativamente reciente y que las proteínas codificadas por estos genes presentan una alta homología. Estos resultados parecen indicar que ambos parálogos podrían haber divergido funcionalmente.

## **2. *MsTFL1a* podría tener funciones adicionales en alfalfa a las descritas para *TFL1* en *A. thaliana***

En Arabidopsis, la sobreexpresión de *MsTFL1a* produce un alargamiento de todas las fases del desarrollo de la planta, como ocurre tras la expresión constitutiva de otros ortólogos de *TFL1* en esta especie modelo (Wang *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2005; Carmona *et al.* 2006; Guo *et al.* 2006; Foucher *et al.* 2003). La sobreexpresión en *N. tabacum* del gen *CEN*, el ortólogo de *TFL1* en *A. majus*, también se tradujo en un incremento del desarrollo vegetativo en las plantas transgénicas, produciéndose un mayor número de hojas y un incremento de biomasa como consecuencia del retraso en el tiempo de floración (Amaya *et al.* 1999). Estos estudios sugieren que los mecanismos moleculares que controlan la arquitectura de la planta y la floración en dicotiledóneas podrían estar conservados entre distintas especies.

La expresión constitutiva de *MsTFL1a* en *M. sativa* produce también un retraso en el tiempo de floración que va asociado a un incremento en los niveles de expresión del transgén *MsTFL1a* en ápices florales (línea 3.5). Estos resultados sugieren que *MsTFL1a* podría estar implicado en el control del tiempo de floración en *M. sativa*. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en Arabidopsis o tabaco, se producen alteraciones fenotípicas que consisten en una reducción en la altura de la planta, un menor número de nudos, tallos más finos, una reducción en el tamaño de los entrenudos, de las hojas y de las flores. Todas estas alteraciones fenotípicas conllevaban a una menor biomasa en comparación a las plantas control. Esta reducción en el tamaño de todos los órganos de las plantas transgénicas era debido a una inhibición de la proliferación celular, como pudimos comprobar mediante un análisis microscópico del número de células en los tallos. Esta reducción de tamaño también era evidente en las hojas, las inflorescencias y los órganos florales. Según nuestros resultados, este efecto iría asociado a una reducción en los niveles de expresión de genes efectores de la división celular. Nuestros resultados sugieren que, en alfalfa, la función bien establecida de *TFL1* y sus ortólogos en el control del tiempo

de floración podría conciliarse con una posible función en la regulación del crecimiento de la planta.

### **3. Los genes *TFL1*-like podrían participar en vías de señalización que regulan la diferenciación celular en plantas**

La expresión constitutiva es una herramienta útil para el análisis funcional de genes, ya que causa fenotipos que proporcionan una alternativa poderosa para identificar componentes de vías de desarrollo inexploradas tras los análisis tradicionales de pérdida de función. La sobreexpresión puede causar la inhibición o activación de una proteína, un complejo, o una vía de señalización por diferentes mecanismos moleculares (Prelich 2012). Con la sobreexpresión de un gen se pueden reducir los niveles de expresión normales de otras proteínas al afectar su transcripción, traducción, o su tasa de degradación. Otra manera de inhibición a nivel funcional de otras proteínas consiste en la competencia con otras macromoléculas. La competencia podría interrumpir un complejo multiprotéico o inferir en el secuestro de proteínas individuales (Prelich 2012).

*TFL1*, así como otros miembros de la familia de los CETS, codifican proteínas con homología a las proteínas de unión a fosfatidiletanolamida de mamíferos (PEBPs) (Grandy *et al.* 1990; McGarry y Ayre 2012; Serre *et al.* 1998). Las PEBPs tienen dos características notables: un bolsillo de unión a ligando (Granovsky *et al.* 2008) y una estructura globular y compacta, lo que les proporciona una amplia superficie para interactuar con otras proteínas. La habilidad de las PEBPs de unir fosfolípidos *in vitro* ha sugerido que podrían ser componentes importantes en las rutas de señalización celular (Bradley *et al.* 1997). El conocimiento de las estructuras cristalinas de las PEBPs humanas, bovinas (Serre *et al.* 1998; Banfield y Brady 2000) y la de *Antirrhinum majus* (*CENTRORADIALIS*; Banfield y Brady 2000) ha sugerido que el bolsillo de unión a ligando es incapaz de acomodar fosfolípidos y por lo tanto es poco probable que funcione a través del contacto directo con sus bicapas lipídicas. Sin embargo, estos análisis mostraron que contienen un bolsillo de unión a fosfato altamente conservado dentro de la estructura, siendo capaces de acomodar grupos fosforilo. Este dominio puede ser el dominio crucial para su actividad, sugiriendo que las proteínas PEBP pueden mediar la señalización a través de su asociación con proteínas fosforiladas (Al-Mulla *et al.* 2013). De hecho, se ha demostrado mediante doble híbrido que una proteína de esta familia en ratón, RKIP (Raf1 kinase inhibitory

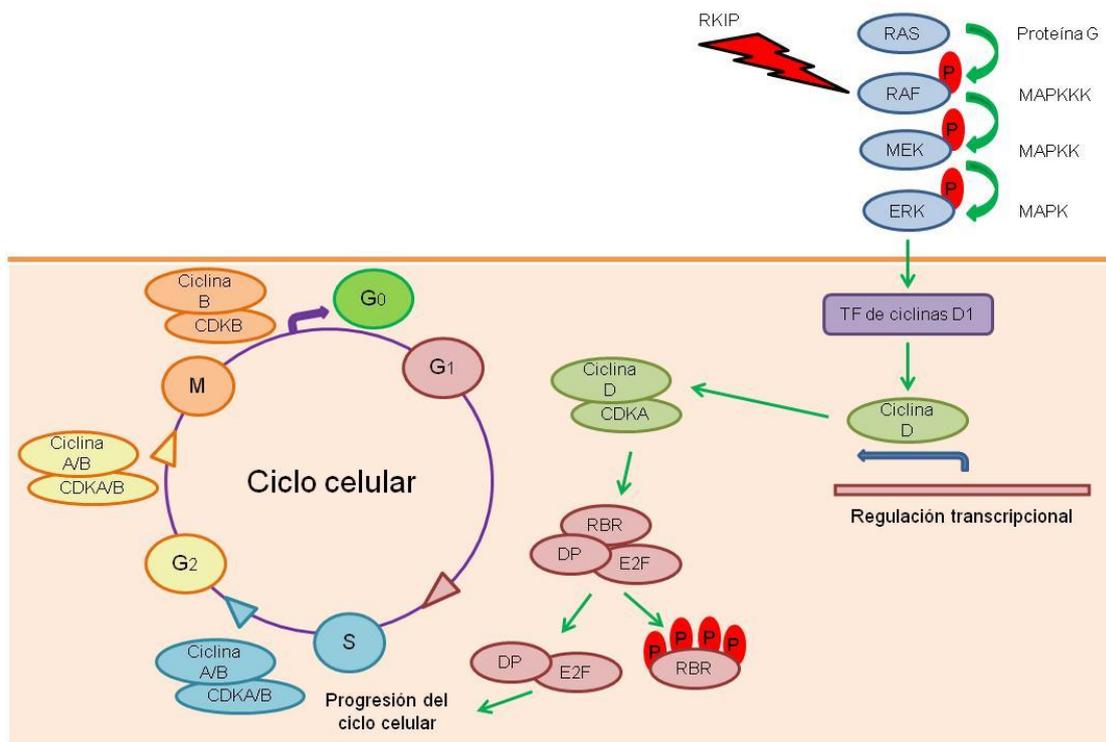
protein), interacciona con la quinasa Raf-1 inhibiendo su fosforilación y activación (Yeung *et al.* 1999; Yeung *et al.* 2000).

En animales, se sabe que la ruta de MAP quinasas implica una serie de cascadas de proteínas quinasas que actúan en la regulación, la diferenciación y la proliferación celular durante el crecimiento (Takahashi *et al.* 2004). Esta vía se organiza en módulos que contienen una proteína G y tres proteínas quinasas que actúan en serie, de modo que la proteína G regula a las MAPKK quinasas (MAPKKK), éstas fosforilan y activan a las MAPK quinasas (MAPKK) y éstas a su vez, fosforilan y activan a las MAPK (Figura 80). Tanto las MAPK como las MAPKKK son serina/treonina quinasas, mientras que las MAPKK son quinasas de doble especificidad pues fosforilan a la vez un residuo de treonina y otro de tirosina en las MAPK (Picatoste *et al.* 2003). Las MAPK estimulan la expresión por fosforilación de factores de transcripción inductores de la transcripción de ciclinas de tipo D (CYCD), (Figura 80). Las ciclinas D son fundamentales en el inicio del ciclo celular. El ciclo celular comienza cuando estos factores de transcripción activan la transcripción de genes de CYCD durante la fase G1 temprana y, al acumularse la proteína, se forman complejos CYCD/CDK. En la fase G1 tardía, el complejo activo CYCD/CDK fosforila a la proteína RBR, que reprime la actividad de la familia de factores transcripcionales E2F/DP. Una vez fosforilada RBR en múltiples sitios, pierde afinidad y se disocia del complejo E2F/DP permitiendo la transcripción de la ciclina de tipo A y B (CYCA/B) en la parte final de la fase G1, contribuyendo a la formación de los complejos CYCA/B con CDKA/B requeridos para la entrada y progreso en la fase S (Figura 80), (Dirk Inze 2007). De este modo, en la fase S así como en la fase G2 se establecen estos complejos, mientras que en la fase M sólo se han observado complejos CYCB/CDKB.

En plantas transgénicas de alfalfa que sobreexpresan la proteína MsTFL1a, los niveles de expresión de las ciclinas de tipo D, *CYCD 3;1* y *CYCD 3;2*, aparecen disminuidos aproximadamente en un 80 % y un 40 %, respectivamente, con respecto a los niveles presentados en el meristemo apical del tallo en plantas no transformadas. De manera similar están afectados los niveles de expresión de las ciclinas de tipo A y B, *cycA1* y *cycMs2*, respectivamente, que disminuyen aproximadamente un 40 % con respecto a los niveles de las plantas control. Estos resultados sugieren que MsTFL1a podría afectar negativamente en la regulación transcripcional de estos genes.

Se ha sugerido que en plantas las proteínas CETS podrían participar en un mecanismo análogo al de Raf-1 (MAPKKK) de mamíferos (Pnueli *et al.* 2001). Estas

proteínas podrían compartir una función biológica común como reguladores de la diferenciación celular mediada por su interacción con miembros de la cascada de quinasas (Banfield y Brady 2000). Esta sugerencia se basa en el hecho de que la proteína codificada por el ortólogo de *TFL1* en tomate, *SELF-PRUNING* (*SP*), es capaz de interactuar *in vitro* con proteínas homólogas a las MAPKKK de animales (*SPAK*) y con inhibidores de las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) del ciclo celular, como la proteína codificada por el gen *SIAMESE* (*SIM*), (Pnueli *et al.* 2001; Churchman *et al.* 2006).



**Figura 80. Esquema general de la organización de la vía de las MAP quinasas y de las fases del ciclo celular, y principales componentes que participan en cada una de ellas.**

La cascada de proteínas quinasas activa la expresión de factores de transcripción inductores de la transcripción de CYCD. La formación de los complejos CYCD/CDK fosforilan a la proteína RBR en la transición G1/S, liberando al factor transcripcional E2F/DP, lo que a su vez permite la transcripción de un conjunto de genes encargados de conducir la progresión del ciclo celular. En la fase S así como en la G2 se establecen diversos complejos de CYCA/B con CDKA/B, mientras que en la M sólo se han observado complejos CYCB/CDKB. Para que el ciclo funcione correctamente las ciclinas son degradadas y sintetizadas *de novo* al iniciar un nuevo ciclo.

Basándonos en esta analogía, nuestros resultados sugieren que MstFL1a podría actuar como un inhibidor de la actividad quinasa; impidiendo la fosforilación y así la expresión de factores transcripcionales activadores de la expresión de genes de ciclinas de tipo D, y de este modo reprimir la progresión del ciclo celular, relacionado en este caso con la disminución de la expresión de las ciclinas: CYCD, CYCA y CYCB.

#### **4. Los genes *TFL1*-like podrían afectar al crecimiento independientemente de la transición floral**

Se ha sugerido que los genes *CETS* podrían afectar al crecimiento independientemente de la formación de las flores (Lifschitz *et al.* 2006). Mientras que en *Arabidopsis* y tabaco, la transición a la floración está asociada con la elongación de los brotes de inflorescencia, en tomate, la aceleración de la floración por los genes *SFT* (*FT*-like) o *sp* (mutante *self-prunning*) se asocia con el acortamiento de los entrenudos. Además, se observó una atenuación general del crecimiento: hojas más pequeñas y delgadas, y a veces con un menor número de folíolos laterales (Lifschitz *et al.* 2006). De esto se deduce que todas las respuestas estimuladas por el balance entre *SFT* y *SP* involucran cambios en el crecimiento, lo que sugiere que la transición floral y la atenuación de crecimiento, en lugar de ser consecuencia una de otra, son dos facetas de la mismas respuestas celulares (Lifschitz *et al.* 2006). Cuando se sobreexpresa en arroz, uno de los ortólogos de *TFL1* en esta especie, el gen *Oscen2*, se producen plantas de menor tamaño que las plantas control y una reducción de la longitud de los entrenudos, asociada con una reducción en el número total de células a lo largo de la sección longitudinal (Zhang *et al.* 2005). Por otro lado, la expresión del gen *FT* de *Arabidopsis* en tomate dirigida por el promotor del gen *FILAMENTOUS FLOWER* de *Arabidopsis* (*FL*), produjo plantas con hojas y tallos reducidos, y frecuentemente floración temprana (Lifschitz *et al.* 2006). Cabe destacar que la expresión del gen *GUS* mediada por este promotor en tomate, se restringe a los primordios foliares, y la región abaxial de las hojas, y nunca se observó dentro del meristemo apical del tallo (*SAM*).

Nuestros resultados sumados a los descritos en la literatura, apoyan la idea de que para regular la arquitectura de la inflorescencia, las proteínas *CETS* (*PEPB*) fueron reclutadas para funcionar como un centro de sistemas de señalización que tiene flexibilidad y potencial para integrar una amplia variedad de señales de desarrollo. Esta flexibilidad y diversidad son facilitadas por el potencial de las proteínas *CETS* para unirse a diversas clases de proteínas reguladoras (Pnueli *et al.* 2001). La

diversidad de fenotipos regulada por los genes CETS es probablemente el resultado de la asociación de su expresión temporal y espacial con las proteínas interactuantes y muy probablemente con otros factores. Parece probable que estas proteínas pudiesen participar en diversas vías de señalización.

El análisis funcional de *FT* y *TFL1* en *Arabidopsis thaliana* ha revelado únicamente sus funciones conocidas en la regulación de la transición floral. Esta se produce mediante la interacción con FD, un factor de transcripción de tipo bZIP en la zona medular del meristemo apical del tallo (Figura 6). La formación del complejo FT-FD se produce a través de la proteína adaptadora 14-3-3 (Abe *et al.* 2005). La expresión constitutiva de ortólogos de *TFL1* o *FT* de diversas especies en *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2013; Carmona *et al.* 2006; Guo *et al.* 2006; Foucher *et al.* 2003) sugiere de manera general que los mecanismos moleculares que controlan la arquitectura de la planta y la floración en dicotiledóneas están conservados, al observarse los mismos efectos fenotípicos que la sobreexpresión de *FT* o *TFL1* en esta especie. Sin embargo, su potencial para provocar efectos sistémicos sobre el crecimiento independiente de la formación de flores no ha podido ser desvelado en *Arabidopsis thaliana*. Esta hipótesis se ha podido realizar únicamente tras el análisis funcional de genes CETS en otras especies distintas de *Arabidopsis* como tomate y arroz, y tras la identificación de proteínas interactuantes en sistemas distintos de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. La posible función de los genes CETS en vías de señalización parece estar relacionada con la especie, y podría ser detectada únicamente en aquellos sistemas donde formen parte de esta vía de señalización controlando la maquinaria del ciclo celular. En este aspecto, *Medicago sativa* podría ser un buen sistema modelo para estudiar la posible gama de diversificación bioquímica de estas proteínas.

## **5. Abordaje futuro para la comprensión de la posible gama de diversificación bioquímica de las proteínas codificadas por los genes CETS de *M. sativa***

Para intentar comprender la diversificación bioquímica de las proteínas CETS, se podrían abordar en un futuro diversos experimentos usando alfalfa como sistema experimental, empleando las herramientas desarrolladas en este trabajo para su transformación estable. Un abordaje experimental podría consistir en la sobreexpresión de *MstFL1a* como proteína recombinante fusionada a una “etiqueta”, como por ejemplo el “tag” de polihistidina. Las proteínas que interaccionan con

MsTFL1a se podrían purificar y detectar fácilmente debido a la cadena de residuos de histidina que se une a varios tipos de iones metálicos inmovilizados, incluyendo níquel, cobalto y cobre, bajo condiciones de tampón específicas, mediante inmunoprecipitación. Las proteínas interactuantes se eluirían y se fraccionarían por SDS-PAGE, seguido de un troceado del gel, la digestión de cada trozo por separado y el análisis de los péptidos de cada uno de ellos mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida y espectrometría de masas), lo que conduciría a la identificación de las proteínas mediante la correspondiente búsqueda en las bases de datos (Aebersold y Mann 2003).

Esta estrategia da la posibilidad de encontrar nuevas relaciones entre proteínas, antes desconocidas. El éxito de la metodología dependerá en gran medida de la especificidad de reconocimiento de la proteína de interés y sus proteínas asociadas. Para ello, es necesario complementar esta técnica con el método de doble híbrido de levadura para la detección de interacciones entre proteínas, una vez ya conozcamos los candidatos. Además, será necesario realizar un estudio de la expresión espacial y temporal de los genes candidatos y el gen de interés, para comprobar que sus expresiones sean solapantes.

La evidente complejidad de las interacciones de proteínas sugiere que la funcionalidad de éstas no debe considerarse de forma aislada, sino dentro de una red global de componentes que interactúan entre ellos. El estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado permite diferenciar entre la actividad de una proteína y su función biológica. La función biológica de una proteína está relacionada con el proceso específico en el que ésta está realmente participando. En consecuencia, dado que la misma proteína puede ensamblarse con diferentes proteínas para formar diferentes complejos funcionales, aunque presente una sola actividad puede tener varias funciones biológicas. Gracias a la proteómica de interacción y a las herramientas bioinformáticas de biología de sistemas se pueden construir mapas completos de todas las interacciones de proteínas en la célula y mostrar la función biológica de cada una de ellas.

**6. Validación de la expresión constitutiva de los ortólogos del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* en *Medicago sativa* para su posible uso como herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa.**

La estrategia diseñada en este trabajo ha resultado útil para retrasar el tiempo de floración en alfalfa. A pesar de ello, no se ha producido un incremento de la biomasa en las plantas transgénicas y, consecuentemente, no cabe esperar un mayor contenido en proteína vegetal del forraje. Esto conduce *a priori* a pensar que esta herramienta no resulta de interés para la mejora del valor nutritivo de la alfalfa. Por este motivo, hemos considerado realizar un estudio fenotípico de dichas plantas desde el punto de vista básico. Este interés se basa en la falta de información que existe hasta la fecha de los efectos de la sobreexpresión de ortólogos de *TFL1* en su propia especie, siendo un campo inexplorado en muchas especies, incluyendo las leguminosas. Es por ello que no se ha terminado de validar completamente estas plantas para su posible uso como herramienta biotecnológica en la mejora del forraje. Para la validación completa de las mismas se requerirá la evaluación futura de otros parámetros que determinen la calidad del forraje proporcionado por estas plantas. Se podrían evaluar aquellos componentes que reducen la calidad del forraje según avanza la madurez de la planta, como la fibra (celulosa y hemicelulosa) y la lignina, ya que un menor contenido en lignina o fibra proporcionaría una mejor digestibilidad del mismo, característica que podría resultar interesante a pesar de tener un menor contenido de proteína por planta. Habría que llegar a un compromiso entre cantidad y calidad del forraje. Debido a que hemos obtenido plantas de menor tamaño, con un menor número de nudos y tallos más finos, quizás, estos componentes que se encuentran mayoritariamente en el tallo, habrían experimentado una disminución, y por tanto las plantas transgénicas 35S::*MsTFL1a* serían de mayor calidad siendo más digeribles para el ganado.



---

## CAPÍTULO III

---

***Diseño de construcciones multigénicas en el sistema GoldenBraid 2.0 y validación funcional en sistemas modelo para activar de novo la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas. Validación de su uso como posible herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa***



**CAPÍTULO III: *Diseño de construcciones multigénicas en el sistema GoldenBraid 2.0 y validación funcional en sistemas modelo para activar de novo la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas. Validación de su uso como posible herramienta biotecnológica en la mejora del valor nutricional de la alfalfa.***

**1. Diseño de la construcción para la expresión constitutiva de *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en el sistema GoldenBraid 2.0**

Se llevó a cabo la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* mediante un método de construcción modular de DNA especialmente diseñado para Biología Sintética de Plantas e Ingeniería Metabólica conocido como GoldenBraid 2.0 (Sarrion-Perdigones *et al.* 2011, 2013, 2014). En esta construcción la expresión de las regiones codificantes de los genes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* se halla dirigida por una copia del promotor del gen 35S del virus del mosaico del virus de la coliflor (CaMV) con el fin de expresarlos constitutivamente en plantas. Los pasos seguidos para la realización de esta construcción se detallan a continuación.

**1.1. Domesticación de piezas y construcción de módulos**

**1.1.1. Domesticación de piezas**

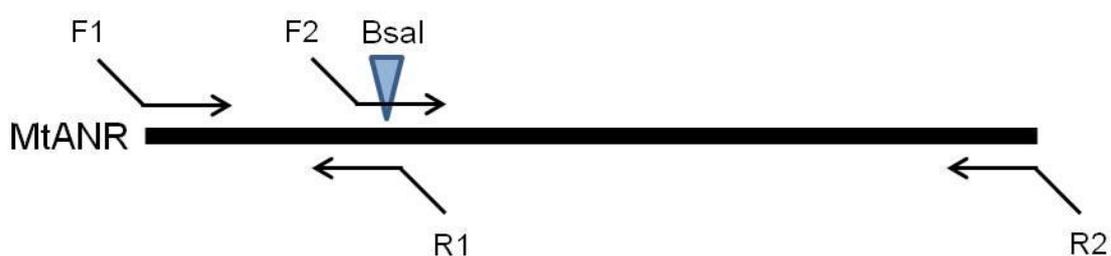
Para la domesticación de las distintas piezas se siguieron los pasos descritos en “Materiales y Métodos” (apartado 4.3.5.3). A continuación se describen las domesticaciones que se llevaron a cabo para cada uno de los genes que utilizamos en esta Tesis.

**A. Domesticación de *Delila* y *Rosea1***

Los factores de transcripción “*Delila*” y “*Rosea1*” domesticados fueron amablemente cedidos por el laboratorio del Dr. Diego Orzáez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Valencia), que a su vez los recibió de los Drs. Cathie Martin y Eugenio Butelli (John Innes Centre, UK), para poder realizar la construcción utilizada en este trabajo.

## B. Domesticación de *MtANR*

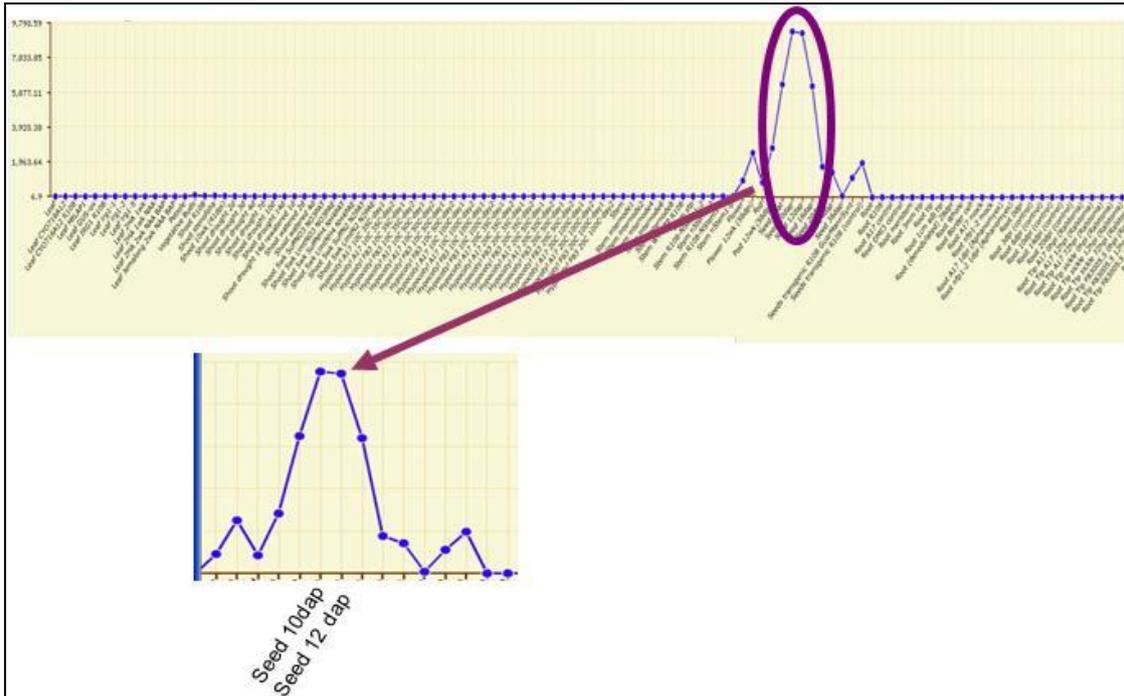
*MtANR* se aisló mediante RT-PCR a partir de RNA procedente de semillas de *M. truncatula* de 10 días después de la polinización (Figura 82). Para ello se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos específicos a partir de su secuencia nucleotídica (Número de Referencia NCBI: XM\_013601695.1) ya que en su secuencia interna presenta una diana de restricción para *Bsal*, por lo que para su domesticación se hizo necesaria la amplificación de dos retales (*MtANR-A* y *MtANR-B*) con los que poder eliminar dicho sitio (Figura 81).



**Figura 81. Estrategia de domesticación de la pieza *MtANR*.** Eliminación de una diana de reconocimiento para *Bsal* mediante la generación por PCR de dos retales (*MtANR-A* y *MtANR-B*) que permiten eliminar una diana de restricción para *Bsal* introduciendo una mutación silenciosa (GAG>GGG).

La información necesaria para la realización de las dos PCRs se encuentra en la tabla 19, extraída de la tabla 4 de “Materiales y Métodos”. Para la PCR del retal *MtANR-A* se emplearon los oligonucleótidos *MtANR-F1* y *MtANR-R1*; y para la PCR del retal *MtANR-B* se emplearon los oligonucleótidos *MtANR-F2* y *MtANR.R2* (Figura 81).

Tras la purificación de los fragmentos de PCR, se realizó una reacción de restricción-ligación, mezclando en un mismo tubo: 1,5µl de cada retal amplificado, 1µl del *Bsmbl* (10u), 1µl del pUPD, 1µl de T4 DNA (3u) Ligasa, 1µl de Tampón Ligasa y agua, para llegar a un volumen final de 10µl.



**Figura 82.** *MtANR* tiene una expresión máxima en semillas inmaduras 10 días después de la polinización (<http://mtgea.noble.org>; nº de accesoión: Mtr.44985.1.S1\_at).

La construcción resultante fue introducida en *E. coli* por choque térmico y los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con ampicilina, X-Gal e IPTG. Se estudió la integridad de la pieza mediante digestión de los plásmidos y visualización en gel de electroforesis; y más tarde por secuenciación y alineamiento con la secuencia presente en las bases de datos.

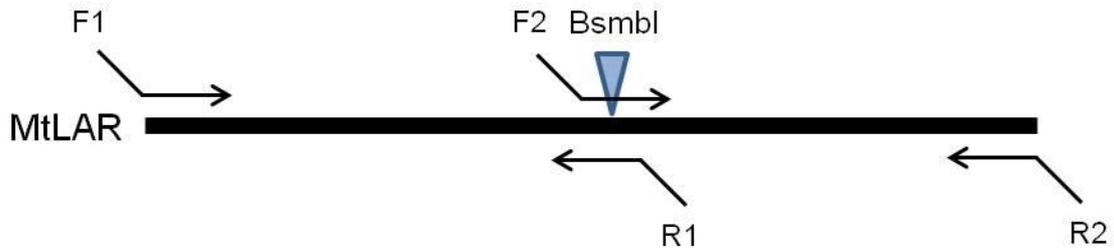
Pieza GB	Oligos	Secuencia	Tamaño (pb)	Tª de anillamiento	Molde
<i>MtANR</i>	MtANR-F1	GCGCCGTCTCACTC GAATGGCTAGTATCA AACAAATAGAAATAG	131	79,1	cDNA semilla 10 dap <i>M.</i> <i>truncatula</i>
	MtANR-R1	GCGCCGTCTCATCCC TAACAGTAGTATTAA CG		73,2	
	MtANR-F2	GCGCCGTCTCAGGG ACCTAGATAGTGCAA ACAAAAC	890	80,2	
	MtANR-R2	GCGCCGTCTCTCGCT CGAAGCTCACTTGAT CCCCTGAGTCTTC		88,1	

**Tabla 19. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los retales para la domesticación de *MtANR* e información necesaria para la realización de las reacciones de PCR.**

### C. Domesticación de *MtLAR*

El gen *LAR* se ha clonado a partir de la leguminosa *Desmodium uncinatum* (Tanner *et al.* 2003). Para realizar la construcción multigénica se aisló la secuencia codificante de su ortólogo en *Medicago truncatula*, el gen *MtLAR* (Número de Referencia NCBI: XM\_003591782). Esto se realizó mediante RT-PCR a partir de RNA procedente de semillas de *M. truncatula* de 10 días después de la polinización (Figura 84) usando 2 pares de oligonucleótidos específicos a partir de su secuencia nucleotídica (Tabla 20).

*MtLAR* presenta en su secuencia interna una diana de restricción para *Bsmbl*, por lo que para su domesticación se hizo necesaria la amplificación de dos retales (*MtLAR-A* y *MtLAR-B*) con los que poder eliminar dicho sitio para lo que se usaron dos pares de oligonucleótidos: Para la PCR del retal *MtLAR-A* se emplearon los oligonucleótidos *MtLAR-F1* y *MtLAR-R1*. (ii) Para la PCR del retal *MtLAR-B* se emplearon los oligonucleótidos *MtLAR-F2* y *MtLAR.R2* (Tabla 20; Figura 83).



**Figura 83. Estrategia de domesticación de la pieza *MtLAR*.** Eliminación de una diana de reconocimiento para *Bsmbl* mediante la generación por PCR de dos retales que permiten eliminar una diana de restricción para *Bsmbl*, introduciendo una mutación silenciosa (CTC>GTC).

Pieza GB	Oligos	Secuencia	Tamaño (pB)	Tª de anillamiento	Molde
<i>MtLAR</i>	MtLAR-F1	GCGCCGTCTCACTCGAA TGCACCATCATCATCA CCAACC	755	89,2	cDNA semilla 10 dap <i>M. truncatula</i>
	MtLAR-R1	GCGCCGTCTCACACGAT TGCTCTAGGAATTTTTC		79,7	
	MtLAR-F2	GCGCCGTCTCACGTGTC TGAAGACGATCTTCTAG	290	80,2	
	MtLAR-R2	GCGCCGTCTCGCTCGAA GCTCAACAGGAAGCTGT GATTGGC		89,8	

**Tabla 20. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los retales para domesticación de *MtLAR* e información necesaria para la realización de las reacciones de PCR.**



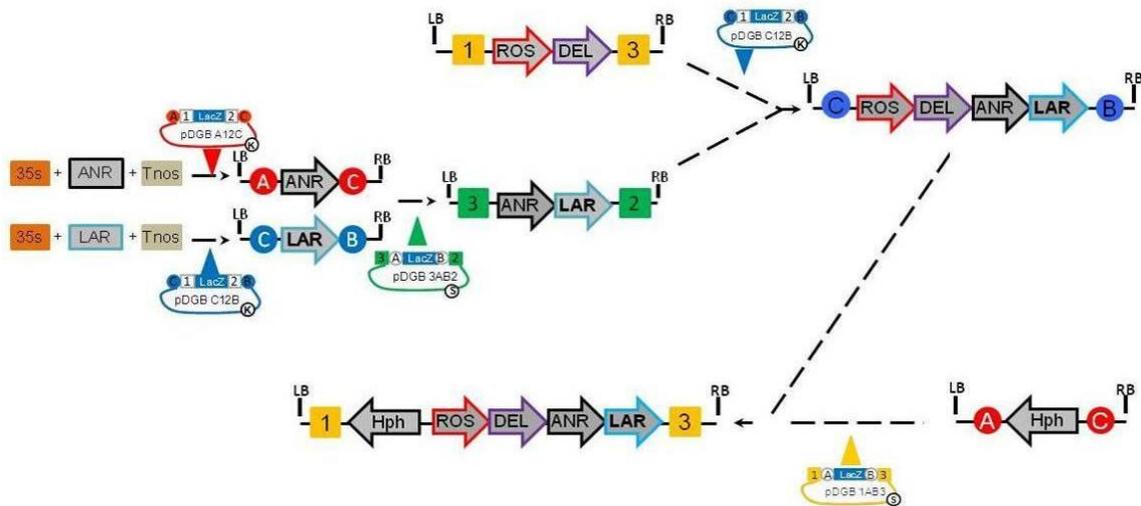
piezas de la colección GB utilizadas, el plásmido de destino donde se quiso introducir el módulo y, consecuentemente, la enzima de restricción que permitió hacerlo.

Módulo	Uso
pDGB $\alpha$ 1_35S: <i>MtANR</i> :Tnos	Transformación genética transitoria <i>N. benthamiana</i>
pDGB $\alpha$ 2_35S: <i>MtLAR</i> :Tnos	Transformación genética transitoria <i>N. benthamiana</i>
pDGB $\Omega$ 1_35S: <i>Delila</i> :T35S-35S: <i>Rosea1</i> :T35S	Transformación genética transitoria <i>N. benthamiana</i>  Transformación genética estable <i>M. sativa</i>
pDGB $\Omega$ 1_Hph_35S: <i>Delila</i> :T35S-35S: <i>Rosea1</i> :T35S-35S: <i>MtANR</i> :Tnos-35S: <i>MtLAR</i> :Tnos	Transformación genética transitoria <i>N. benthamiana</i>  Transformación genética estable: <i>M. sativa</i> , <i>N. tabacum</i> y <i>A. thaliana</i>

**Tabla 21. Listado de todos los módulos generados en este proyecto y uso de cada uno de ellos.**

El módulo “pDGB $\Omega$ 1\_35S:*Delila*:T35S-35S:*Rosea1*:T35S-35S:*MtANR*:Tnos-35S:*MtLAR*:Tnos” se encuentra formado por cuatro unidades transcripcionales que contienen los factores de transcripción *Delila* y *Rosea1* (Schwinn *et al.* 2006) y las dos enzimas *MtANR* y *MtLAR*, que participan en la biosíntesis de PAs. Ambos genes, *Delila* y *Rosea1*, se encuentran flanqueados por el promotor 35S y el terminador T35S. En cambio, *MtANR* y *MtLAR* se encuentran flanqueados por el promotor 35S y el terminador Tnos.

La figura 85 corresponde a una representación de los pasos seguidos para generar dicho módulo. Muestra con qué piezas se realizaron cada uno de los ensamblajes multipartitos, el orden en que se realizaron los emparejamientos durante el ensamblaje binario y las construcciones resultantes en cada paso.



**Figura 85. Estrategia de ensamblaje de la construcción “pDGBQ1\_35S:Delila:T35S\_35S:Rosea1:T35S\_35S:MtANR:Tnos\_35S:MtLAR:Tnos”.** Tras cada ensamblaje, en la construcción resultante se representan únicamente los fragmentos situados entre el Right Border (RB) y el Left Border (LB) del plásmido de destino. En los ensamblajes multipartitos: combinación de las piezas p35S, pMtANR y pTnos en el plásmido de destino pDGBα1 para dar lugar al módulo “pDGBα1\_35S:MtANR:Tnos” (representado como “ANR”) y combinación de las piezas p35S, pMtLAR y pTnos en el plásmido de destino pDGBα2 para dar lugar al módulo “pDGBα2\_35S:MtLAR:Tnos” (representado como “LAR”). En el primer ensamblaje binario: unión de los módulos “pDGBα1\_35S:MtANR:Tnos” y “pDGBα2\_35S:MtLAR:Tnos” en el plásmido de destino pDGBQ2. En el segundo ensamblaje binario: unión de los módulos “pDGBQ2\_35S:MtANR:Tnos-35S:MtLAR:Tnos” y “pDGBQ1\_35S:Delila:T35S-35S:Rosea1:T35S” en el plásmido de destino pDGBα2. En el tercer ensamblaje binario: unión de los módulos “pDGBα2\_35S:Delila:T35S-35S:Rosea1:T35S-35S:MtANR:Tnos-35S:MtLAR:Tnos” y “pDGBα1\_Hph” en el plásmido de destino pDGBQ1.

En primer lugar, se realizaron 2 ensamblajes multipartitos simultáneos en una “reacción GB *BsaI*”, siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.3.5.4 de “Materiales y Métodos”: (i) el primero de ellos con las piezas p35S, pMtANR y pTnos, dentro del plásmido de destino pDGBα1 y con la enzima de restricción *BsaI*; y (ii) el segundo con las piezas p35S, pMtLAR y pTnos, en el interior del plásmido de destino pDGBα2 y con la enzima de restricción *BsaI*.

Las reacciones de restricción-ligación se prepararon con los reactivos mostrados en la tabla 22.

<b>pDGB<math>\alpha</math>1_35S:MtANR:Tnos</b>	<b>pDGB<math>\alpha</math>2_35S:MtLAR:Tnos</b>
1 $\mu$ l pDGB $\alpha$ 1 (75ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l pDGB $\alpha$ 2 (75ng/ $\mu$ l)
1,5 $\mu$ l p35S (75ng/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l p35S (75ng/ $\mu$ l)
0,7 $\mu$ l pMtANR (75ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l pMtLAR (75ng/ $\mu$ l)
1,5 $\mu$ l pTnos (75ng/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l pTnos (75ng/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l BsaI (5u)	1 $\mu$ l BsaI (5u)
1 $\mu$ l T4 DNA ligasa (3u)	1 $\mu$ l T4 DNA ligasa (3u)
1 $\mu$ l Tampón ligasa	1 $\mu$ l Tampón ligasa
2,3 $\mu$ l agua	2 $\mu$ l agua

**Tabla 22. Reactivos empleados para la reacción de restricción-ligación en el ensamblaje multipartito de los módulos “pDGB $\alpha$ 1\_35S:MtANR:Tnos” y “pDGB $\alpha$ 2\_35S:MtLAR:Tnos”.**

Las construcciones resultantes, denominadas pDGB $\alpha$ 1\_35S:MtANR:Tnos” y “pDGB $\alpha$ 2\_35S:MtLAR:Tnos” respectivamente, fueron transformadas en *E. coli* mediante electroporación y siembra en placa con kanamicina, IPTG y X-Gal. Se realizaron cultivos líquidos de algunas colonias y se obtuvo su miniprep. Los plásmidos obtenidos, fueron verificados mediante digestión y electroforesis.

A continuación, los plásmidos obtenidos durante el ensamblaje multipartito, fueron sometidos a un primer ensamblaje binario con la finalidad de unirlos entre sí. Siguiendo la metodología descrita para los ensamblajes binarios (Materiales y Métodos, apartado 4.3.5.5), se realizó la correspondiente reacción de restricción-ligación juntando en un mismo tubo las construcciones pDGB $\alpha$ 1\_35S:MtANR:Tnos”, “pDGB $\alpha$ 2\_35S:MtLAR:Tnos” y el vector de destino pDGB $\Omega$ 2. La construcción resultante, denominada “pDGB $\Omega$ 2\_35S:MtANR:Tnos-35S:MtLAR:Tnos”, fue introducida en *E. coli* mediante electroporación y siembra en placa con espectinomicina, IPTG y X-Gal. Se verificó la integridad de la construcción mediante la digestión y electroforesis del plásmido.

Con el fin de pasar la construcción obtenida al nivel  $\alpha$  de GB, se realizó un segundo ensamblaje binario entre el módulo obtenido “pDGB $\Omega$ 2\_35S:MtANR:Tnos-35S:MtLAR:Tnos” y el módulo “pDGB $\Omega$ 1\_35S:Delila:T35S-35S:Rosea1:T35S”. La metodología es la misma, salvo que la enzima de restricción empleada fue BsaI y el plásmido de destino pDGB $\alpha$ 2. Puesto que se utilizó un plásmido de destino de nivel  $\alpha$ , los cultivos se realizaron con el antibiótico kanamicina. El resto del proceso fue exactamente idéntico al explicado anteriormente.

Una vez obtenida la construcción “pDGB $\alpha$ 2\_\_35S:*Delila*:T35S-35S:*Rosea1*:T35S-35S:*MtANR*:Tnos-35S:*MtLAR*:Tnos”, se realizó el tercero y último ensamblaje binario con el módulo “pDGB $\alpha$ 1\_*Hph*”, que confiere resistencia a higromicina. De nuevo, la metodología es la misma que anteriormente, salvo que la enzima de restricción fue *Bsmbl* y el plásmido destino pDGB $\Omega$ 1. Puesto que se utilizó un plásmido destino de nivel  $\Omega$ , los cultivos se realizaron con espectinomycin. Como resultado final, obtuvimos la construcción “pDGB $\Omega$ 1\_*Hph*\_35S:*Delila*:T35S-35S:*Rosea1*:T35S-35S:*MtANR*:Tnos- 35S:*MtLAR*:Tnos” (Figura 86), que llamaremos a partir de ahora *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. Finalmente, las cepas AGL1 y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformaron con esta construcción para la obtención de plantas transgénicas de alfalfa.

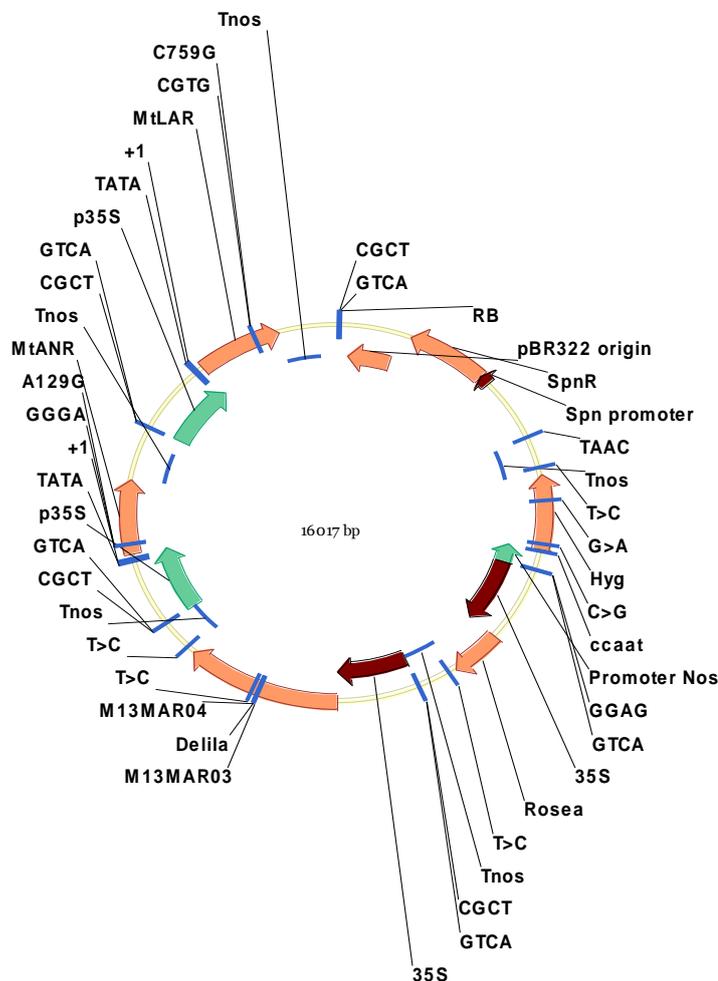
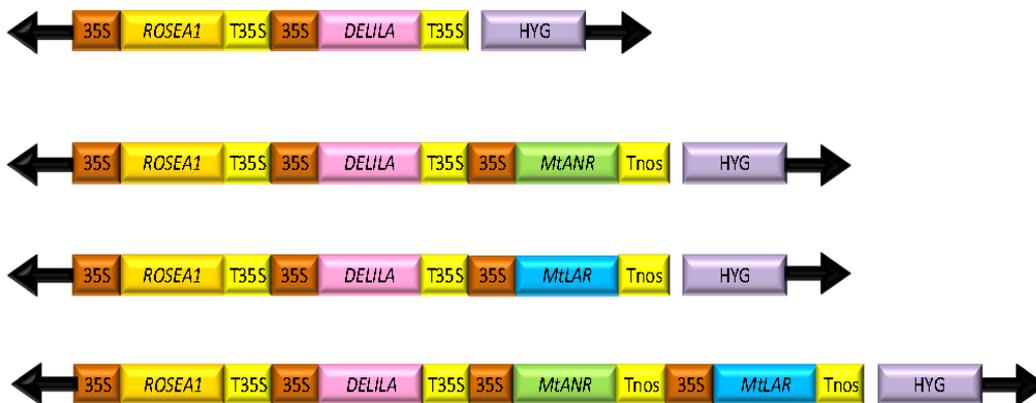


Figura 86. Construcción “pDGB $\Omega$ 1\_*Hph*\_35S:*Delila*:T35S-35S:*Rosea1*:T35S-35S:*MtANR*:Tnos-35S:*MtLAR*:Tnos” obtenida a través del ensamblaje binario entre “pDGB $\alpha$ 2\_\_35S:*Delila*:T35S35S:*Rosea1*:T35S35S:*MtANR*:Tnos35S:*MtLAR*:Tnos” y el módulo “pDGB $\alpha$ 1\_*Hph*” en el vector de destino pDGB $\Omega$ 1.

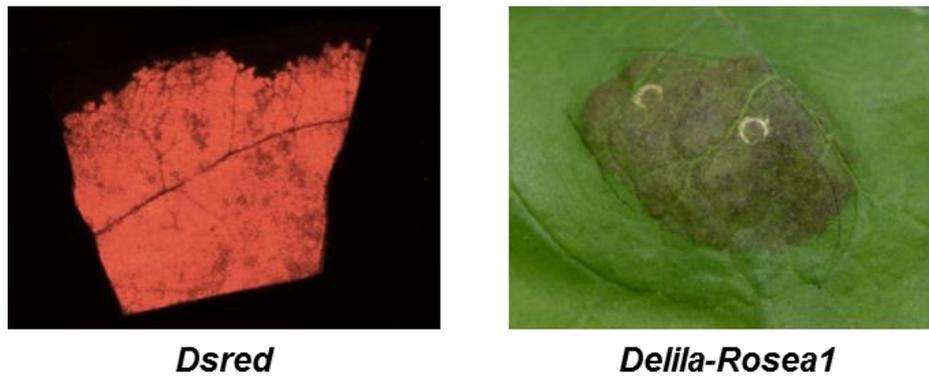
## 2. Validación funcional de la construcción *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

### 2.1. Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*

Para probar la funcionalidad de las diferentes construcciones, se realizaron ensayos de expresión transitoria mediante agroinfiltración en hojas de plantas de *N. benthamiana* (Materiales y Métodos, apartado 5.2). Utilizando los módulos construidos explicados en el apartado 1, podíamos conseguir distintas combinaciones entre los dos factores de transcripción *Delila* y *Rosea1*, y los dos genes que codifican las dos enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de las PAs, *MtANR* y *MtLAR*. Las construcciones utilizadas se representan en la figura 87. En total se realizaron 2 ensayos, y se agroinfiltraron 10 plantas para cada uno de ellos. Como control de la agroinfiltración se utilizaron plantas agroinfiltradas únicamente con el gen reportero *Dsred* (Figura 88).



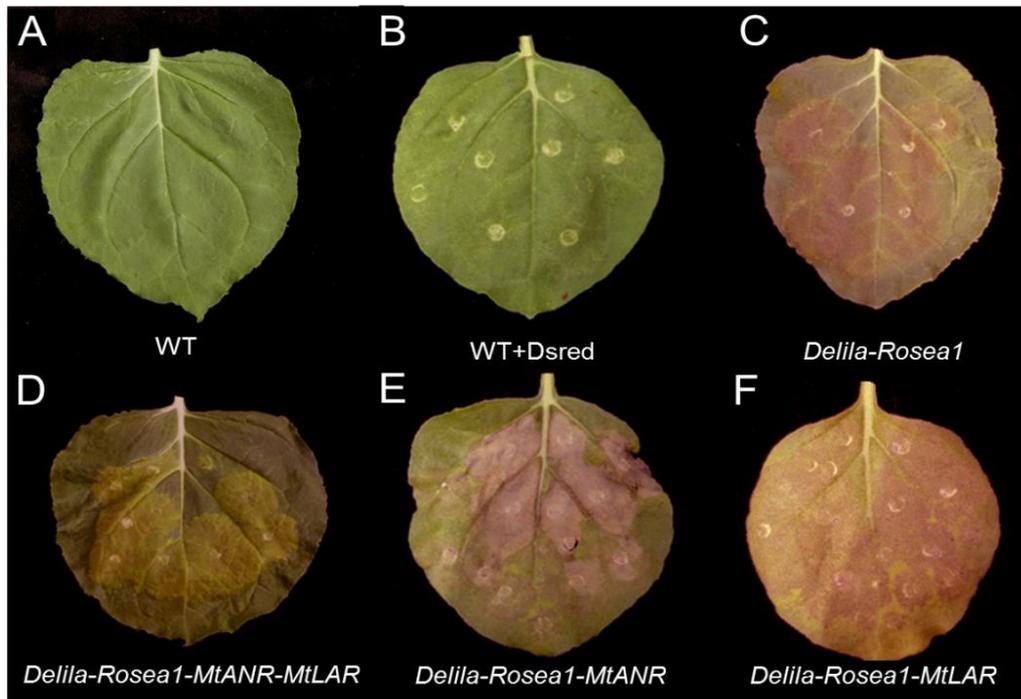
**Figura 87. Construcciones multigénicas GoldenBraid 2.0 usadas en este trabajo.** Abreviaturas: 35S, promotor constitutivo 35S de CaMV; T35S, terminador 35S de CaMV; Tnos, terminador de la nopalina sintasa; *HYG*, gen que confiere resistencia al antibiótico Higromicina; *Rosea1*, factor de transcripción tipo MYB; *Delila*, factor de transcripción tipo bHLH; *MtANR*, gen de la *antocianidina reductasa* de *M. truncatula*; *MtLAR*, gen de la *leucoantocianidina reductasa* de *M. truncatula*.



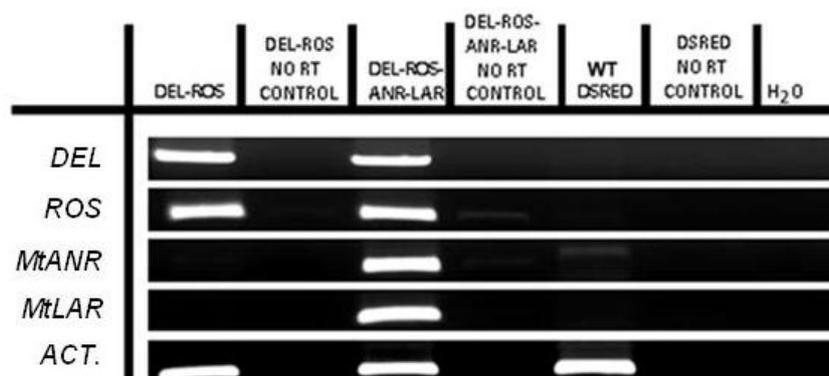
**Figura 88. Comprobación de expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* utilizando el gen marcador *DsRed* (izquierda) que produce fluorescencia roja al iluminar con luz UV. Halo de pigmentación púrpura producido por la expresión de *Rosea1* tras la agroinfiltración y consiguiente producción de antocianinas (derecha).**

Las diferentes combinaciones de *Delila-Rosea1*, *Delila-Rosea1-MtANR*, *Delila-Rosea1-MtLAR* y *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* bajo el control del promotor constitutivo 35S, produjeron una pigmentación de color púrpura en las áreas que fueron agroinfiltradas (Figura 89 C, D, E y F) en comparación con el control no agroinfiltrado y el control positivo de la agroinfiltración con el gen reportero *DsRed* (Figura 89 A y B, respectivamente). La pigmentación púrpura fue evidente 5 días después de la agroinfiltración y aumentó progresivamente.

Para analizar la funcionalidad de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*, se analizaron los niveles de expresión de los cuatro transgenes. Esto se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA procedente de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* 5 días después de la agroinfiltración (Figura 90) usando oligonucleótidos específicos para dichos genes (Tabla 5). Como gen constitutivo se usó el gen endógeno *ACTINA8* (*NbACT8*). La detección de la expresión constitutiva de todos ellos demuestra la funcionalidad de la construcción multigénica (Figura 90).

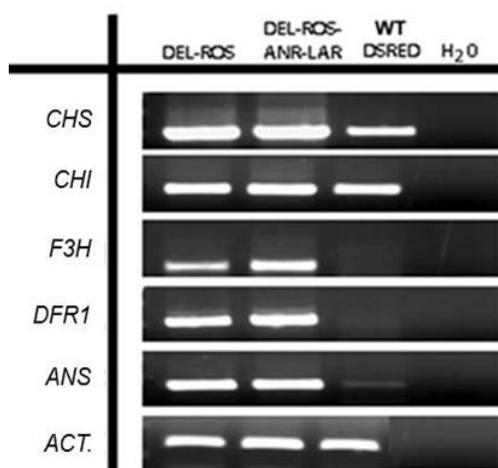


**Figura 89. Ensayo de expresión transitoria por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*.** Agroinfiltración con las cuatro construcciones multigénicas GoldenBraid 2.0 usando jeringas sin aguja en hojas de plantas de 4-5 semanas de edad de *N. benthamiana*. **(A)**. Hoja WT de *N. benthamiana* no agroinfiltrada. **(B)**. Hoja agroinfiltrada con *DsRed* (control de la agroinfiltración). **(C)**. Hoja agroinfiltrada con la construcción *Del-Ros1* que presenta una pigmentación de color púrpura en las áreas agroinfiltradas. **(D)**. Hoja agroinfiltrada con la construcción multigénica *Del-Ros1-ANR-LAR* que muestra una pigmentación de color púrpura. **(E)**. Hoja agroinfiltrada con la construcción multigénica *Del-Ros1-ANR* que presenta pigmentación de color púrpura. **(F)**. Hoja agroinfiltrada con la construcción multigénica *Del-Ros-LAR* que muestra pigmentación de color púrpura.



**Figura 90. Expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.** Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para todos los genes analizados.

Se ha realizado un análisis de expresión de los genes que codifican las principales enzimas que integran la ruta de biosíntesis de flavonoides en *N. benthamiana*. Para ello se realizó una RT-PCR a partir de RNA de hojas procedente de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* 5 días después de la agroinfiltración usando oligonucleótidos específicos para estos genes (Tabla 5). Nuestros resultados muestran que los factores transcripcionales *Delila* y *Rosea1* inducen la expresión de los genes implicados en la ruta biosíntesis de antocianinas con respecto a los niveles de las plantas control (Figura 91). Este es el caso del gen que codifica la enzima chalcona sintasa (*NbCHS*) (ver Figura 17 en la Introducción) y el gen que codifica la enzima chalcona isomerasa (*NbCHI*), (Figura 91). Por otro lado, *Delila* y *Rosea1* activan *de novo* la expresión de los genes que codifican las enzimas flavanona 3-hidroxilasa (*NbF3'H*), dihidroflavonol 4-reductasa (*NbDFR1*) y la antocianidina sintasa (*NbANS*) con respecto a las hojas agroinfiltradas con el control *DsRed* y las hojas WT (Figura 91). Estos resultados corroboran lo anteriormente señalado sobre el efecto regulador de ambos TFs, *Delila* y *Rosea1*, en la expresión de tres genes que codifican enzimas centrales de la vía de biosíntesis de flavonoides: *CHS*, *F3'H* y *ANS* (Butelli *et al.* 2008).



**Figura 91. Expresión de los genes implicados en la ruta biosíntesis de las antocianinas en hojas agroinfiltradas de *N.benthaminana*.** Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para todos los genes y a 25 para el gen *NbACTINA*.

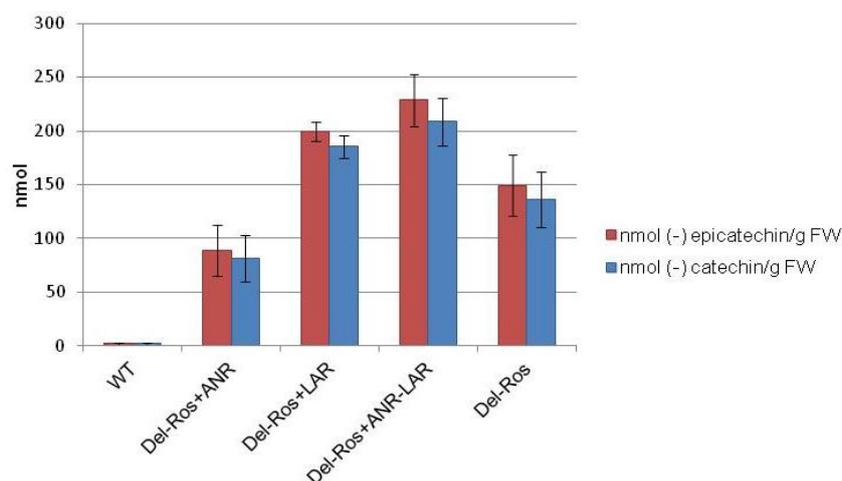
## 2.2. Detección y cuantificación de PAs en las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*

Una vez demostrada la activación de la ruta de biosíntesis de flavonoides, evaluamos la presencia de PAs en las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* con las distintas construcciones mediante una reacción colorimétrica con DMACA (Materiales y Métodos, apartado 5.1.6.1) y HPLC (Materiales y Métodos, apartado 5.1.6.2).

Nuestros resultados mostraron que en las plantas agroinfiltradas con la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* (Tabla 23 y Figura 92) se detectaron los niveles más elevados de PAs. La cantidad de PAs se expresa en equivalentes de catequina o de epicatequina ( $228,51 \pm 24,17$  nmol (-)-epicatequina/g FW y  $208,56 \pm 31,19$  nmol (-)-catequina/g FW) (Tabla 23 y Figura 92). El ensayo con DMACA mostró un aumento en el contenido de las PAs en el área foliar agroinfiltrada en comparación con las hojas WT no agroinfiltradas. En las hojas agroinfiltradas con las otras dos construcciones que llevan por separado los genes que codifican las enzimas *MtANR* o *MtLAR* se detectaron PAs, con  $89,11 \pm 23,62$  nmol (-)-epicatequina/g FW y  $81,33 \pm 21,56$  nmol (-)-catequina/g FW para la primera construcción, y con  $199,69 \pm 9,17$  nmol (-)-epicatequina/g FW y  $185,30 \pm 14,41$  nmol (-)-catequina/g FW para la segunda. La construcción que contiene sólo los factores de transcripción *Del-Ros1* también activa la producción de PAs con  $149,16 \pm 28,55$  nmol (-)-epicatequina/g FW y con  $136,24 \pm 36,95$  nmol (-)-catequina/g FW en las plantas agroinfiltradas (Tabla 23 y Figura 92). Este resultado podría indicar que el *Del-Ros1* activa la vía de síntesis de las antocianinas en las hojas agroinfiltradas para producir tanto leucoantocianina como antocianidina, que son los sustratos naturales de los enzimas *LAR* y *ANR*, respectivamente. La presencia de dichos sustratos junto con el hecho de que los promotores de *ANR* y *LAR* tienen sitios de unión tanto MYB como bHLH (Liu *et al.* 2014) podría ser suficiente para activar la vía de síntesis de PAs en *N. benthamiana*.

Muestras	nmol (-)-epicatequina/g FW	nmol (-)-catequina/g FW
WT	2,04 ± 1,33 a	1,86 ± 1,22 a
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR</i>	89,11 ± 23,62 b	81,33 ± 21,56 b
<i>DELILA-ROSEA1-MtLAR</i>	199,69 ± 9,17 c	185,30 ± 14,41 d
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR</i>	228,51 ± 24,17 d	208,56 ± 31,19 e
<i>DELILA-ROSEA1</i>	149,16 ± 28,55 c	136,24 ± 36,95 c

**Tabla 23. Cuantificación de PAs en extractos de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* por tinción colorimétrica con DMACA.** Los datos representan la media de tres repeticiones, ± el error estándar de los datos para cada muestra. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 92. Niveles de PAs en extractos de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* obtenidos mediante la reacción colorimétrica DMACA.** La reacción con DMACA mostró un incremento en el contenido de PAs en el área de las hojas agroinfiltradas comparadas con las hojas de plantas silvestres no agroinfiltradas.

La identificación de los compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) corroboró la presencia de antocianinas y PAs en las hojas agroinfiltradas con la construcción *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* y con la construcción *Delila-Rosea1* en comparación con plantas silvestres no agroinfiltradas. En la tabla 24 se muestran los compuestos fenólicos principales identificados en las diferentes muestras. En la muestra 1 (Control: plantas silvestres no agroinfiltradas) detectamos: el ácido cafeico esterificado con el ácido quínico en posición 3 (ácido clorogénico), 4 (ácido cripto-clorogénico) o 5 (ácido neoclorogénico), que también están presentes en

las muestras 2 (*Del-Ros1*) y 3 (*Del-Ros1-MtANR-MtLAR*). Sin embargo, otros compuestos implicados en la biosíntesis de antocianinas como cianidina 3-rutinósido y delphinidina 3-rutinósido sólo están presentes en las muestras 2 y 3, lo que indica que la vía de síntesis de antocianinas se ha activado después de la agroinfiltración con las construcciones GoldenBraid 2.0. Con respecto a las PAs, sólo se detectaron epigallocatequina en su forma monómera y dímera, tanto libre como conjugada a glucosa en las muestras 2 y 3, lo que indica que la producción de las PAs también se activó en estas hojas agroinfiltradas.

Compuestos fenólicos identificados	Muestra	UV (nm)	MS / MS-MS	Rt (min)
Ácido cripto-clorogénico	1,2,3	320, 298	353 / 191, 179, 135	10.9
Ácido clorogénico	1,2,3	320, 298	353 / 191, 179, 135	14.2
Ácido neoclorogénico	1,2,3	320, 298	353 / 191, 179, 135	14.8
Cianidina 3-rutinósido	2,3	518	593/ 285	15.4
Delphinidina 3-rutinósido	2,3	525	609 / 301	14.0
epigallocatequina dímero	2,3	292	609 / 305	9.0
epigallocatequina glucosido	2,3	292	467 /305	11.6
epigallocatequina	2,3	292	305 / 219, 179, 125	12.7

**Tabla 24. Identificación de compuestos fenólicos en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* por HPLC.** El análisis por HPLC demuestra la presencia de compuestos antocianínicos y de PAs en las hojas agroinfiltradas en comparación con las hojas de plantas silvestres no agroinfiltradas.

### 3. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* por transformación estable

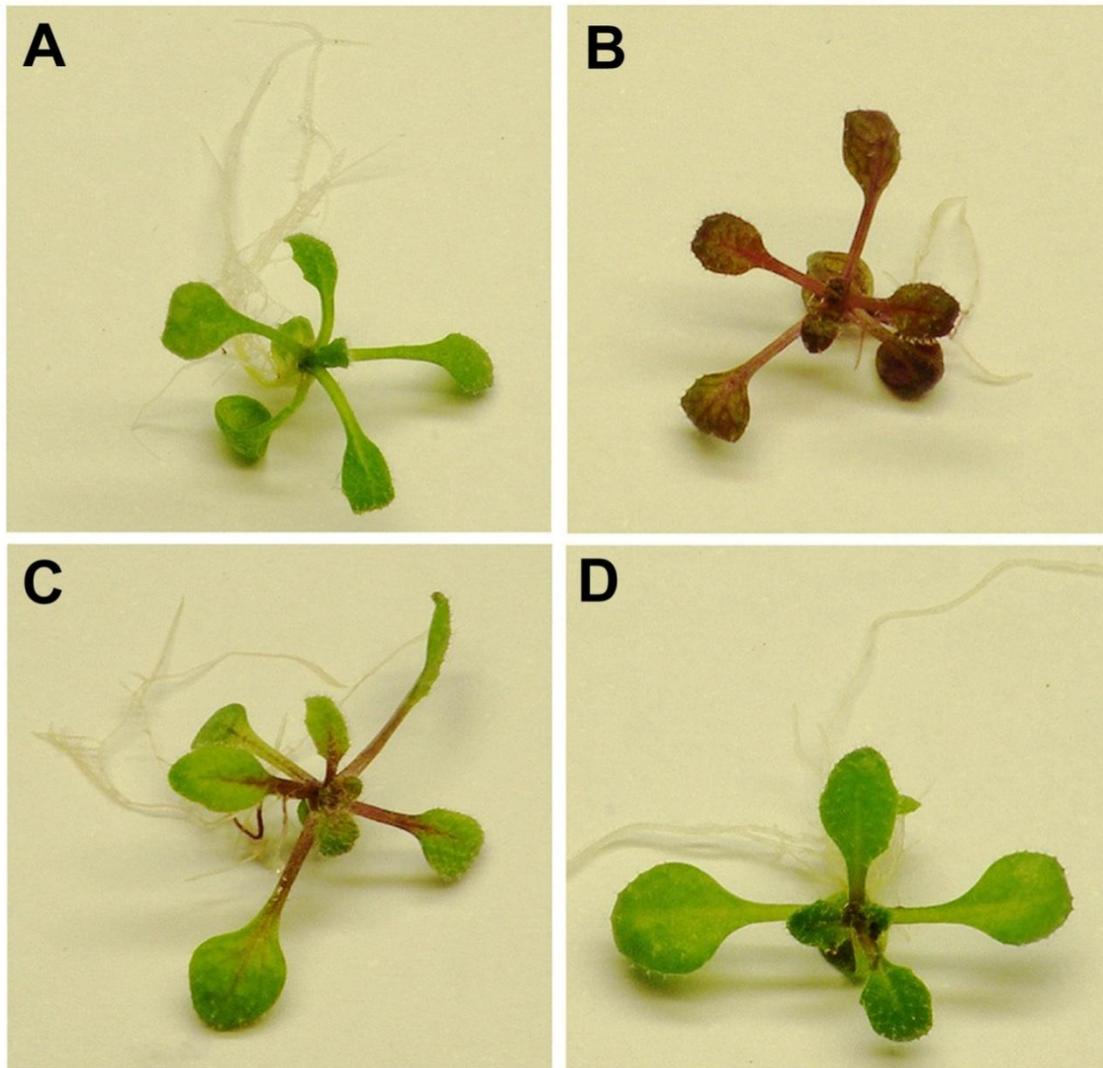
#### 3.1. Ensayos en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Medicago sativa*

Una vez demostrada la funcionalidad de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*, pasamos a su validación experimental mediante transformación estable de Isas plantas modelo *A. thaliana* y *N. tabacum* y posteriormente en *M. sativa*.

### **3.2. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *A. thaliana***

Como resultado de la transformación de plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col) se generaron 10 plantas independientes con la construcción 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* capaces de crecer en medio de selección con higromicina. De ellas, dos presentaron pigmentación púrpura en los distintos tejidos de la planta (Figura 93 B), siete presentaron únicamente pigmentación púrpura en el peciolo de las hojas y en el tallo (Figura 93 C), y una no mostró cambios respecto a las plantas control (Figura 93 D).

El desarrollo vegetativo de las 7 plantas que presentaban pigmentación púrpura únicamente en el peciolo de las hojas y en el tallo fue normal comparado con las plantas de fenotipo silvestre (Figura 94). Durante su crecimiento y desarrollo pudimos observar que la pigmentación se mantenía en los mismos tejidos. Por el contrario, las dos plantas que presentaban una intensa pigmentación púrpura en todos los tejidos de la planta no se desarrollaron correctamente y finalmente murieron. Esto podría ser debido a que las células transportan la excesiva producción de antocianinas y la almacenan en las vacuolas. La capacidad de almacenaje de estas vacuolas es limitada y teniendo en cuenta además que la producción de antocianinas es constitutiva y no se limita a determinados órganos de la planta, su excesiva acumulación en las células produce cierta toxicidad que se traduce en un retraso en su desarrollo e incluso en su muerte (Kitamura 2006).



**Figura 93. Plantas transgénicas *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* de *A. thaliana*.** (A). Planta silvestre: control. (B). Planta *Delila-Rosea1-MtANRMtLAR* que presenta una intensa pigmentación púrpura en todos los tejidos. (C). Planta *Delila-Rosea1-MtANRMtLAR* que presenta únicamente pigmentación púrpura en el peciolo de las hojas y en el tallo. (D). Planta transgénica mostrando un fenotipo muy suave de pigmentación solamente en la base de los peciolos.

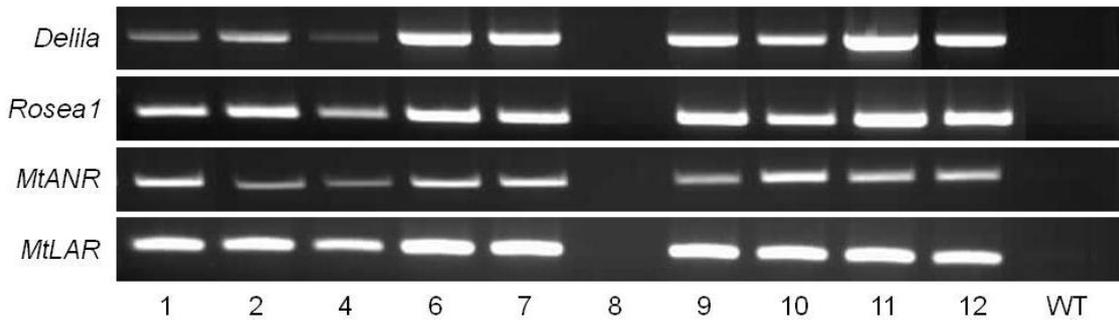


**Figura 94. Plantas transgénicas 35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR de Arabidopsis con fenotipo leve.** Planta control (izquierda) y planta transgénica (derecha). La planta transgénica presenta pigmentación púrpura en la base de los peciolos de las hojas y en el tallo (flechas blancas) en comparación con la planta control.

### 3.2.1. Caracterización de las plantas transgénicas

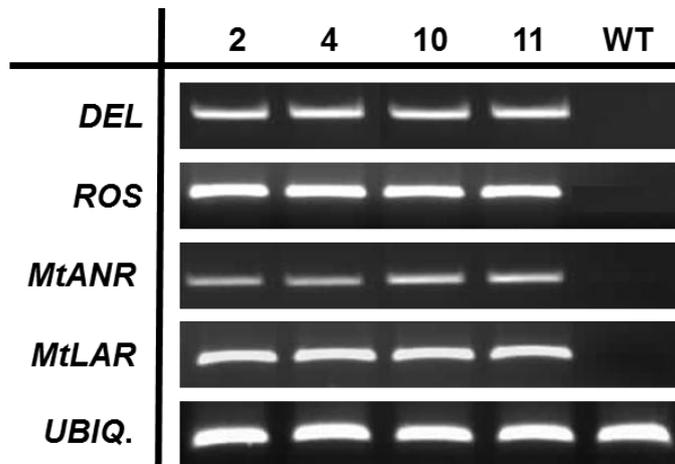
La caracterización de las plantas transgénicas obtenidas mediante transformación estable consistió en la evaluación de la capacidad de integración en el genoma de los cuatro transgenes y el análisis de los niveles de expresión de los mismos en cada una de las especies evaluadas. En el caso de *N. tabacum* y *M. sativa*, se analizó la presencia de PAs mediante diferentes abordajes experimentales.

Para estudiar la capacidad de integración de la construcción multigénica 35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR en el genoma de *A. thaliana*, se evaluó la presencia de *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en las plantas transgénicas. Para ello, se realizó una PCR a partir de DNA genómico aislado de hojas de roseta de las plantas resistentes a higromicina usando oligonucleótidos específicos para estos genes (Tabla 5). Los resultados mostraron que de las 10 plantas analizadas, en 9 de ellas se detectaron los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR*, mientras que sólo en una de las plantas transgénicas (8), no se detectó la presencia de ninguno de ellos, indicando que esta planta era un falso positivo (Figura 95). Esta planta es la que no mostró cambios de coloración en sus órganos vegetativos, siendo su fenotipo idéntico al de las plantas control.



**Figura 95. Comprobación de la presencia de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en las plantas transgénicas de *A.thaliana* .** De las 10 plantas obtenidas, 9 albergan el conjunto completo de transgenes (plantas 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11 y 12). En la planta número 8 no se detectó la expresión de ninguno de los transgenes analizado.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello, se utilizó RNA de hojas caulinares de 4 plantas transgénicas (2, 4, 10 y 11) y como gen constitutivo el gen endógeno *UBIQUITINA* (*UBIQ*).



**Figura 96. Expresión de los genes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en hojas transformadas de *A. thaliana*.** Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para todos los genes y a 25 para el gen *UBIQUITINA*.

Los resultados mostraron que el nivel de expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* por separado, no varían entre las distintas líneas transgénicas 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. Sin embargo, se observan diferencias entre los niveles de expresión de los transgenes, siendo por ejemplo mayores los niveles de expresión obtenidos para *Rosea1* y *MtLAR* que para *Delila* y *MtANR*. En las plantas control no se detectó la expresión de los transgenes (Figura 96).

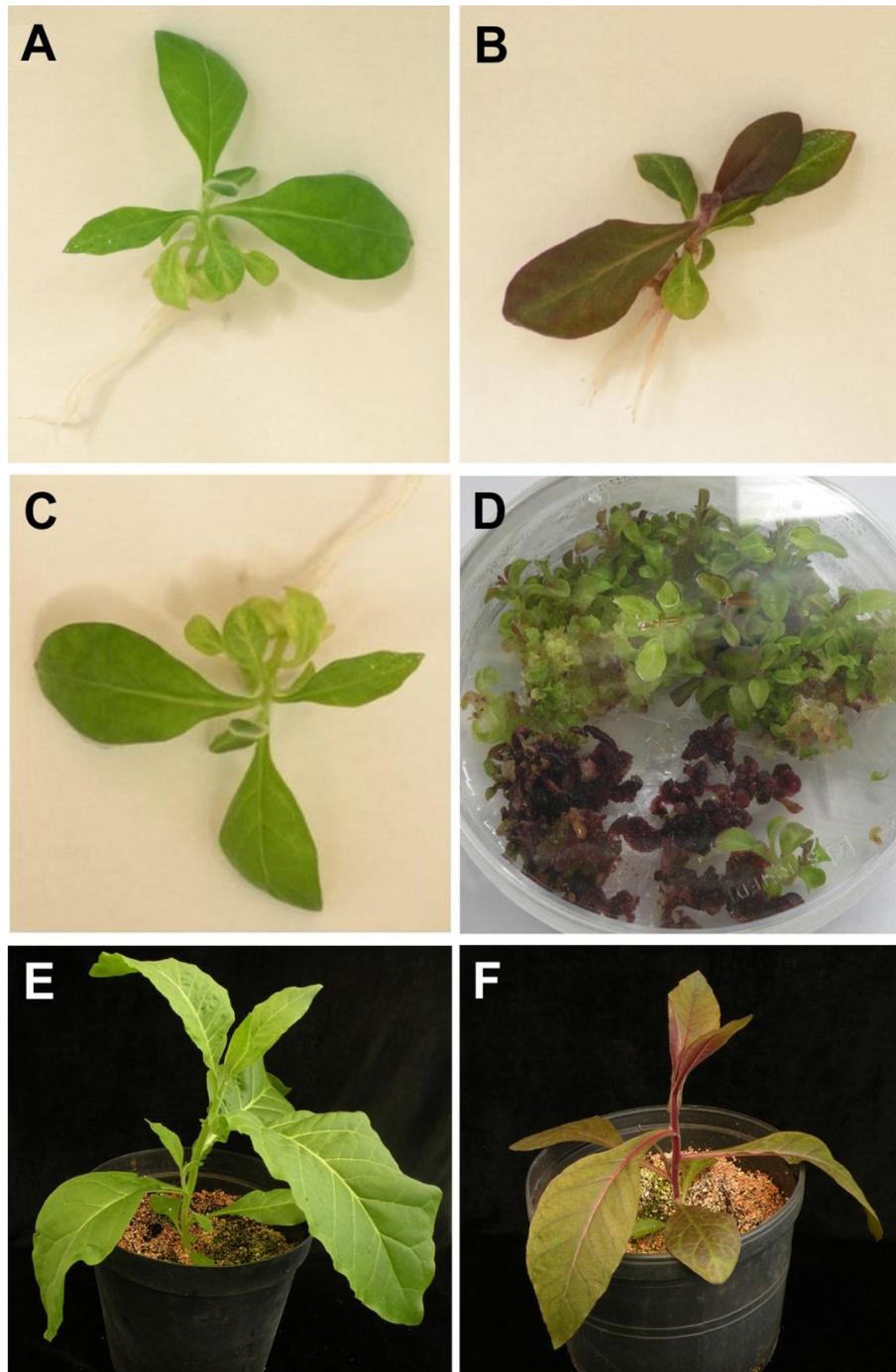
Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la construcción multigénica 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* no se pudieron usar para el análisis de detección de PAs al no disponer de material vegetal suficiente para los mismos.

### 3.3. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *N. tabacum*

Como resultado de la transformación de tabaco con la construcción 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*, se generaron 10 líneas transgénicas T1 independientes resistentes a higromicina. De todas ellas se seleccionó una planta por línea. Se observó que cinco de estas plantas presentaban pigmentación púrpura en todos los tejidos, una planta presentaba algunas pequeñas manchas antociánicas, y el resto de plantas no mostró diferencias con respecto al fenotipo de las plantas control (Figura 97). Muchos de los callos que presentaban una intensa coloración púrpura no pudieron producir regenerantes *in vitro* debido a la excesiva acumulación de antocianinas producida en sus células (Figura 97 D) que evidentemente resultaba tóxica para su desarrollo (Kitamura *et al.* 2006). En la tabla 25 se muestra un resumen de la severidad del fenotipo observado en cuanto a coloración púrpura acumulada en los distintos órganos de la planta en cada una de las líneas transgénicas obtenidas.

Línea/Planta	Fenotipo
1	silvestre (verde)
2	silvestre
3	silvestre
4	silvestre
5	leve
6	severo
7	muy severo
8	moderado
9	moderado
10	moderado

Tabla 25. Grados de severidad del fenotipo coloreado de las plantas transgénicas de tabaco 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*.

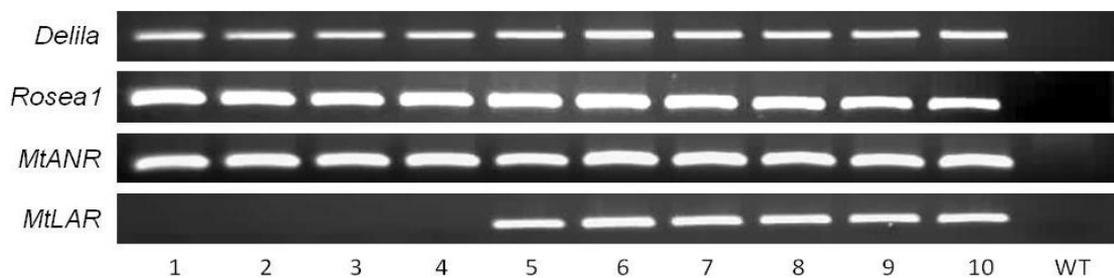


**Figura 97.** Plantas transgénicas *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* de *N. tabacum* (A). Planta control. (B). Planta *Delila-Rosea1-MtANRMtLAR* que presenta pigmentación púrpura en todos los tejidos. (C). Planta *Delila-Rosea1-MtANRMtLAR* que no presenta pigmentación. (D). Callos de color púrpura intenso que no continuaron su desarrollo *in vitro*. (E). Planta control tras su aclimatación en invernadero. (F). Planta *Delila-Rosea1-MtANRMtLAR* tras su aclimatación en el invernadero.

### 3.3.1. Caracterización de las plantas transgénicas

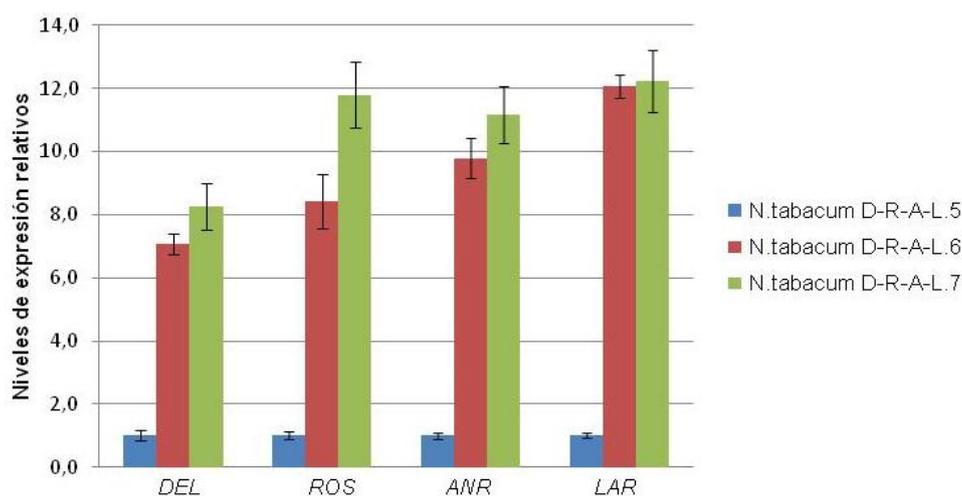
Para estudiar la capacidad de integración de la construcción multigénica *35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en el genoma de *N. tabacum*, se evaluó la presencia de estos cuatro transgenes en las plantas transgénicas generadas.

Se realizó una PCR a partir de DNA genómico aislado de hojas jóvenes de las plantas resistentes a higromicina utilizando oligonucleótidos específicos para dichos genes (Tabla 5). Los resultados mostraron que de las 10 plantas obtenidas, únicamente 6 (plantas 5, 6, 7, 8, 9 y 10) albergaban los cuatro transgenes (Figura 98).



**Figura 98. Comprobación de la presencia de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en las plantas transgénicas de tabaco.** De las 10 plantas analizadas, 6 albergaban el conjunto completo de transgenes (plantas 5 a 10). Las plantas 1 a 4 carecían del transgen *MtLAR*.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión de los transgenes *Delila* (*DEL*), *Rosea1* (*ROS*), *MtANR* y *MtLAR* mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) en tres de las plantas transgénicas obtenidas (plantas 5, 6 y 7) (Figura 99). Las tres plantas fueron seleccionadas según su fenotipo: la planta que presentaba algunas pequeñas manchas antociánicas (planta 5) y dos plantas que presentaban pigmentación púrpura en todos los tejidos (plantas 6 y 7). Para ello, se utilizó RNA de hojas jóvenes y como gen normalizador el gen endógeno *NtACTINA* (*NtACT*).



**Figura 99. Niveles de expresión de los transgenes *DEL*, *ROS*, *MtANR* y *MtLAR* en las plantas transgénicas de *N. tabacum* cuantificados mediante qRT-PCR.** Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a la muestra de referencia (planta nº 5). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Como gen constitutivo de referencia se utilizó el gen *NtACTIN* para la normalización de las muestras.

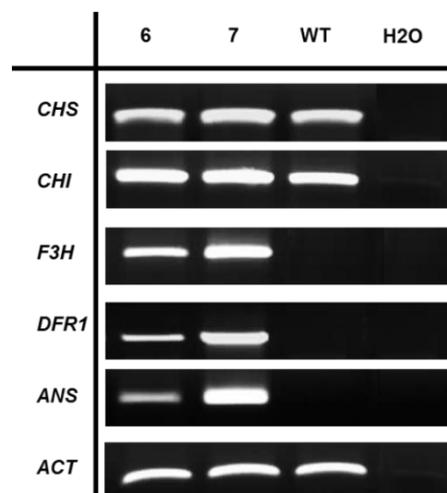
Estos resultados mostraron que la expresión de los cuatro transgenes varía entre las distintas líneas transgénicas 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. Los mayores niveles de expresión para todos los transgenes se observaron en la línea transgénica 7, a continuación en la línea transgénica 6, y los niveles más bajos de expresión se observaron en la línea 5 (Figura 99).

El análisis reveló que existía una correlación entre los niveles de expresión de los transgenes *Delila* y *Rosea1* y la pigmentación antociánica; las plantas donde los niveles de expresión de los transgenes eran mayores, eran aquellas en las que la acumulación de antocianinas era más acentuada. Un resumen donde se relaciona el nivel de expresión de los transgenes y la severidad del fenotipo, en las distintas líneas transgénicas, se muestra en la tabla 26.

Línea	Fenotipo	Expresión de los transgenes
5	leve	+
6	severo	+++
7	muy severo	++++

**Tabla 26. Nivel de expresión de los transgenes y severidad de fenotipo de las plantas transgénicas de tabaco 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*.**

También se ha realizado un análisis de expresión de los genes que codifican las principales enzimas de la ruta de biosíntesis de antocianinas en las plantas transgénicas 6 y 7. Para ello, se realizó una RT-PCR semicuantitativa usando RNA de hojas de plantas transgénicas y plantas control, y como gen constitutivo el gen endógeno *NtACTINA*. Se usaron oligonucleótidos específicos diseñados a partir de las secuencias de los genes *NtCHI*, *NtF3H* y *NtANS* de *N. tabacum* y de los genes *NbCHS* y *NbDFR1* de *N. benthamiana* (Tabla 5). Nuestros resultados muestran que en estas plantas se induce la expresión de los genes que codifican las enzimas *NtF3'H*, *NtDFR1* y *NtANS* de *N. tabacum* con respecto a las hojas control; además, que existe una correlación entre los niveles de expresión de los transgenes y la expresión de los genes implicados en dicha ruta (Figura 100). Estos resultados son similares a los obtenidos tras la expresión transitoria de la construcción multigénica *35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *N. benthamiana*. Además, estos resultados muestran que los TFs de *Antirrhinum Delila* y *Rosea1* también son capaces de regular la expresión de los genes que codifican las enzimas centrales de la ruta de biosíntesis de flavonoides en *N. tabacum* (*NtCHS*, *NtF3'H* y *NtANS*) como lo hicieron en el fruto de plantas transgénicas *E8::Delila-E8::Rosea1* de tomate (Butelli *et al.* 2008).



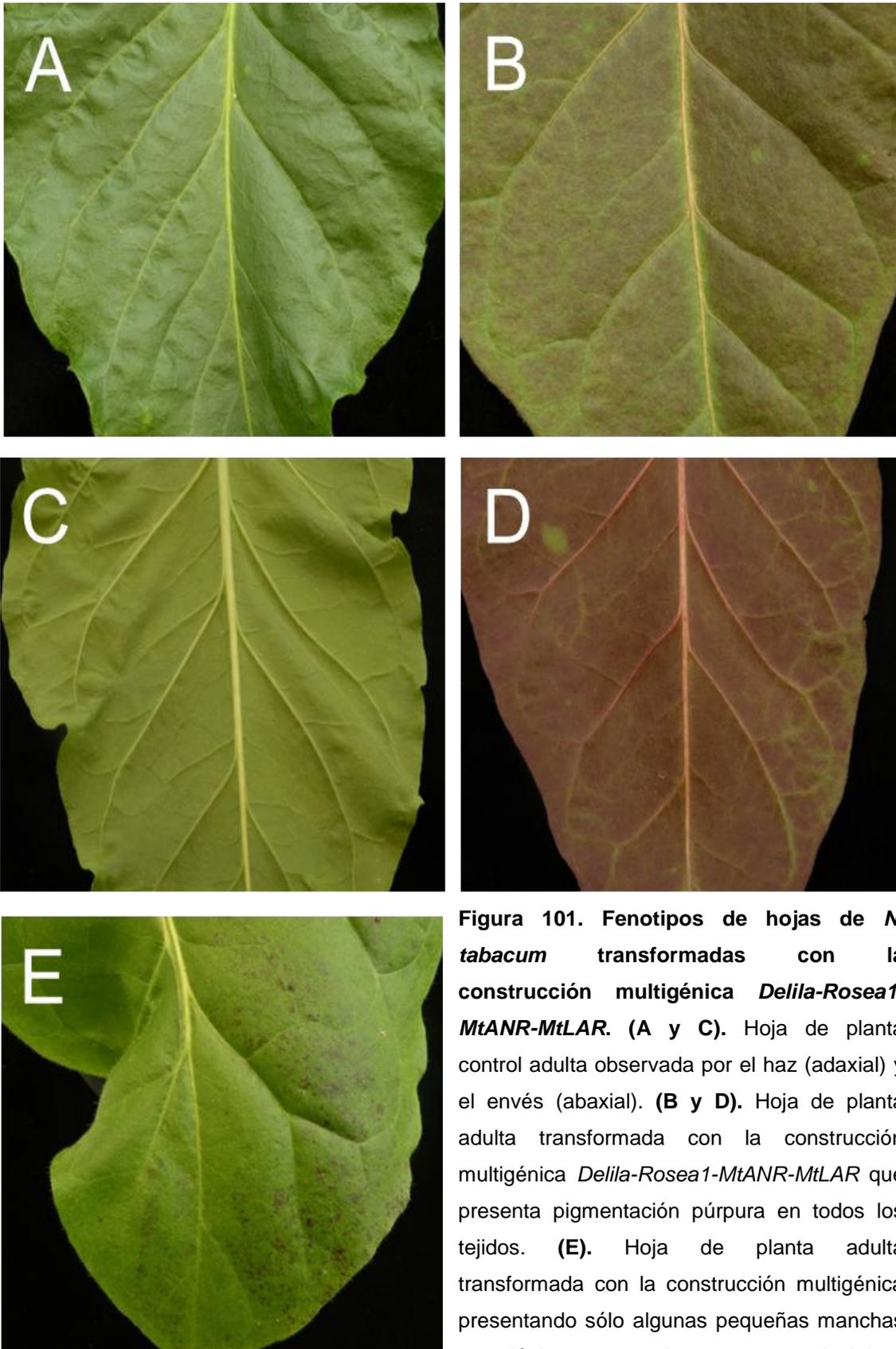
**Figura 100. Expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta biosíntesis de antocianinas en *N. tabacum*.** *NtACTINA* (*ACT*): gen constitutivo. Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para todos los genes y a 25 para la *NtACTINA*.

### 3.3.2. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas T1 de *N. tabacum*

Una de las plantas que mostraba mayor pigmentación púrpura en todos sus tejidos presentó un retraso en su desarrollo vegetativo debido probablemente a la toxicidad que provocaba la excesiva acumulación de antocianinas en sus células (Kitamura *et al.* 2006). El desarrollo de las otras 4 plantas que mostraban pigmentación púrpura fue normal comparado con las plantas de fenotipo silvestre.

Durante su crecimiento y desarrollo pudimos observar que la pigmentación se mantenía en los mismos tejidos, observándose una mayor acumulación de este color en el envés (cara abaxial) de las hojas y en los tejidos vasculares (Figura 101). Por el contrario, la planta que tan sólo presentaba en estadíos tempranos pequeñas manchas púrpuras en algunas de las hojas, continuó su crecimiento y desarrollo con normalidad, presentando finalmente sus hojas el mismo fenotipo de pigmentación en mosaico que al principio.

En cuanto al desarrollo reproductivo de las plantas transgénicas, aquellas que mostraban una mayor pigmentación púrpura en todos sus tejidos, también presentaron una acumulación de antocianinas en todos los órganos florales, sépalos, pétalos, estambres y carpelo (Figura 102). Además, pudimos observar como el estilo carpelar de estas flores era un poco más largo en comparación con las flores de las plantas control. A pesar de ello estas flores fueron fértiles y produjeron semillas, probablemente porque el estigma se poliniza antes de alargarse el estilo. En cambio, otra de las plantas que presentaba pigmentación púrpura, sólo presentó acumulación de antocianinas en algunas de sus flores. El resto de plantas mostró un desarrollo reproductivo normal comparado con las plantas de fenotipo silvestre.



**Figura 101. Fenotipos de hojas de *N. tabacum* transformadas con la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. (A y C). Hoja de planta control adulta observada por el haz (adaxial) y el envés (abaxial). (B y D). Hoja de planta adulta transformada con la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* que presenta pigmentación púrpura en todos los tejidos. (E). Hoja de planta adulta transformada con la construcción multigénica presentando sólo algunas pequeñas manchas antocianicas en mosaico en su cara adaxial.**



**Figura 102. Fenotipos florales de plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. (A).** Dos flores de una planta control con pigmentación normal (izquierda) comparadas con dos flores de una planta transformada con la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* (derecha) que presentan mayor pigmentación púrpura en todos los tejidos florales. **(B).** Órganos reproductivos muy pigmentados de una flor transgénica (derecha) comparados con los de una flor control silvestre (izquierda).

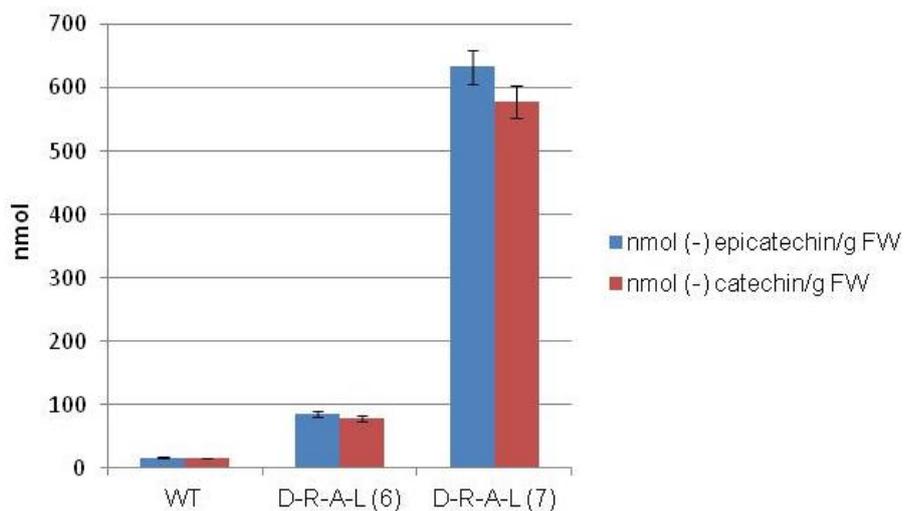
### 3.3.3. Detección y cuantificación de PAs

Para analizar si la expresión constitutiva de los transgenes que portaba la construcción *35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* eran capaces de activar a ruta de síntesis de PAs en las hojas transformadas de *N. tabacum*, se realizó una reacción colorimétrica específica para flavanoles con DMACA y un ensayo colorimétrico selectivo para PAs, reacción Bate-Smith (Bate-Smith y Lerner 1954), (Materiales y métodos, apartado 5.1.6.3).

El ensayo con DMACA mostró que los niveles máximos de PAs expresados como equivalentes de catequina o epicatequina fueron encontrados en la planta transformada número 7 ( $633 \pm 27,5$  nmol (-)-epicatequina/g FW y  $577,79 \pm 25,09$  nmol (-)-catequina/g FW), (Tabla 27 y Figura 103). Aunque con menores niveles, la planta número 6 también mostró producción de PAs ( $86,56 \pm 4,91$  nmol (-)-epicatequina/g FW y  $79 \pm 4,48$  nmol (-)-catequina/g FW), (Tabla 27 y Figura 103). Estos resultados corroboran el papel de *MtANR* y *MtLAR* en la conversión de sus correspondientes sustratos intermediarios en PAs.

Muestras	nmol (-)-epicatequina/g FW	nmol (-)-catequina/g FW
WT	$16,90 \pm 0,42$ a	$15,42 \pm 0,38$ a
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR</i> (7)	$633 \pm 27,5$ c	$577,79 \pm 25,09$ c
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR</i> (6)	$86,56 \pm 4,91$ b	$79 \pm 4,48$ b

**Tabla 27. Cuantificación de PAs en extractos de hojas transformadas de *N. tabacum* por reacción colorimétrica DMACA.** Los datos representan la media de tres repeticiones,  $\pm$  el error estándar de los datos para cada muestra. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 103. Niveles de PAs en extractos de hojas transformadas de *N. tabacum* por reacción colorimétrica DMACA.** La reacción colorimétrica DMACA mostró un incremento en el contenido de PAs en las hojas transgénicas comparadas con las hojas procedentes de plantas no transformadas.

El ensayo colorimétrico selectivo y cualitativo para taninos condensados (PAs), la reacción de Bate-Smith (Bate-Smith *et al.* 1954) (Materiales y Métodos, apartado 5.1.6.3), detectó la presencia de PAs en los extractos procedentes de las plantas 6 y 7 así como en la muestra usada como control positivo (Té verde). Se pudo observar que la reacción procedente de los extractos de la planta número 7 daba lugar a una coloración rojiza más intensa en comparación con la planta número 6. Este intensa coloración está en consonancia con los elevados niveles de PAs mostrados previamente por esta planta en la reacción de DMACA (Figura 104). Las muestras fueron comparadas con el control negativo (planta silvestre no transformada) donde no hubo coloración.



**Figura 104. Reacción de Bate-Smith en dos líneas transgénicas de *N. tabacum*.** La reacción de Bate-Smith corrobora la presencia de PAs en los extractos de hoja de dos líneas transgénicas de *N. tabacum* (6 y 7).

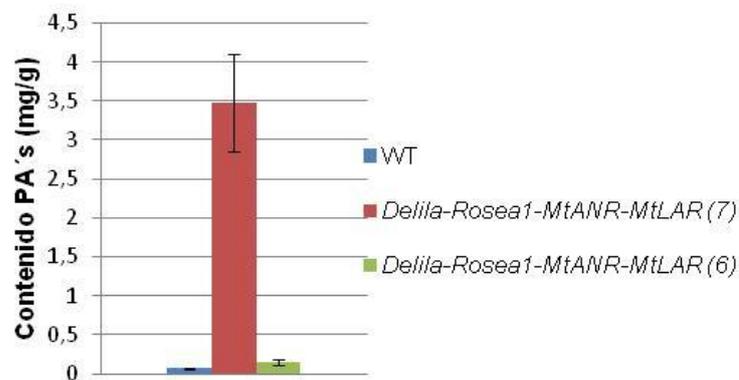
También realizamos la identificación de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una reacción de floroglucinólisis en la que se corroboró la presencia de PAs en las hojas transformadas. El análisis mediante floroglucinólisis permitió la cuantificación de las PAs después de la separación de los productos de reacción (unidades terminales y aductos) en presencia de floroglucinol. El análisis mostró que sólo la epicatequina estaba presente como unidad de extensión, y además, que la epicatequina es más relevante que la catequina. También estos resultados mostraron que la planta 7 presenta los valores más elevados de PAs totales con 3,48 mg/g de peso seco, en cambio, la planta 6 mostró niveles muy bajos con 0,15 mg/g (Figura 105). Además, se encontraron diferencias en el grado medio de polimerización (GPm) entre las plantas 6 y 7, siendo la planta 6 la que presenta los valores más altos con 2,32, y 1,76 para la planta 7. Esto indica que la planta 7 se compone principalmente de monómeros y dímeros, en

cambio, la planta 6 se compone principalmente, y en pequeñas cantidades, de dímeros.

**A**

Muestras	GPm
WT	--
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR (7)</i>	1,76 ± 0,56
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR (6)</i>	2,32 ± 0,12

**B**



**Figura 105. Niveles de PAs en extractos de hojas transformadas de *N. tabacum* por reacción de floroglucinolisis. (A).** El grado de polimerización (GPm) es mayor en la planta 6 que en la 7. **(B).** La reacción por floroglucinolisis mostró un incremento en el contenido de PAs en las hojas transgénicas comparadas con las hojas procedentes de plantas no transformadas.

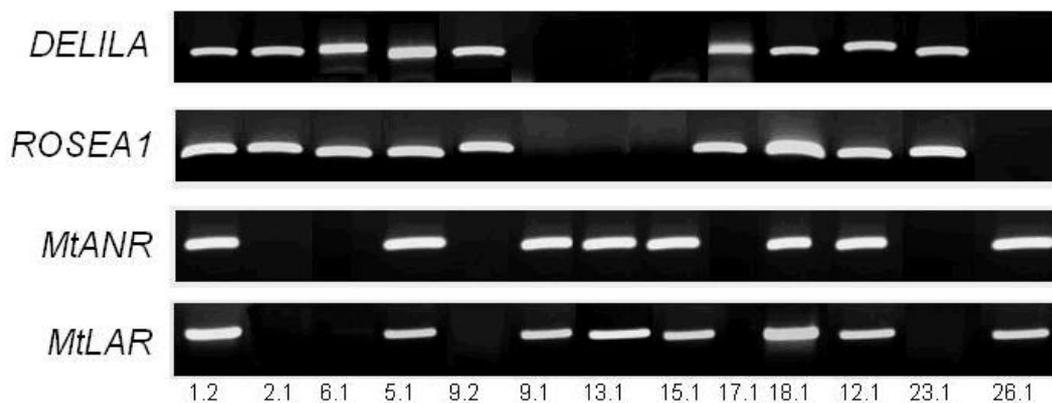
Todos los resultados anteriores revelaron que existe una correlación entre los niveles de expresión de los transgenes *Delila* y *Rosea1*, la activación e incremento de los niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de flavonoides, la acumulación de antocianinas y la producción de PAs. Es decir, la planta donde los niveles de expresión de los transgenes son más elevados es aquella en la que existe una mayor inducción de la expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de flavonoides, dando lugar a una mayor biosíntesis de antocianinas y por consiguiente, a una elevada producción de PAs.

### 3.4. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *M. sativa*.

Para investigar si la construcción multigénica 35S:*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* es capaz de producir PAs *de novo* en alfalfa, se obtuvieron plantas transgénicas de *Medicago sativa*. Se obtuvieron 77 plantas resistentes a higromicina, pertenecientes a 26 líneas de *M. sativa* RSY27 independientes. Se seleccionaron 12 líneas transgénicas que se caracterizaron mediante la evaluación de la capacidad de integración de los cuatro transgenes en el genoma, la evaluación de sus niveles de expresión y la presencia de PAs mediante diferentes abordajes experimentales.

#### 3.4.1. Caracterización de las plantas transgénicas de *M. sativa*

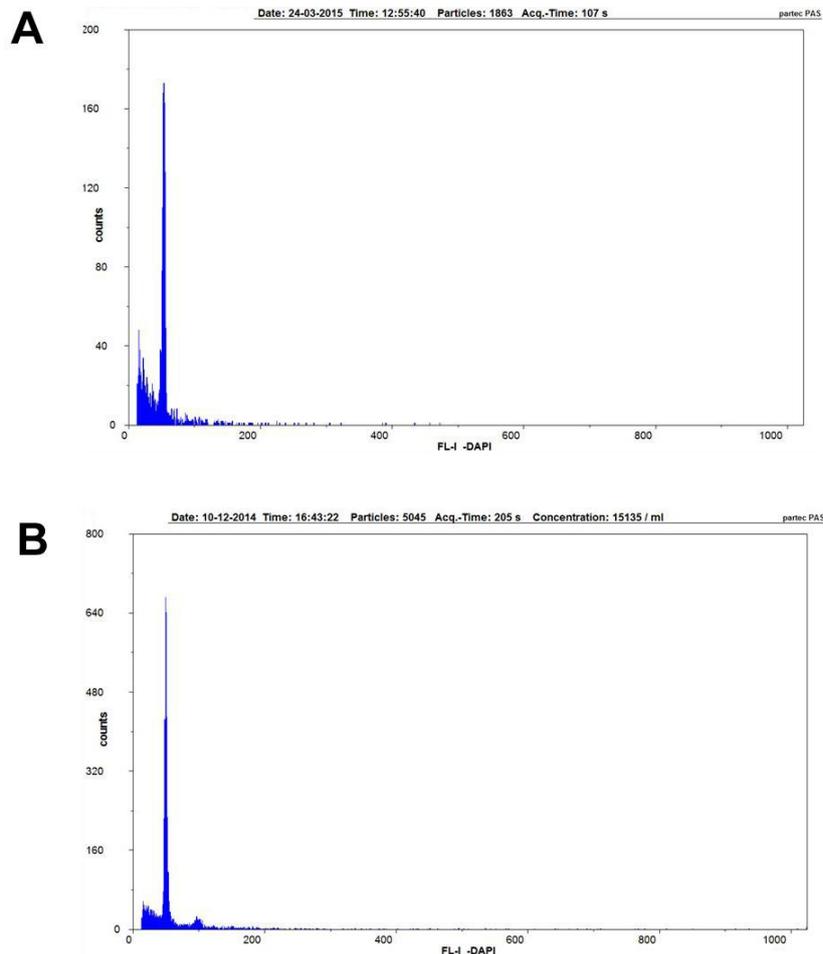
Para corroborar la presencia del T-DNA en las plantas resistentes a higromicina, se evaluó la presencia de los transgenes: *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR*. Para ello se realizó una PCR a partir de DNA genómico aislado de hojas jóvenes de plantas transgénicas y usando oligonucleótidos específicos para estos genes (Tabla 5). Los resultados del análisis de PCR mostraron que de las 12 líneas transgénicas, sólo en 4 de ellas se integraron en el genoma los cuatro transgenes (*Del-Ros1-MtANR-MtLAR*): 1.2, 5.1, 12.1 y 18.1 (Figura 106).



**Figura 106. Comprobación de la presencia de los transgenes en las plantas resistentes a higromicina mediante análisis de PCR.** De las 12 plantas transgénicas, sólo 4 albergan el conjunto completo de transgenes: 1.2, 5.1, 12.1 y 18.1.

Las plantas transgénicas T1 seleccionadas por contener el conjunto de los transgenes, se analizaron mediante citometría de flujo a fin de evaluar su nivel de

ploidía, resultando todas ellas tetraploides (4n). Por tanto, las plantas resistentes a higromicina y seleccionadas por su contenido en los cuatro transgenes no presentaban alteraciones en su nivel de ploidía que pudieran dar lugar a una mala interpretación de los fenotipos observados (Figura 107).



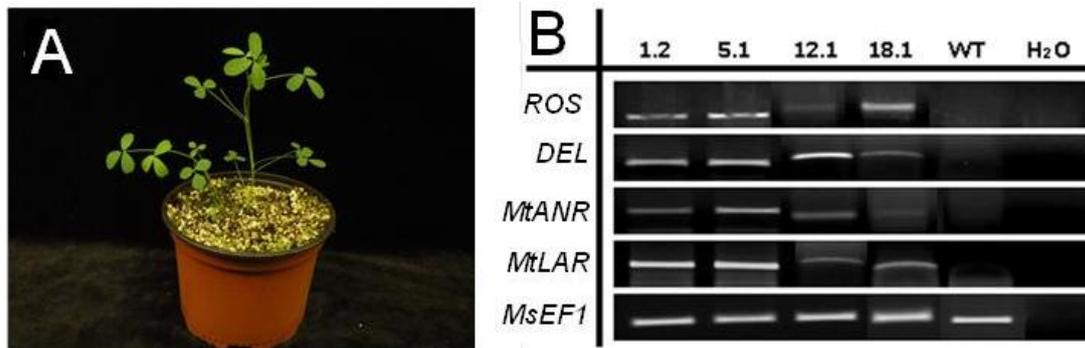
**Figura 107. Comprobación del nivel de ploidía en las plantas transgénicas en comparación con el ecotipo RSY27 (4n).** (A). Citometría de flujo de una hoja del ecotipo RSY27 tetraploide. (B). Todas las plantas transgénicas RSY27 seleccionadas eran tetraploides. El diagrama corresponde a la planta 1.2.

Las plantas transgénicas 1.2, 5.1, 12.1 y 18.1 seleccionadas no mostraron ninguna pigmentación púrpura en sus órganos vegetativos a diferencia de los ocurrido en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco (Figura 108 A).

Para evaluar los niveles de expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR*, se realizó una RT-PCR semicuantitativa utilizando RNA de hojas jóvenes de las cuatro plantas transgénicas independientes (1.2, 5.1, 12.1 y 18.1) seleccionadas y

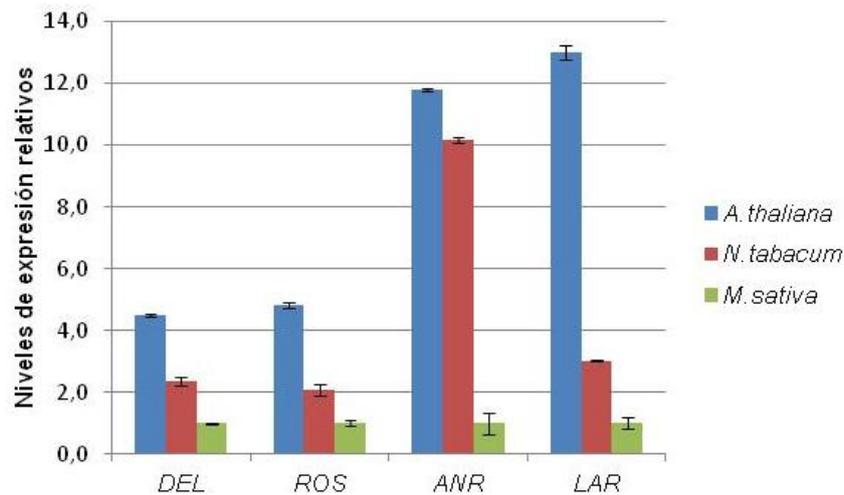
como gen constitutivo el gen endógeno *FACTOR DE ELONGACIÓN1* de *M. sativa* (*MsEF1*), (Tabla 5).

Los resultados mostraron que la expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* era débil ya que se necesitaron 35 ciclos de amplificación para hacer visibles los fragmentos de PCR. No se encontró variación entre los niveles de expresión de los mismos entre las distintas plantas transgénicas (Figura 108 B).



**Figure 108.** Expresión de los genes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* en hojas de plantas transgénicas **35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR** de alfalfa. Los resultados de PCR se muestran a 35 ciclos de amplificación para todos los genes y a 25 para el *MsEF1*.

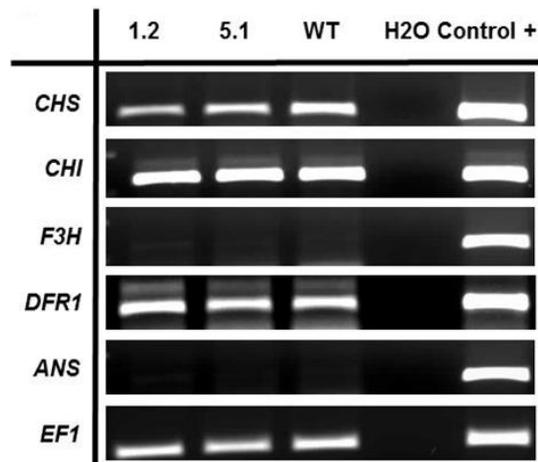
Se realizó una comparación entre los niveles de expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* para *A. thaliana*, *N. tabacum* y *M. sativa* mediante qRT-PCR. Los resultados muestran que las líneas analizadas de *A. thaliana* presentan niveles de expresión de los transgenes que se encuentran en el orden entre 4 y 12 veces mayores que los de *M. sativa*. En *N. tabacum*, se observan niveles de expresión de los transgenes que oscilan entre 2 y 10 veces respecto a los niveles exhibidos por los transgenes en alfalfa (Figura 109). Estos resultados sugieren que existen diferencias entre la eficacia de funcionamiento del promotor p35S entre diferentes especies dicotiledóneas.



**Figura 109. Niveles de expresión de los transgenes Delila (*DEL*), *Rosea1* (*ROS*), *MtANR* y *MtLAR* en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, *N. tabacum* y *M. sativa* cuantificados mediante qRT-PCR.** Se eligió para cada una de las especies, la línea que mostraba mayores niveles de expresión para cada uno de sus transcritos analizados mediante RT-PCR semicuantitativa (*A. thaliana*: línea 4, *N. tabacum*: línea 7; *M. sativa*: línea 5.1). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a la expresión de los transgenes en alfalfa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas técnicas.

Para corroborar si en alfalfa se inducen los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de flavonoides tras la expresión constitutiva de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR*, se realizó una RT-PCR semicuantitativa usando RNA procedentes de hojas jóvenes dos plantas transgénicas (1.2 y 5.1) y como gen constitutivo el gen endógeno *FACTOR DE ELONGACIÓN1* de *M. sativa* (*MsEF1*). En ésta, se analizó la expresión de los genes que codifican las principales enzimas de la ruta de biosíntesis de flavonoides en *M. sativa*. Para ello se usaron oligonucleótidos diseñados usando la secuencia de los genes *MtCHI*, *MtF3H*, *MtDFR1* y *MtANS* de *M. truncatula* y el gen *MsCHS* de *M. sativa* (Tabla 5).

Los resultados mostraron que los factores transcripcionales *Delila* y *Rosea1* no fueron capaces de activar transcripcionalmente la expresión de los genes que codifican algunas de las las enzimas que integran la ruta de biosíntesis de antocianinas en *M. sativa* como *MsF3H* y *Ms ANS* (Figura 110).



**Figura 110.** Expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta biosíntesis de antocianinas en *M. sativa*. Los resultados de PCR se muestran a 30 ciclos de amplificación para todos los genes y a 25 para el *MsEF1*.

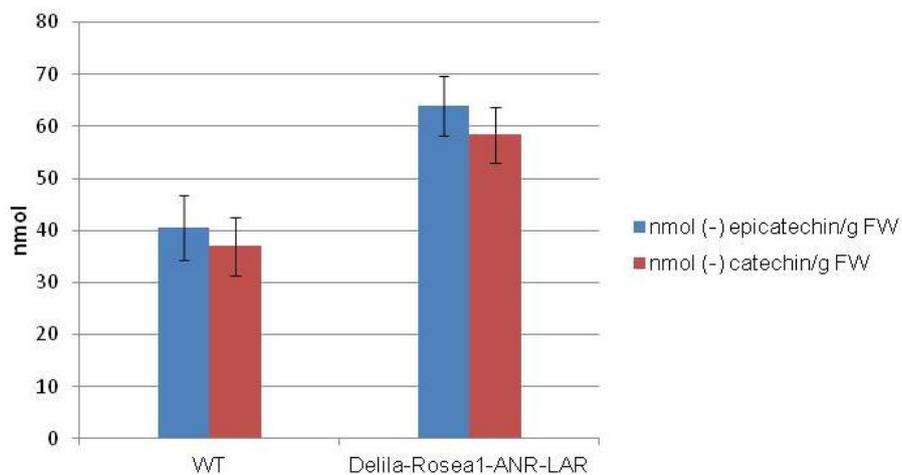
### 3.4.2. Detección de PAs en hojas de plantas transgénicas de *M. sativa*

Para detectar la presencia de PAs en plantas transgénicas *35S:Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* de *M. sativa* se realizó una reacción colorimétrica específica para flavanoles con DMACA y un ensayo colorimétrico selectivo para PAs, reacción Bate-Smith (Bate-Smith *et al.* 1954), (Materiales y métodos, apartado 5.1.6.3).

El ensayo DMACA mostró que tanto en el extracto de plantas procedentes de hojas no transformadas (control negativo) como en los de la línea transgénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* (1.2), se detectan bajas concentraciones de equivalentes de epicatequina y catequina (Tabla 28 y Figura 111). Esto puede ser debido a una posible interferencia de los componentes de la pared celular con las PAs (Marles *et al.* 2003). Por ello, fue necesario complementar este ensayo con la reacción de Bate-Smith debido a que se usa ampliamente como ensayo diagnóstico ya que es selectivo para los taninos condensados (PAs). Las muestras fueron comparadas con el control negativo donde no hubo coloración y con un control positivo de té verde que mostró la coloración típica que se produce tras la reacción de Bate-Smith ante la presencia de PAs (Figura 112). Este ensayo corroboró la ausencia de PAs en los extractos de hojas de las líneas transgénicas ensayadas.

Muestras	nmol (-) epicatechin/g FW	nmol (-) catechin/g FW
WT	40,56 ± 8,67 a	37,02 ± 7,92 a
<i>DELILA-ROSEA1-MtANR-MtLAR</i>	63,93 ± 8,12 b	58,35 ± 7,41 b

**Tabla 28. Cuantificación de PAs en extractos de hojas y tallos de *M. sativa* por reacción colorimétrica DMACA.** Los datos representan la media de tres repeticiones, ± el error estándar de los datos para cada muestra. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 111. Niveles de PAs en extractos de hojas y tallos de *M. sativa* por reacción colorimétrica DMACA.**



**Figura 112. Reacción de Bate-Smith en una línea transgénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* de alfalfa.** La reacción de Bate-Smith corrobora la ausencia de PAs en los extractos de hoja y tallos de una línea transgénica de alfalfa (1.2). El control positivo (té verde) mostró una coloración anaranjada en la reacción mientras que en la línea transgénica y en el control negativo no apareció dicha coloración.

En definitiva, la caracterización de las plantas transgénicas *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* de alfalfa exhiben una baja expresión de los cuatro transgenes (*Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR*), y no se detecta la presencia de PAs en las mismas mediante la metodología utilizada con anterioridad para el análisis de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco.



---

# **CAPÍTULO III**

---

## **DISCUSIÓN**

---



La modificación genética de diversas rutas metabólicas secundarias para producir productos naturales deseables ha sido un enfoque atractivo en biotecnología vegetal en los últimos años (Du *et al.* 2010). El uso de la ingeniería genética y la ingeniería metabólica para manipular la biosíntesis de proantocianidinas (PAs o taninos condensados, TCs) podría ser un gran paso hacia la producción de PAs en tejidos foliares de leguminosas forrajeras como la alfalfa (*M. sativa*). A pesar de que la alfalfa es la leguminosa forrajera más cultivada debido a su elevado contenido en proteína, carece de PAs en hojas y tallos (Liu *et al.* 2014). Se sabe que el consumo de cantidades pequeñas o moderadas de PAs puede mejorar la utilización digestiva debido a una reducción de la degradación de proteínas en el rumen y, en consecuencia, a una mayor disponibilidad de aminoácidos susceptibles de ser absorbidos en el intestino delgado. También se ha comprobado que la presencia de cantidades discretas de PAs en el forraje disminuye los efectos de la acumulación de gases de efecto invernadero en el rumen (meteorismo) que produce numerosas muertes por asfixia entre el ganado rumiante. Estos efectos sobre la nutrición se ven reflejados en el rendimiento productivo de los animales (Frutos *et al.* 2004).

En este trabajo hemos realizado una construcción multigénica usando el sistema modular GOLDENBRAID 2.0 (35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*) con el objetivo de producir PAs en las partes aéreas de la leguminosa forrajera alfalfa. Esta construcción permitió la expresión constitutiva de 4 genes. Dos de ellos son los factores transcripcionales de *Antirrhinum majus*, *Delila* (de tipo bHLH) y *Rosea1* (de tipo MYB), (Schwinn *et al.* 2006). En plantas, los TFs de tipo bHLH y la familia de TFs de tipo MYB juegan importantes roles en la regulación del metabolismo secundario de plantas como es el caso de la ruta de biosíntesis de antocianinas (Du *et al.* 2013; Du *et al.* 2012; Dubos *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2013). Se ha demostrado la funcionalidad de *Delila* y *Rosea1* en la activación de la expresión de los genes que codifican las enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de flavonoides y por tanto, en la acumulación de altos niveles antocianinas en frutos de tomate transgénicos (Butelli *et al.* 2008). Estos TFs no se han usado para este fin mediante transformación estable en ninguna otra especie vegetal (incluyendo leguminosas), por lo cual podría ser validado su uso en alfalfa para comprobar si esta especie es capaz de inducir la síntesis *de novo* de antocianinas. Los otros dos genes incluidos en la construcción multigénica son los genes *MtANR* (Xie *et al.* 2004) y *MtLAR* de *M. truncatula*. La incorporación de estas enzimas en la construcción multigénica permitiría la expresión constitutiva de las mismas, que convertirían sus correspondientes sustratos

intermediarios en los monómeros de las PAs: epicatequina y catequina, respectivamente.

## **1. Validación funcional de la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *N. benthamiana***

La funcionalidad de la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* fue probada preliminarmente mediante su expresión transitoria en *N. benthamiana*. También se usaron otras tres construcciones distintas combinando los dos factores de transcripción *Delila* y *Rosea1* (35S::*Delila-Rosea1*), y los dos genes que codifican las dos enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de PAs (35S::*Delila-Rosea1-MtANR*; 35S::*Delila-Rosea1-MtLAR*).

De esta manera comprobamos que los transgenes se expresaban constitutivamente y que esto conducía a la activación de la expresión de los genes que codifican algunas de las enzimas de la ruta de biosíntesis de antocianinas en *N. benthamiana* (*NbCHS*, *NbCHI*, *NbF3'H*, *NbDFR* y *NbANS*) produciendo una pigmentación púrpura en la zona de las hojas donde habían sido infiltradas.

Además, la detección de PAs mediante análisis de DMACA y HPLC, mostró que las plantas agroinfiltradas producían PAs, detectándose los máximos valores en las plantas agroinfiltradas con la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*. Este resultado preliminar nos llevó a usar esta construcción en transformación estable, primero de las plantas modelo *Arabidopsis* y tabaco, y finalmente en alfafa.

## **2. La capacidad de integración de los transgenes de la construcción 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* así como sus niveles de expresión varía según la especie**

Una vez demostrada la funcionalidad de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR MtLAR* mediante expresión transitoria en *N. benthamiana* pasamos a validar esta construcción mediante transformación estable en *A. thaliana*, *N. tabacum* y *M. sativa*.

Uno de los aspectos que se evaluaron en las plantas transgénicas fue la capacidad de integración de los cuatro transgenes que portaba la construcción multigénica

35S::Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR. Este análisis se llevó a cabo debido a que actualmente se carece de información sobre el uso de construcciones multigénicas realizadas mediante el sistema modular de clonaje GOLDENBRAID 2.0 en transformación estable. Sólo se ha reportado su uso en expresión transitoria (Sarión-Perdigones *et al.* 2011; 2013; 2014).

En *A. thaliana* se produjo la inserción de los cuatro transgenes que porta la construcción multigénica en el 100% de las plantas analizadas, considerando que una de ellas, al no tener ninguna inserción de los cuatro transgenes, fuese un escape. En *N. tabacum* la inserción completa se produjo en el 60% de las plantas analizadas, mientras que en alfalfa lo hizo en el 30,7 % de las plantas transgénicas. Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre la capacidad de integración de la totalidad de los transgenes de la construcción multigénica y la especie en cuestión.

Durante el proceso de integración del T-DNA se suelen producir deleciones, inversiones o duplicaciones de éste (Binns 1988; Zambryski 1988). Se han realizado estudios donde se demuestra la relación entre la especie y la pérdida de transgenes tras la inserción del T-DNA. Por ejemplo, el gen *nptII* mostró diferentes niveles de deleción, siendo del 12% en tabaco, del 30% en sandía y del 60 % en zanahoria (Kim 1998). Estos resultados no son de extrañar teniendo en cuenta que la integración del T-DNA es un proceso complejo que puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, dependiendo de la condición real del genoma del huésped, especialmente a nivel local, y requiere de la participación de diferentes factores. La integración del T-DNA en el genoma huésped depende totalmente del sistema de recombinación/mecanismo de reparación endógena de las plantas (Gheysen *et al.* 1991; Mayerhofer *et al.* 1991; Ziemienowicz A 2008). También están implicados en este proceso otros factores relacionados con el huésped, como la estructura de la cromatina, que afecta a la accesibilidad del genoma para la integración de las moléculas de T-DNA. Se ha descrito que genes que codifican proteínas estructurales de la cromatina (histonas), así como proteínas que modifican a éstas, están involucrados en la integración del T-DNA. A pesar de que la integración del T-DNA se ha estudiado y se han llevado a cabo infinidad de ellas en las últimas décadas, muchos aspectos de este proceso siguen siendo oscuros (Ziemienowicz *et al.* 2008). Por otro lado, los análisis de las secuencias de inserción del T-DNA y de su respectivo sitio de pre-inserción en el genoma de la planta, han revelado que el borde izquierdo (LB) está menos conservado que el borde derecho (RB). Se han realizado estudios donde se muestra que frecuentemente se producen inserciones aberrantes del T-DNA, que en la gran

mayoría de los casos se truncan desde el borde izquierdo (Mayerhofer *et al.* 1991; Tinly *et al.* 1995). En algunos casos se eliminan secuencias de hasta 3 kb (Jorgensen 1987).

En la construcción *35S::Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* los transgenes más cercanos a los bordes del T-DNA son el gen que confiere resistencia a higromicina (Hph) (borde izquierdo) y el gen *MtLAR* (borde derecho) (Figura 86). En *N. tabacum*, se produjo siempre la deleción de *MtLAR*, situado al lado del borde derecho (Figura 86). En *M. sativa*, todas las plantas analizadas son resistentes a higromicina y nuestros análisis confirman la presencia del gen que confiere la resistencia a este antibiótico. Las plantas *35S::Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* tienden a perder los transgenes por pares: o pierden *Delila* y *Rosea1*, situados cerca del borde izquierdo (Figura 106 y Figura 86) (plantas 19.1, 13.1, 15.1 y 26.1), o pierden *MtANR* y *MtLAR* (situados ceca del borde derecho) (plantas 2.1, 6.1, 9.2, 17.1 y 23.1). Se observa casi la misma probabilidad de deleción de una pareja de transgenes que de otros. Nunca se observó la pérdida de transgenes alternos. Este patrón de deleción de los transgenes no parece concordar con lo que refiere la literatura especializada a este respecto.

Otro de los aspectos evaluados fue la comparación entre la capacidad de expresión de los transgenes *Delila*, *Rosea1*, *MtANR* y *MtLAR* entre las tres especies estudiadas. La expresión de cada uno de estos genes está dirigida por una copia del promotor del gen 35 S del mosaico del visrus de la coliflor (CaMV) (p35S). La información de la literatura indica que existen diferentes variantes del p35S usadas por los biotecnólogos de plantas. Estas variantes comprenden secuencias entre -1327 y +45 pb y -300 hasta +8 (relativos a la posición del 5' CAP) (Podevin 2012). El módulo usado en la construcción multigénica correspondiente al p35S está constituido por 1027 pb del mismo, siendo esta secuencia prácticamente la secuencia completa del promotor.

Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de los cuatro transgenes dirigidos por el p35S, varió entre las especies analizadas cuando se usa la construcción multigénica. Las líneas de *A. thaliana* presentaron niveles de expresión de los transgenes hasta 12 veces mayores que los de *M. sativa*, siendo hasta 10 veces mayor en *N. tabacum* que en alfalfa (Figura 109). El promotor 35S es un promotor constitutivo muy fuerte responsable de la transcripción de todo el genoma del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Benfey y Chua 1990) y es bien conocido por

su uso en la transformación de plantas, causando altos niveles de expresión génica en plantas dicotiledóneas. Sin embargo, se pueden producir efectos variados de expresión como resultado de su interacción con factores ambientales y el estado fisiológico de la planta. La expresión génica dirigida por el promotor 35S también parece ser dependiente de la especie. Por ejemplo, se observaron altos niveles de expresión de GUS en el polen de plantas de fresa transgénica cuando se usó el promotor 35S, pero no se observó expresión del gen reportero en este tejido en plantas transgénicas de tomate o petunia con construcciones similares. Se han obtenido resultados parecidos en crisantemo, donde se observaron bajos niveles de expresión de GUS cuando su expresión la dirige el promotor 35S. Se sabe además que el promotor 35S difiere en eficacia en monocotiledóneas, especialmente en cereales (Dutt *et al.* 2014). Nuestros resultados apoyan estas observaciones previas, demostrando que existen diferencias entre la eficacia de funcionamiento del promotor p35S entre diferentes especies dicotiledóneas. Las diferencias en el comportamiento de este promotor entre diferentes especies se deben probablemente a diferencias en la calidad y/o cantidad de factores reguladores y diferencias de reconocimiento del complejo de iniciación de la transcripción entre especies. En el caso de construcciones multigénicas donde se usa el promotor 35S repetidamente, la limitación de factores reguladores a nivel local podría agravarse, traduciéndose en los bajos niveles de expresión que se observan en los cuatro transgenes que porta la construcción multigénica en alfalfa. Sería por tanto interesante el estudio del uso de otros promotores constitutivos para la co-expresión de varios transgenes en esta especie.

Independientemente de las diferencias encontradas entre especies en el porcentaje de plantas que portan los cuatro transgenes de la construcción multigénica y del patrón de delección de estos en tabaco y alfalfa, el uso de construcciones multigénicas mediante GOLDENBRAID 2.0 es viable para la transformación estable de plantas. De esta manera, es posible por tanto la co-expresión de varios transgenes, indicando que este sistema es apropiado para modificar caracteres poligénicos en un amplio rango de especies vegetales.

### 3. Diferencias en la activación de la ruta de biosíntesis de antocianinas y PAs entre *A. thaliana*, *N. tabacum* y *M. sativa*

Por otro lado, evaluamos si los factores de transcripción *Delila* y *Rosea1*, eran capaces de activar la ruta de biosíntesis de flavonoides en las diferentes especies, con la consecuente producción de antocianinas.

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* mostraron una pigmentación púrpura que está presumiblemente asociada a la acumulación de antocianinas. La mayoría de las plantas transgénicas presentaban esta coloración en el peciolo de las hojas y en el tallo. Dos de ellas, presentaron pigmentación en todos los tejidos de la planta, pero no se desarrollaron correctamente y finalmente murieron. Esto podría ser debido a que las células transportan y almacenan la excesiva producción de antocianinas en las vacuolas. Este hecho, unido a que la capacidad de almacenaje de estas vacuolas es limitada y a que la producción de antocianinas es constitutiva y no se limita a determinados órganos de la planta, produce toxicidad debida a su excesiva acumulación en las células, lo que se traduce en un retraso en el desarrollo de la planta e incluso en su muerte (Kitamura *et al.* 2006). En *N. tabacum*, la mayoría de las plantas transgénicas presentó pigmentación púrpura en todos los tejidos vegetativos y reproductivos, observándose una mayor acumulación en el envés de las hojas y en los tejidos vasculares, siendo casi total la coloración púrpura en una de ellas. Aquella planta que presentó una coloración casi completa, presentó retraso en su desarrollo vegetativo debido probablemente a la toxicidad generada por dicha acumulación. En cambio, las plantas transgénicas de *M. sativa* no presentaron pigmentación púrpura en ninguno de sus tejidos. Con estos resultados, decidimos evaluar si se inducían los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de flavonoides tras la expresión de los transgenes en *N. tabacum* y *M. sativa*.

Nuestros resultados muestran que la expresión de los genes que codifican las enzimas CHS, CHI, F3'H, DFR1 y ANS, se inducen en *N. tabacum*. También, muestran como variaron los niveles de expresión entre las líneas analizadas cuando se usa la construcción multigénica. Estos indican que existe una correlación entre los niveles de expresión de los transgenes *Delila* y *Rosea1* y la expresión de los genes implicados en dicha ruta. Sin embargo, en alfalfa la expresión constitutiva de estos TFs no fue capaz de inducir la expresión de dichos genes. Los TFs de Antirrhinum, *Delila* y *Rosea1*, son capaces de reconocer elementos reguladores en *cis* presentes en los

promotores de los genes que en *N. benthamiana*, *Arabidopsis* y *N. tabacum* codifican las enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de antocianinas en cada una de estas especies. Sin embargo, estos TFs no resultaron funcionales en alfalfa, o alternativamente no fueron suficientes los niveles de expresión alcanzados por los mismos para activar esta ruta.

Los flavanoles, precursores de las PAs, comparten la misma ruta biosintética que las antocianinas en la ruta de biosíntesis de flavonoides (Zhou *et al.* 2015). Los flavanoles incluyen 2,3-*trans*-flavanoles y 2,3-*cis*-flavanoles que se sintetizan en dos ramas distintas de la ruta, a partir de dos sustratos diferentes sintetizados por dos enzimas (Tian *et al.* 2008). La conversión de leucoantocianina a 2,3-*trans*-flavanoles (catequina) por la leucoantocianina reductasa (LAR) y la conversión de leucoantocianina a 2,3-*cis*-flavanoles (epicatequinas) por la acción de la antocianidina sintasa (ANS) y de la antocianidina reductasa (ANR) (Tian *et al.* 2008).

En leguminosas forrajeras, la presencia de PAs tiene efectos tanto positivos como negativos sobre la digestibilidad del alimento y en el rendimiento de los animales. La concentración y la estructura de las PAs afecta fuertemente a la palatabilidad y al valor nutricional de las leguminosas forrajeras (Barry y McNabb 1999), siendo del orden de 20-45 g/kg o del 2-4,5 % de peso seco las cantidades idóneas. Por ello, la cuantificación de compuestos fenólicos solubles y de PAs en plantas forrajeras es esencial para el estudio sobre sus efectos nutricionales.

Durante las últimas décadas, se ha desarrollado una amplia selección de técnicas de análisis para poder cuantificar las PAs de manera eficiente, incluyendo la polimerización oxidativa, reacciones del anillo A de los flavonoides con un aldehído aromático, reacciones de oxidación-reducción, reacción de escisión por ácidos, reacciones de precipitación, inhibiciones enzimáticas y análisis gravimétricos (Schofield *et al.* 2001). Se han utilizado distintos métodos colorimétricos, una reacción colorimétrica específica para flavanoles con DMACA y un ensayo selectivo para PAs como es Bate-Smith. Además, el análisis por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas es el método idóneo para obtener información composicional de PAs.

Usando tres de estos métodos evaluamos si la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* da lugar a la producción de PAs en las hojas transformadas de *N. tabacum*. Para ello, se realizó una reacción DMACA, una reacción Bate-Smith y un análisis por HPLC. Nuestros resultados muestran que la

producción de PAs varió entre las líneas analizadas, siendo mayor en aquella planta que presentaba mayor pigmentación púrpura que se asocia a la acumulación de antocianinas. Es presumible que la presencia de PAs en *N. tabacum* se deba a la acción enzimática de *MtANR* y *MtLAR*, siendo capaces de convertir sus pertinentes sustratos intermediarios en PAs. Nuestros resultados indican que existe una correlación entre los niveles de expresión de *Delila* y *Rosea1*, la activación e incremento de la expresión de los genes que codifican las enzimas que integran la ruta de biosíntesis de flavonoides, la acumulación de antocianinas y la producción de PAs. Sin embargo, la cantidad de PAs producidas en tabaco es relativamente baja (3,48 g/kg), teniendo en cuenta los valores mínimos requeridos para su uso en la mejora de la digestibilidad del forraje. En *N. tabacum*, se producen elevados niveles de antocianidinas, que en algunos casos resultan tóxicas inhibiendo el desarrollo vegetativo de las plantas. Sin embargo, las enzimas *MtANR* y *MtLAR* no son capaces de convertir sus precursores en suficiente cantidad de los monómeros de las PAs: catequina y epicatequina. Nuestros datos muestran que existe una relación entre los niveles de antocianidinas y los de PAs. Sin embargo, los bajos niveles de PAs generados, se producen sólo en aquellas plantas donde los niveles de antocianinas llegan incluso a ser perjudiciales en el desarrollo vegetativo de la planta. Esto indica que no parece viable el uso de esta construcción multigénica para generar plantas de *N. tabacum* que produzcan PAs sin que los de antocianinas superen la capacidad de almacenaje de estas por las vacuolas, provocando toxicidad en las plantas.

La reacción DMACA, Bate-Smith y el análisis por HPLC en alfalfa corroboraron la ausencia de PAs en los extractos de hojas de las líneas transgénicas de alfalfa, que es lo esperable ante la ausencia de pigmentos antociánicos y la no activación de los genes que en alfalfa están presumiblemente implicados en la ruta de biosíntesis de antocianinas. Estos resultados indican que la construcción *35S::Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* no es una buena herramienta biotecnológica que procure la activación de la ruta de biosíntesis de PAs en la alfalfa, y con ello un aumento de su valor nutricional.

**4. La elucidación de los mecanismos moleculares que determinan la especificidad de regulación de la ruta de biosíntesis de PAs en alfalfa, es un requisito previo para la manipulación de la misma mediante ingeniería genética.**

Los factores de transcripción (TFs) regulan la expresión génica a través de la unión específica a los elementos que actúan en *cis* en los promotores de los genes diana (Zhou *et al.* 2011). Las proteínas reguladoras que controlan la acumulación de antocianinas y PAs se han caracterizado en diversas especies (Lepiniec *et al.* 2006). La mayoría de éstos pertenecen a una de las dos familias más grandes de proteínas reguladoras en plantas: las familia de TFs de tipo MYB y la de tipo bHLH (Lepiniec *et al.* 2006). Además, algunas proteínas con repeticiones "WD40" (WDR) también están implicadas en la biosíntesis de antocianinas (Lepiniec *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2015).

Se han realizado experimentos donde se han sobrepresado diversos TFs en especies de leguminosas con el objetivo de producir PAs. Por ejemplo, la sobreexpresión del TF de tipo MYB *Lc* de maíz en alfalfa (*M. sativa*) dió lugar a la acumulación de antocianinas y PAs. Sin embargo, se observó que sólo se producía bajo condiciones de estrés (Bovy *et al.* 2002; Ray *et al.* 2003). El TF de tipo R2R3-MYB, *MtPAR* de *Medicago truncatula*, regula la biosíntesis de PAs en las semillas de *M. truncatula* (Verdier *et al.* 2012). La expresión constitutiva de este gen permitió la acumulación de PAs en raíces y unos niveles bajos pero detectables en brotes de *Medicago sativa* (Verdier *et al.* 2012). Recientemente, se ha demostrado que una familia de TFs de tipo R2R3-MYB contribuye a las manchas antociánicas presentes en las hojas del género *Trifolium* (Albert *et al.* 2015). En *M. truncatula*, el complejo formado por la interacción de dos TFs de tipo MYB, *MtMYB5* y *MtMYB14*, activa los promotores de *MtANR* y *MtLAR*, en presencia de *MtTT8* y *MtWD40-1* (Liu *et al.* 2014). La expresión ectópica del TF *FaMYB1* de fresa, en *Lotus corniculatus* reprime la biosíntesis de PAs, que puede contrarrestar la actividad del complejo transcripcional endógeno MBW (MYB-bHLH-WD40), (Paolucci *et al.* 2011). Estos datos sugieren que el mecanismo de la regulación transcripcional de las antocianinas y PAs en leguminosas es complejo. Sin embargo, recientemente, un TF de tipo R2R3-MYB, *TaMYB14*, fue aislado de la leguminosa *Trifolium arvense*, una de las pocas especies de *Trifolium* que dentro de las 255 especies existentes acumulan PAs en su tejido foliar (Jones 1977). A pesar de que se ha descrito que para regular la biosíntesis de PA, es necesario la formación de complejos que involucran a factores

transcripcionales de tipo bHLH, MYB y proteínas WD40 (Baudry *et al.* 2004; Hichri *et al.* 2011; Yoshida *et al.* 2008), la sobreexpresión de *TaMYB14* produce la acumulación ectópica de PAs en tejidos de las hojas de *N. tabacum*, *M. sativa*, y *Trifolium* sin la necesidad de la co-expresión de factores adicionales (Hancock *et al.* 2012). La cuantificación de PAs solubles en hojas usando el método de butanol-HCl mostró que la acumulación de PAs se producía en un rango de entre el 0.1% y 1.0% del peso seco (Hancock *et al.* 2012), valores que quedan por debajo de los requeridos para subsanar el desorden digestivo del ganado bovino.

Los estudios realizados hasta el momento han permitido una representación más detallada de la formación de las PAs en plantas, y han señalado que es una ruta de regulación bastante más compleja comparada con la biosíntesis de antocianinas. Quizás por ello, no se han producido grandes avances en la aplicación del aumento del contenido de PAs en los tejidos foliares de leguminosas de importancia económica como la alfalfa (*M. sativa*). Los intentos para inducir la biosíntesis de PAs en plantas forrajeras mediante la sobreexpresión de TFs sólo o genes que codifican enzimas de la ruta, han tenido éxitos muy limitados (Zhou *et al.* 2015).

La estrategia diseñada en este trabajo para tratar de activar *de novo* la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas en la alfalfa no ha sido efectiva. Los factores transcripcionales heterólogos *Delila* (bHLH) y *Rosea1* (MYB), no son probablemente capaces de reconocer a los elementos que actúan en *cis* en los promotores de los genes diana, que en *M. sativa* participan en la producción de antocianinas o PAs, o alternativamente, la expresión de estos TFs en esta especie dirigida por el promotor 35S fue insuficiente para este fin. Sin embargo, en *N. tabacum* estos mismos TFs fueron capaces de activar los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de antocianinas. Esto sugiere que el potencial de activación de los TFs en la regulación de la síntesis de antocianinas y PAs podría ser específico según la especie utilizada.

Por tanto, el descubrimiento de nuevos TFs y su funcionalidad en leguminosas sigue siendo muy importante para explorar el mecanismo de regulación de la biosíntesis de proantocianidinas. Dentro de las especies forrajeras más importantes se encuentran *M. sativa* y *Trifolium spp.* Estas especies difieren entre sí, entre otros aspectos, por el contenido de PAs en sus hojas (Zhou *et al.* 2015). La alfalfa no produce PAs en sus órganos vegetativos, estando limitada su síntesis a la cubierta de la semilla, mientras que existen variedades de *Trifolium* donde éstas sí se producen y

se acumulan en hojas y tallos. Podría ser interesante determinar la variación genética que determina este rasgo diferencial entre estas especies forrajeras. El análisis de co-expresión de conjuntos de datos transcriptómicos de cada especie podría ser una herramienta poderosa para explorar TFs desconocidos o genes que codifican enzimas desconocidas especializados/as en la ruta de biosíntesis de antocianinas y PAs. Por otro lado, la identificación de proteínas interactuantes con estos TFs podría proporcionar una comprensión más amplia y profunda de la red de regulación de la ruta de las PAs.

En todo caso, pensamos que aunque se han hecho algunos avances en este campo, es aún necesario la elucidación de los mecanismos moleculares que determinan la especificidad de regulación de la ruta de biosíntesis de PAs en alfalfa para la manipulación de la misma mediante ingeniería genética. Llegado el momento, en caso de que fuese necesaria la co-expresión de varios genes tales como TFs, proteínas de tipo WD40 o enzimas específicas de la ruta de interés, la utilización de construcciones multigénicas usando el sistema de clonaje por módulos GoldeBraid 2.0, permitiría generar fácilmente diversas combinaciones de transgenes útiles para activar dicha vía metabólica en esta leguminosa forrajera. El uso de construcciones multigénicas para incorporar de forma estable la maquinaria necesaria para la producción de PAs en la alfalfa podría ser un sistema novedoso que no se ha usado hasta la fecha, y que evitaría la utilización de procesos iterativos para introducir los distintos transgenes en la planta, tales como rondas sucesivas de cruces entre diferentes líneas transgénicas o la transformación secuencial de plantas transgénicas con transgenes adicionales.



---

# **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

**PRIMERA:** Hemos puesto a punto un protocolo de transformación genética estable mediada por *Agrobacterium tumefaciens* vía embriogénesis somática, aplicable a dos genotipos de alfalfa (*Medicago sativa* L.): RSY27 y RSY4D. Aproximadamente el 50 % de los explantes inoculados produjeron embriones maduros viables que se desarrollaron en plantas completas. El 80-100% de las plantas que se obtuvieron de esos embriones contenían el T-DNA con la totalidad de los transgenes introducidos. La disponibilidad de este protocolo permitió llevar a cabo los otros dos objetivos propuestos y dotar de una herramienta eficaz a la comunidad científica para la introducción de nuevos transgenes en esta especie.

**SEGUNDA:** La expresión constitutiva del gen *MstFL1a* de alfalfa modifica el tiempo de floración y la arquitectura de la planta en *Arabidopsis thaliana*. La sobreexpresión de su parálogo, *MstFL1c*, en esta especie no mostró cambios fenotípicos significativos. Estas diferencias podrían explicarse por las diferentes afinidades de ambos parálogos por la proteína FD en el meristemo inflorescente en *A. thaliana*. Estos resultados sugieren que la función biológica de *MstFL1a* en alfalfa está conservada respecto a la del gen *TFL1* de *A. thaliana* y que *MstFL1a* y *MstFL1c* podrían haber divergido funcionalmente. La posible divergencia funcional de estos parálogos sólo podrá conocerse tras un estudio funcional completo de ambos genes en *M. sativa*.

**TERCERA:** La expresión constitutiva de *MstFL1a* en alfalfa produce un retraso de la floración, indicando que *MstFL1a* podría tener una función análoga en *M. sativa* a la de *TFL1* en *Arabidopsis*. Sin embargo, este fenotipo en alfalfa no se asocia con un incremento del desarrollo vegetativo, sino con una reducción del tamaño de la planta vinculado a una limitación en la proliferación celular, dando lugar a una disminución de la biomasa. La validación completa del uso de este gen como herramienta biotecnológica requerirá la evaluación de otros parámetros que influyen en la calidad del forraje para determinar si la reducción del tamaño se ve compensada por una mejor digestibilidad del mismo.

**CUARTA:** La limitación en la proliferación celular en las plantas 35S::*MsTFL1a* se asocia a una reducción en los niveles de expresión de determinados genes efectores de la división celular, como es el caso de las ciclinas. Estos resultados sugieren que en alfalfa, la función bien establecida de *TFL1* y sus ortólogos en el control del tiempo de floración, podría conciliarse con una posible función en la regulación del crecimiento de la planta. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los genes *TFL1*-like podrían participar además en vías de señalización que regulan la diferenciación celular en plantas. En este sentido, *M. sativa* podría ser un buen modelo para estudiar la posible gama de diversificación bioquímica de estas proteínas.

**QUINTA:** Hemos realizado la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* usando el sistema modular GOLDENBRAID 2.0 para intentar activar *de novo* la biosíntesis de proantocianidinas (PAs) en la alfalfa. La capacidad de inducir PAs por esta construcción multigénica ha sido validada funcionalmente con éxito en *Nicotiana benthamiana* mediante expresión transitoria.

**SEXTA:** Se ha evaluado la capacidad de integración y de expresión de los transgenes de esta construcción multigénica mediante transformación estable en tres sistemas: *A. thaliana*, *N. tabacum* y *M. sativa*. La transformación estable de estas especies con la construcción multigénica 35S::*Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* mostró que existe una relación entre la capacidad de integración de la totalidad de los transgenes y la eficacia de funcionamiento del promotor CaMV35S según la especie utilizada. Independientemente de estas diferencias, el uso de construcciones multigénicas mediante GOLDENBRAID 2.0 es viable para la transformación estable de plantas, indicando que este sistema es apropiado para modificar caracteres poligénicos en un amplio rango de especies.

**SÉPTIMA:** La construcción multigénica 35S::*Delila::Rosea1::MtANR::MtLAR* es capaz de activar la ruta de biosíntesis de antocianinas y de PAs en *N. tabacum*. Sin embargo, no fue capaz de activar la ruta de biosíntesis de antocianinas, y por tanto la de PAs, en alfalfa. Los factores transcripcionales *Delila* y *Rosea1* no son capaces de activar los genes implicados en la regulación de ambas vías metabólicas en esta especie, o alternativamente no fueron suficiente sus niveles de expresión para este fin. Por tanto, la construcción multigénica 35S::*Delila::Rosea1::MtANR::MtLAR* no es una buena herramienta biotecnológica que procure la activación de la ruta de biosíntesis de PAs en la alfalfa.

**OCTAVA:** Nuestros resultados sugieren que los mecanismos de control transcripcional de la biosíntesis de antocianinas y PAs pueden ser diferentes entre las distintas especies y que se necesita información genética adicional específica de la biosíntesis de flavonoides en leguminosas para poder elaborar herramientas moleculares eficientes que puedan activar su biosíntesis *de novo*.



---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. and Araki, T.** (2005) *FD*, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science*, **309**, 1052-1056.
- Aebersold, R. and Mann, M.** (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**, 198-207.
- Aerts, R.J., Barry, T.N. and McNabb, W.C.** (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **75**, 1-12.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L. and Weigel, D.** (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *Embo J*, **25**, 605-614.
- Al-Mulla, F., Bitar, M.S., Taqi, Z. and Yeung, K.C.** (2013) *RKIP*: much more than Raf kinase inhibitory protein. *J Cell Physiol*, **228**, 1688-1702.
- Albert, N.W., Griffiths, A.G., Cousins, G.R., Verry, I.M. and Williams, W.M.** (2015) Anthocyanin leaf markings are regulated by a family of *R2R3-MYB* genes in the genus *Trifolium*. *New Phytologist*, **205**, 882-893.
- Alvarez, J., Guli, C.L., Yu, X.-H. and Smyth, D.R.** (1992) *Terminal flower*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **2**, 103-116.
- Allen, O.N. and Allen, E.K.** (1981) *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation* London; Macmillan Publishers Ltd.; Madison, Wisconsin, USA: University of Wisconsin Press.
- Amasino, R.M. and Michaels, S.D.** (2010) The timing of flowering. *Plant Physiol*, **154**, 516-520.
- Amaya, I., Ratcliffe, O.J. and Bradley, D.J.** (1999) Expression of *CENTRORADIALIS* (*CEN*) and *CEN*-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell*, **11**, 1405-1418.
- Anderson, J.W., Story, L., Sieling, B., Chen, W.J., Petro, M.S. and Story, J.** (1984) Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, **40**, 1146-1155.
- Atif R.M., PO E., Svabova L., Ondrej V., Klenoticova H., Jacas L., Griga M. and Ochatt S.J.** (2013) Gene transfer in legumes. *Progress in Botany* **74**: 37-100.
- Austin S, B.E., Mathews DE, Shahan MN, Will J, Burgess RR** (1995) Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica*, 381-393.
- Bagga, S., Potenza, C., Ross, J., Martin, M., Leustek, T. and Sengupta-Gopalan, C.** (2005) A transgene for high methionine protein is posttranscriptionally regulated by methionine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **41**, 731-741.
- Banfield, M.J. and Brady, R.L.** (2000) The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J Mol Biol*, **297**, 1159-1170.
- Barry, T.N. and McNabb, W.C.** (1999) The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br J Nutr*, **81**, 263-272.
- Bate-Smith, E.C.** (1973) Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 907-912.
- Bate-Smith, E.C. and Lerner, N.H.** (1954) Leuco-anthocyanins. 2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves. *Biochem J*, **58**, 126-132.
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L.** (2004) *TT2*, *TT8*, and *TTG1* synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **39**, 366-380.

- Bechtold, N. and Pelletier, G.** (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, **82**, 259-266.
- Benfey, P.N. and Chua, N.H.** (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, **250**, 959-966.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. and Madueño, F.** (2007) Floral Initiation and Inflorescence Architecture: A Comparative View. *Ann Bot*, **100**, 659-676.
- Bingham, G.J.** (1991) Registration of Alfalfa Hybrid Regen-SY Germplasm for Tissue Culture and Transformation Research. *Crop Sciencie*.
- Binns, A.N.T., M.F.** (1988) Cell Biology of *Agrobacterium* Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology*, **Vol. 42: 575-606**.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C. and van Tunen, A.** (2002) High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*. *Plant Cell*, **14**, 2509-2526.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. and Coen, E.** (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, **275**, 80-83.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J. and Martin, C.** (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol*, **26**, 1301-1308.
- Calderini O, B.T., Scotti C, Pupilli F, Piano E, Arcioni S** (2007) Delay of leaf senescence in *Medicago sativa* transformed with the *ipt* gene controlled by the senescence-specific promoter SAG12. *Plant Cell Reports*, 611-615.
- Capell, T. and Christou, P.** (2004) Progress in plant metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*, **15**, 148-154.
- Carmona, M.J., Calonje, M. and Martinez-Zapater, J.M.** (2007) The *FT/TFL1* gene family in grapevine. *Plant Mol Biol*, **63**, 637-650.
- Conti, L. and Bradley, D.** (2007) *TERMINAL FLOWER1* Is a Mobile Signal Controlling *Arabidopsis* Architecture. *Plant Cell*, **19**, 767-778.
- Cook, D.R.** (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 301-304.
- Cosson, V., Durand, P., d'Erfurth, I., Kondorosi, A. and Ratet, P.** (2006) *Medicago truncatula* transformation using leaf explants. *Methods Mol Biol*, **343**, 115-127.
- Cosson, V., Eschstruth, A. and Ratet, P.** (2015) *Medicago truncatula* transformation using leaf explants. *Methods Mol Biol*, **1223**, 43-56.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J. and Coen, E.** (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, **18**, 215-222.
- Chabaud, M., Boisson-Dernier, A., E.-P., de Carvalho-Niebel, F. and Barker, D.G.** (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Medicago truncatula*. In *handbook of new Technologies for genetic Improvement of legumes.* , pp. 45-67.
- Chabaud M, R.P., de Sousa Araújo S, Roldão Lopes AS, Duque A, Harrison M, Barker DG** (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and in vitro plant regeneration of *M. truncatula*.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S. and Sundberg, B.** (2002) Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiol Plant*, **114**, 594-600.
- Chautard, H., Jacquet, M., Schoentgen, F., Bureaud, N. and Benedetti, H.** (2004) Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the *Ira2p* but not the *Ira1p* Ras

- GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **3**, 459-470.
- Cheng, X., Wen, J., Tadege, M., Ratet, P. and Mysore, K.S.** (2011) Reverse genetics in *Medicago truncatula* using *Tnt1* insertion mutants. *Methods Mol Biol*, **678**, 179-190.
- Cheyrier, V., Remy, S., Fulcrand, H.** (2000) Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. Rautz, J (Ed): 337-344.
- Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hulskamp, M., Inze, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Gwin, T., Churchman, J. and Larkin, J.C.** (2006) *SIAMESE*, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **18**, 3145-3157.
- Cotta, M.** (1984) Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria.; Milligan LP GW, Dobson A editor.
- Dafny-Yelin, M. and Tzfira, T.** (2007) Delivery of multiple transgenes to plant cells. *Plant Physiol*, **145**, 1118-1128.
- Datta, K., Baisakh, N., Thet, K.M., Tu, J. and Datta, S.K.** (2002) Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor Appl Genet*, **106**, 1-8.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M.** (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**: 853-871.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Merillon, J.M. and Hamdi, S.** (2006) Characterization of a grapevine *R2R3-MYB* transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol*, **140**, 499-511.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E.** (1999) The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J* **19**: 387-398.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A. A., Maughan, S. C., Menges, M.** (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14537-14542.
- Dirk, I.** (2007) Cell cycle and plant development.
- Dixon, R.A., Liu, C. and Jun, J.H.** (2012) Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Curr Opin Biotechnol*, **24**, 329-335.
- Dixon, R.A., Xie, D.Y. and Sharma, S.B.** (2005) Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*, **165**, 9-28.
- Doyle, J.J. and Luckow, M.A.** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol*, **131**, 900-910.
- Du, H., Huang, Y. and Tang, Y.** (2010) Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, **86**, 1293-1312.
- Du, H., Wang, Y.B., Xie, Y., Liang, Z., Jiang, S.J., Zhang, S.S., Huang, Y.B. and Tang, Y.X.** (2013) Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of MYB-related genes in ly plants. *DNA Res*, **20**, 437-448.
- Du, H., Yang, S.S., Liang, Z., Feng, B.R., Liu, L., Huang, Y.B. and Tang, Y.X.** (2012) Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biol*, **12**, 106.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L.** (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, **15**, 573-581.
- Dutt, M., Dhekney, S.A., Soriano, L., Kandel, R. and Grosser, J.W.** (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, **1**, 14047.

- Ellis, T.H., Turner, L., Hellens, R.P., Lee, D., Harker, C.L., Enard, C., Domoney, C. and Davies, D.R. (1992) Linkage maps in pea. *Genetics*, **130**, 649-663.
- Farre, G., Maiam Rivera, S., Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Canela, R., Naqvi, S., Sandmann, G., Capell, T., Zhu, C. and Christou, P. (2013) Targeted transcriptomic and metabolic profiling reveals temporal bottlenecks in the maize carotenoid pathway that may be addressed by multigene engineering. *Plant J*, **75**, 441-455.
- Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M.F. (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, **127**, 725-734.
- Fornara, F., de Montaigu, A. and Coupland, G. (2010) SnapShot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell*, **141**, 550, 550 e551-552.
- Foucher, F., Morin, J., Courtiade, J., Cadioux, S., Ellis, N., Banfield, M.J. and Rameau, C. (2003) *DETERMINATE* and *LATE FLOWERING* are two *TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS* homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell*, **15**, 2742-2754.
- Frame, J., Charlton, J.F.L. and Laidlaw, A.S. (1998) Temperate forage legumes Wallingford: CAB International.
- Frutos, P.H., G.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A.R. (2004) Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **91-202**..
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F. and Young, N.D. (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol*, **137**, 1228-1235.
- Gheysen, G., Villarroel, R. and Van Montagu, M. (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev*, **5**, 287-297.
- Gong, Z.Z., Yamagishi, E., Yamazaki, M. and Saito, K. (1999) A constitutively expressed Myc-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells. *Plant Mol Biol*, **41**, 33-44.
- Gonzalez, N., Vanhaeren, H., Inze, D. (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci* **17**: 332-340.
- Graham, P.H. and Vance, C.P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, **131**, 872-877.
- Grandy, D.K., Hanneman, E., Bunzow, J., Shih, M., Machida, C.A., Bidlack, J.M. and Civelli, O. (1990) Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol*, **4**, 1370-1376.
- Granovsky, A.E. and Rosner, M.R. (2008) Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res*, **18**, 452-457.
- Gronlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I.E. and Lund, O.S. (2008) Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus Res*, **135**, 345-349.
- Grotewold, E. (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 761-780.
- Grusak, M.A. (2002) Phytochemicals in plants: genomics-assisted plant improvement for nutritional and health benefits. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 508-511.
- Guo, X., Zhao, Z., Chen, J., Hu, X. and Luo, D. (2006) A putative *CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER 1*-like gene, *Ljcen1*, plays a role in phase transition in *Lotus japonicus*. *J Plant Physiol*, **163**, 436-444.
- Hagan, S., Garcia, R., Dhillon, A. and Kolch, W. (2006) Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymol*, **407**, 248-259.
- Halpin, C. (2005) Gene stacking in transgenic plants--the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol J*, **3**, 141-155.

- Halpin, C., Barakate, A., Askari, B., Abbott, J. and Ryan, M.** (2001) Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways. *Plant Molecular Biology*, **47**, 295-310.
- Hall, J.W., Walker, I. and Majak, W.** (1994) Evaluation of two supplements for the prevention of alfalfa bloat. *Can Vet J*, **35**, 702-705.
- Hanano, S. and Goto, K.** (2011) Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1* is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell*, **23**, 3172-3184.
- Hancock, K.R., Collette, V., Fraser, K., Greig, M., Xue, H., Richardson, K., Jones, C. and Rasmussen, S.** (2012) Expression of the *R2R3-MYB* transcription factor TaMYB14 from *Trifolium arvense* activates proanthocyanidin biosynthesis in the legumes *Trifolium repens* and *Medicago sativa*. *Plant Physiol*, **159**, 1204-1220.
- Hanzawa, Y., Money, T. and Bradley, D.** (2005) A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7748-7753.
- Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D. and Monard, D.** (2001) The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem*, **276**, 535-540.
- Hewit, E.J.** (1966) *En: Sy and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition* England.
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S. and Lauvergeat, V.** (2011) Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, **62**, 2465-2483.
- Hirsch, A.M.** (2004) Plant-microbe symbioses: A continuum from commensalism to parasitism: INT SCIENCE SERVICES/BALABAN PUBLISHERS.
- Hirt, H., Mink, M., Pfosser, M., Bogre, L., Gyorgyey, J.** (1992) Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell* 4: 1531-1538.
- Howarth, R.E.** (1975) A review of bloat in cattle. *Can Vet J* 16: 281-294.
- Howarth, R.E.** (1984) Wheat pasture bloat of stocker cattle: A comparison with legume pasture bloat.
- Howarth, R.E., Goplen, B.P., Fesser, A.C., Brandt, S.A.** (1978) A Possible Role for Leaf Cell Rupture in Legume Pasture Bloat. *Crop Science* 18: 129-133.
- Irish, V.F.** (2010) The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant J*, **61**, 1014-1028.
- Jensen, E. and Hauggaard-Nielsen, H.** (2003) How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, **252**, 177-186.
- Jiang, L., Yu, X., Qi, X., Yu, Q., Deng, S., Bai, B., Li, N., Zhang, A., Zhu, C., Liu, B. and Pang, J.** (2013) Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transgenic Res*, **22**, 1133-1142.
- Jobling, S.A., Westcott, R.J., Tayal, A., Jeffcoat, R. and Schwall, G.P.** (2002) Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat Biotechnol*, **20**, 295-299.
- Jones, D.A.** (1977) On the polymorphism of Cyanogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Heredity*, **39**, 27-44.
- Jorgensen, E.M., Garber, R.L.** (1987) Function and misfunction of the two promoters of the *Drosophila Antennapedia* gene. *Genes Dev.*, 544-555.
- Kalo, P., Seres, A., Taylor, S.A., Jakab, J., Kevei, Z., Kereszt, A., Endre, G., Ellis, T.H. and Kiss, G.B.** (2004) Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 235-246.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D.** (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, **286**, 1962-1965.

- Karlgren, A., Gyllenstrand, N., Clapham, D. and Lagercrantz, U. (2011) *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER1*-Like Genes Affect Growth Rhythm and Bud Set in Norway Spruce. *Plant Physiol*, **163**, 792-803.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., Angenent, G.C. and Riechmann, J.L. (2010) Orchestration of Floral Initiation by *APETALA1*. *Science*, **328**, 85-89.
- Kennedy, J.A. and Taylor, A.W. (2003) Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, **995**, 99-107.
- Kim, H., Seok Park, B., Park, Y. D. Jin, Y. M. (1998) Pollen ablation of transgenic tobacco plants by expression of the diphtheria toxin A-chain gene under the control of a putative pectin esterase promoter from Chinese cabbage. *Mol Cells*, **8**, 310-317.
- Kitamura, S. (2006) Transport of Flavonoids: From Cytosolic Synthesis to Vacuolar Accumulation. In *The Science of Flavonoids*: Springer New York, pp. 123-146.
- Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F. (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* **10**: 236-242.
- Lallana, V. (1999) Medición del área foliar mediante escáner and software *IDRISI: FAVE*.
- Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leple, J.C., Boerjan, W., Ferret, V.V., De Nadai, V. and Jouanin, L. (1999) Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*, **119**, 153-164.
- Laucou, V., Haurogné, K., Ellis, N. and Rameau, C. (1998) Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 905-915.
- Lazo G.R., S.P.A., Ludwig R.A. (1991) A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology*, 963-967.
- Lee, J.M., Grant, D., Vallejos, C.E. and Shoemaker, R.C. (2001) Genome organization in dicots. II. Arabidopsis as a bridging species to resolve genome evolution events among legumes. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**, 765-773.
- Lees, G.L. (1992) Condensed tannins in some forage legumes: their role in the prevention of ruminant pasture bloat. *Basic Life Sci*, **59**, 915-934.
- Lees, G.L., Howarth, R.E., Goplen, B.P., Fesser, A.C. (1981) Mechanical Disruption of Leaf Tissues and Cells in Some Bloat-Causing and Bloat-Safe Forage Legumes. *Crop Science* **21**: 444-448.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 405-430.
- Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T.C., Hanke, M.V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hoffmann, T. and Szankowski, I. (2007) Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta*, **226**, 1243-1254.
- Li, Y.-G., Tanner, G. and Larkin, P. (1996) The DMACA-HCl Protocol and the Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**, 89-101.
- Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F. (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell*, **11**, 1007-1018.

- Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling, T. and Geurts, R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot*, **55**, 983-992.
- Liu, C., Jun, J.H. and Dixon, R.A. (2014) MYB5 and MYB14 Play Pivotal Roles in Seed Coat Polymer Biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **165**, 1424-1439.
- Lu, L., Sui, M.L. and Lu, K. (2000) Superplastic Extensibility of Nanocrystalline Copper at Room Temperature. *Science*, **287**, 1463-1466.
- Luttge U., B.W., Francis D., Cushman J., (2013) *Progress in botany* London.
- Lloyd, A.M., Walbot, V. and Davis, R.W. (1992) Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science*, **258**, 1773-1775.
- Ma, J.K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, **268**, 716-719.
- Madar, Z. and Stark, A.H. (2002) New legume sources as therapeutic agents. *Br J Nutr*, **88 Suppl 3**, S287-292.
- Marles, M.A., Ray, H. and Gruber, M.Y. (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, **64**, 367-383.
- Majak, W., Hall, J.W. (1990) Sodium and potassium concentrations in ruminal contents after feeding bloat-inducing alfalfa to cattle. *Canadian Journal of Animal Science* **70**: 235-241.
- Mayerhofer, A., Lahr, G. and Gratzl, M. (1991) Expression of the neural cell adhesion molecule in endocrine cells of the ovary. *Endocrinology*, **129**, 792-800.
- McAllister, T.A.B., H.D.; Jones, G.A.; Cheng, K.J.; (1994) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci*, **72**, 3004-3018.
- McGarry, R.C. and Ayre, B.G. (2012) Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Sci*, **188-189**, 71-81.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., Cheng, K.J. (2000.) A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. . *Can J Plant Sci* **80**: 469-485.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M. and Lee, I. (2005) Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **46**, 292-299.
- Moyroud, E., Minguet, E.G., Ott, F., Yant, L., Pose, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thevenon, E., Weigel, D., Schmid, M. and Parcy, F. (2011) Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the *Arabidopsis* LEAFY transcription factor. *Plant Cell*, **23**, 1293-1306.
- Naqvi, S., Farre, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C. and Christou, P. (2009) When more is better: multigene engineering in plants. *Trends Plant Sci*, **15**, 48-56.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G.C. and Charleston, W.A. (1998) Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet Parasitol*, **80**, 15-27.
- Ninkovic S, M.-D.J., Vinterhalter B, Neskovic M (2004) Improved transformation of alfalfa somatic embryos using a superbinary vector. *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 139-143.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- Ohshima, S., Murata, M., Sakamoto, W., Ogura, Y. and Motoyoshi, F. (1997) Cloning and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene Terminal Flower 1. *Mol Gen Genet*, **254**, 186-194.

- Oldroyd, G.E. and Geurts, R.** (2001) *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before. *Trends Plant Sci*, **6**, 552-554.
- Paetau, I., Chen, C.-Z. and Jane, J.-I.** (1994) Biodegradable Plastic Made from Soybean Products. 1. Effect of Preparation and Processing on Mechanical Properties and Water Absorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **33**, 1821-1827.
- Pang, Y., Peel, G.J., Wright, E., Wang, Z. and Dixon, R.A.** (2007) Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **145**, 601-615.
- Pang, Y., Wenger, J.P., Saathoff, K., Peel, G.J., Wen, J., Huhman, D., Allen, S.N., Tang, Y., Cheng, X., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Sumner, L.W., Marks, M.D. and Dixon, R.A.** (2009) A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* Is Necessary for Tissue-Specific Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis But Not for Trichome Development. *Plant Physiology*, **151**, 1114-1129.
- Paolocci, F., Robbins, M.P., Passeri, V., Hauck, B., Morris, P., Rubini, A., Arcioni, S. and Damiani, F.** (2011) The strawberry transcription factor *FaMYB1* inhibits the biosynthesis of proanthocyanidins in *Lotus corniculatus* leaves. *J Exp Bot*, **62**, 1189-1200.
- Park, K.I., Ishikawa, N., Morita, Y., Choi, J.D., Hoshino, A. and Iida, S.** (2007) A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *Plant J*, **49**, 641-654.
- Peel, G.J., Pang, Y., Modolo, L.V. and Dixon, R.A.** (2009) The *LAP1* MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *Plant J*, **59**, 136-149.
- Peyraud, J.L., Le Gall, A., and Lüscher, A.** (2009) Potential food production from forage legume-based systems in Europe: an overview. *J. Agric. Food Res*, **48** (2), 115–136.
- Pfeiffer, J., Kuhnel, C., Brandt, J., Duy, D., Punyasiri, P.A.** (2006) Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol Biochem* **44**: 323-334.
- Phelan, P., Moloney, A.P., McGeough, E.J., Humphreys, J., Bertilsson, J., Riordan, E.G. and Kiely, P.** (2015) Forage Legumes for Grazing and Conserving in Ruminant Production Systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **34**, 281-326.
- Picatoste F, Claro, E.** (2003) Rutas de fosforilación tras la activación de receptores: vía de las MAP quinasas; Jesús A. García Sevilla ÁP, editor.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N. and Lifschitz, E.** (2001) Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*, **13**, 2687-2702.
- Podevin, N.d.J., P.** (2012) Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. *GM Crops Food*, **3**, 296-300.
- Prelich, G.** (2012) Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, **190**, 841-854.
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.K. and Lazarus, C.M.** (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat Biotechnol*, **22**, 739-745.

- Ramos G, Frutos, P., Fernández, M., Lavín, P., Mantecón, A.R. (1999) Valor nutritivo de especies arbustivas de puertos de montaña: efecto del contenido en taninos condensados.
- Ramsay, N.A., Walker, A.R., Mooney, M. and Gray, J.C. (2003) Two basic-helix-loop-helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant Mol Biol*, **52**, 679-688.
- Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E.S. and Bradley, D.J. (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, **125**, 1609-1615.
- Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J. and Coen, E.S. (1999) Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development*, **126**, 1109-1120.
- Ray, H., Yu, M., Auser, P., Blahut-Beatty, L., McKersie, B., Bowley, S., Westcott, N., Coulman, B., Lloyd, A. and Gruber, M.Y. (2003) Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize *Lc*. *Plant Physiol*, **132**, 1448-1463.
- Robbins, M.P., Paolocci, F., Hughes, J.W., Turchetti, V., Allison, G., Arcioni, S., Morris, P. and Damiani, F. (2003) *Sn*, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*. *J Exp Bot*, **54**, 239-248.
- Romero, N.A., Comerón, E.A. and Ustarroz, E. (1995) Manejo and utilización de la alfalfa. . *La Alfalfa en la Argentina*, pp. 150-170.
- Rosellini D, C.S., Ferradini N, Savo Sardaro ML, Nicolía A, Veronesi F (2007) Nonantibiotic, efficient selection for alfalfa genetic engineering. *Plant Cell Reports*, 1035-1044.
- Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., Venegas-Caleron, M., Li, T., Bauer, J., Napier, J.A. and Sayanova, O. (2012) Enhancing the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Arabidopsis thaliana* via iterative metabolic engineering and genetic crossing. *Transgenic Res*, **21**, 1233-1243.
- Russelle, M. (2001) Alfalfa. *Am Sci*, **89**, 252-259.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Samac, D.A. and Austin-Phillips, S. (2006) Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods Mol Biol*, **343**, 301-311.
- Samac, D.A., Temple, S.J. (2004) *Development and utilization of transformation in medicago species*. Binghamton, NY.
- Samac, D.A., Tesfaye, M., Dornbusch, M., Saruul, P. and Temple, S.J. (2004) A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res*, **13**, 349-361.
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E.E., Zandalinas, S.I., Juarez, P., Fernandez-del-Carmen, A., Granell, A. and Orzaez, D. (2011) GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One*, **6**, e21622.
- Sarrion-Perdigones, A., Palaci, J., Granell, A. and Orzaez, D. (2014) Design and construction of multigenic constructs for plant biotechnology using the GoldenBraid cloning strategy. *Methods Mol Biol*, **1116**, 133-151.
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palaci, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarso, P., Blanca, J., Granell, A. and Orzaez, D. (2013) GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol*, **162**, 1618-1631.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875-3883.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**, 21-40.

- Schultz, E.A. and Haughn, G.W.** (1993) Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in Arabidopsis. *Development*, **119**, 745-765.
- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., Mackay, S., Alm, V., Butelli, E., Oyama, R., Bailey, P., Davies, K. and Martin, C.** (2006) A Small Family of MYB-Regulatory Genes Controls Floral Pigmentation Intensity and Patterning in the Genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, **18**, 831-851.
- Seastedt, T.R. and Knapp, A.K.** (1993) Consequences of nonequilibrium resource availability across multiple time scales: the transient maxima hypothesis. *Am Nat*, **141**, 621-633.
- Sengupta-Gopalan, C., Bagga, S., Ortega, J.L., Potenza** (2008) Genetic engineering for forage quality in alfalfa. *In handbook of new Technologies for genetic Improvement of legumes*, pp. 1-18.
- Serrano-Mislata, A.** (2010) Análisis de la regulación transcripcional del gen *TERMINAL FLOWER 1* de Arabidopsis. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Serre, L., Vallee, B., Bureaud, N., Schoentgen, F. and Zelwer, C.** (1998) Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure*, **6**, 1255-1265.
- Serwatowska, J., Roque, E., Gomez-Mena, C., Constantin, G.D., Wen, J., Mysore, K.S., Lund, O.S., Johansen, E., Beltran, J.P. and Canas, L.A.** (2014) Two *euAGAMOUS* genes control C-function in *Medicago truncatula*. *PLoS One*, **9**, e103770.
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, D.** (1991) A Mutation in the Arabidopsis *TFL1* Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *Plant Cell*, **3**, 877-892.
- Singh, N., Armstrong, D.G. and Lipsky, B.A.** (2005) Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*, **293**, 217-228.
- Singh, R.J., Chung, G.H. and Nelson, R.L.** (2007) Landmark research in legumes. *Genome*, **50**, 525-537.
- Smil, V.** (1999) Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**, 647-662.
- Somers, D.A., Samac, D.A. and Olhoft, P.M.** (2003) Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol*, **131**, 892-899.
- Spangenberg, G., Kalla, R., Lidgett, A., Sawbridge, T., Ong, E.K., John, U** (2001) Transgenesis and Genomics in molecular breeding of forage plants. *Australian Society of Agronomy*, pp. 1-29.
- Spano, L., Mariotti, D., Pezzotti, M., Damiani, F. and Arcioni, S.** (1987) Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **73**, 523-530.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C.** (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol* **24**: 743-755.
- Stephenson, A.G.** (1984) The Regulation of Maternal Investment in an Indeterminate Flowering Plant (*Lotus Corniculatus*). *Ecology*, **65**, 113-121.
- Sung, Z.R., Chen, L., Moon, Y.H. and Lertpiriyapong, K.** (2003) Mechanisms of floral repression in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 29-35.
- Sweeney, M.T., Thomson, M.J., Pfeil, B.E. and McCouch, S.** (2006) Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *Plant Cell*, **18**, 283-294.
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P. and Mysore, K.S.** (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, **54**, 335-347.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Sasabe, M. and Machida, Y.** (2004) A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J Biochem*, **136**, 127-132.

- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J. and Ashton, A.R. (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J Biol Chem*, **278**, 31647-31656.
- Thompson, D.J., Brooke, B. M., Garland, G. J., Hall, J. W., and Majak, W. (2000) Effect of stage of growth of alfalfa on the incidence of bloat in cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, **80** (4): 725–727.
- Tian, L., Pang, Y. and Dixon, R. (2008) Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 445-465.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A.M. and Hohn, B. (1995) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *Embo J*, **14**, 3585-3595.
- Trinh, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamat, K., Bauer, P. and Kondorosi, A. (1998) Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, **17**, 345-355.
- Twyman, R.M., Kohli, A., Stoger, E. and Christou, P. (2002) Foreign DNA: integration and expression in transgenic plants. *Genet Eng (N Y)*, **24**, 107-136.
- Verdier, J., Zhao, J., Torres-Jerez, I., Ge, S., Liu, C., He, X., Mysore, K.S., Dixon, R.A. and Udvardi, M.K. (2012) *MtPAR* MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 1766-1771.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. and Tilman, D.G. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, **7**, 737-750.
- Waghorn, G.C.S., I.D.; McNabb, W.C.; McCutcheon, S.N. (1994) Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. *Journal of agricultural science*, 109-119.
- Wang, Y. and Pijut, P.M. (2013) Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER 1* homolog from *Prunus serotina* Ehrh. *Tree Physiol*, **33**, 855-865.
- Weeks, J.T., Ye, J. and Rommens, C.M. (2008) Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res*, **17**, 587-597.
- Wettstein, D. (2007) From analysis of mutants to genetic engineering. *Annu Rev Plant Biol*, **58**, 1-19.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. and Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309**, 1056-1059.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**: 485-493.
- Winter, C.M., Austin, R.S., Blanvillain-Baufume, S., Reback, M.A., Monniaux, M., Wu, M.F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J.E., Parcy, F., Jensen, S.T., Li, H. and Wagner, D. (2011) *LEAFY* target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev Cell*, **20**, 430-443.
- Wojciechowski, M.F., Lavin, M. and Sanderson, M.J. (2004) A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, **91**, 1846-1862.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B. and Dixon, R.A. (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys*, **422**, 91-102.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B., Wright, E., Wang, Z.Y. and Dixon, R.A. (2006) Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the *PAP1* MYB transcription factor. *Plant J*, **45**, 895-907.

- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M. and Kolch, W.** (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 3079-3085.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K.D., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M. and Kolch, W.** (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, **401**, 173-177.
- Yoshida, K., Iwasaka, R., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S. and Sakuta, M.** (2008) Functional differentiation of *Lotus japonicus* TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family. *Plant Cell Physiol*, **49**, 157-169.
- Young, N.D. and Udvardi, M.** (2009) Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 193-201.
- Zambryski, P.** (1988) Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet*, **22**, 1-30.
- Zamora, F.** (2003) Elaboración y crianza del vino tintos: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: 225.
- Zhang H, H.Q.-M., Su J** (2010) Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Agric Sci China*, 170-178.
- Zhang, S., Hu, W., Wang, L., Lin, C., Cong, B., Sun, C. and Luo, D.** (2005) *TFL1/CEN*-like genes control intercalary meristem activity and phase transition in rice. *Plant Science*, **168**, 1393-1408.
- Zhou, M., Wei, L., Sun, Z., Gao, L., Meng, Y., Tang, Y. and Wu, Y.** (2015) Production and transcriptional regulation of proanthocyanidin biosynthesis in forage legumes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **99**, 3797-3806.
- Zhou, M., Zhang, C., Wu, Y. and Tang, Y.** (2013) Metabolic engineering of gossypol in cotton. *Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 6159-6165.
- Zhou, M.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X. and Wu, Y.M.** (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, **90**, 1229-1239.
- Ziemienowicz A, T.T., Hohn B.** (2008) Mechanisms of T-DNA integration. In: *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. . Springer, 396–441.

