

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las leguminosas: alta diversidad e importancia agronómica	4
1.1 <i>Medicago truncatula</i> como especie modelo	6
2. El desarrollo floral en las especies modelo tradicionales y en las leguminosas	8
2.1 Descripción de la inflorescencia y la ontogenia floral	8
2.2 El modelo ABC(DE)	14
2.2.1 Genes de función A	16
2.2.2 Genes de función B	16
2.2.3 Genes de función C	17
2.2.4 Genes de función D	18
2.2.5 Genes de función E.....	18
2.3 Los genes MADS-box.....	19
2.3.1 Clasificación y filogenia de los genes MADS-box	21
3. Los genes MADS-box y su implicación en la biología evolutiva del desarrollo de las plantas.....	24
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Material biológico.....	35
1.1. Material vegetal	35
1.1.1. Condiciones de cultivo de las plantas	35
1.1.1.1. Cultivo de <i>Medicago truncatula</i>	35
1.1.1.2. Cultivo de <i>Pisum sativum</i>	36
1.1.1.3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.1.1.3.1. Cultivo en placas petri	37
1.1.1.3.2. Cultivo en macetas	38
1.2. Microorganismos	38

1.2.1.	Cepas bacterianas	38
1.2.2.	Condiciones de cultivo de microorganismos	39
1.2.3.	Medios de cultivo de microorganismos	39
2.	Métodos de biología molecular.....	39
2.1.	Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	39
2.1.1.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	39
2.1.2.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i>	40
2.1.3.	Aislamiento y cuantificación de DNA genómico	40
2.1.4.	Aislamiento de RNA total	41
2.2.	Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
2.3.	Técnicas de clonación	43
2.3.1.	Vectores plasmídicos utilizados	43
2.3.2.	Digestiones del DNA con enzimas de restricción	43
2.3.3.	Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	44
2.3.4.	Reacciones de ligación de DNA	44
2.4.	Transformación de cepas bacterianas	44
2.4.1.	Preparación de células competentes y transformación por electroporación	45
2.4.2.	Selección de recombinantes bacterianos	45
2.5.	Secuenciación.....	46
2.5.1.	Análisis de secuencias	46
2.6.	Escrutinio de genoteca de <i>Medicago truncatula</i>	47
2.6.1.	Titulación y rastreo de la genoteca	47
2.6.2.	Transferencia a membrana	47
2.6.3.	Síntesis de sondas radiactivas	47
2.6.4.	Hibridación y lavados	48
2.6.5.	Detección de la señal: autorradiografía	48
2.6.6.	Identificación y aislamiento de clones positivos.....	48
2.7.	Estudios de expresión	49
2.7.1.	Análisis <i>Northern blot</i> y <i>Southern blot</i>	49
2.7.1.1.	Electroforesis de RNA y DNA para transferencia a membrana ...	49
2.7.1.2.	Transferencia y fijación de RNA y DNA a membrana.....	50

2.7.1.3. Marcaje de sondas radiactivas.....	50
2.7.1.4. Prehibridación e hibridación.....	50
2.7.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....	51
2.7.3. Hibridaciones <i>in situ</i> de mRNA.....	53
2.7.3.1. Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina	53
2.7.3.2. Cuantificación de las sondas	54
2.7.3.3. Preparación de las muestras.....	54
2.7.3.4. Prehibridación e hibridación.....	55
2.7.3.5. Inmunodetección colorimétrica de la señal.....	56
3. Transformación genética de plantas.....	56
3.1. Diseño de construcciones	56
3.1.1. Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Medicago truncatula</i> mediante RNA interferente	56
3.1.2. Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Pisum sativum</i> y <i>Medicago truncatula</i> mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	58
3.1.3. Construcciones generadas para la expresión constitutiva de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Medicago truncatula</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	60
3.2. Transformación genética de plantas.....	61
3.2.1. Transformación estable de <i>Medicago truncatula</i>	61
3.2.2. Transformación transitoria de <i>Pisum sativum</i> y <i>Medicago truncatula</i>	63
3.2.3. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> y análisis de plantas transgénicas.....	64
4. Técnicas de fotografía y microscopía	66
4.1. Fotografía digital	66
4.2. Microscopía.....	66
4.2.1. Microscopía estereoscópica.....	66
4.2.2. Microscopía óptica	67
4.3. Criomicroscopía electrónica de barrido.....	67

IV. CAPÍTULO I: Aislamiento y caracterización de miembros de la familia MADS-box en <i>Medicago truncatula</i>	71
RESULTADOS	73
1. Aislamiento y caracterización de miembros de la familia MADS-box en <i>Medicago truncatula</i>	75
1.1. Aislamiento de once clones diferentes con homología a genes MADS-box ..	75
1.2. <i>MtSEP</i> : un gen con homología a genes MADS-box del grupo <i>AGL2</i>	77
1.2.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtSEP</i>	77
1.2.2. Patrón de expresión de <i>MtSEP</i>	80
1.3. <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>AGL6</i>	83
1.3.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i>	83
1.3.2. Patrón de expresión de <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i>	88
1.3.2.1. Patrón de expresión de <i>MtAGL6</i>	89
1.3.2.2. Patrón de expresión de <i>MtAGL6-like</i>	91
1.4. <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>TDR3 (SOC1)</i>	93
1.4.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i>	93
1.4.2. Patrón de expresión de <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i>	101
1.4.2.1. Patrón de expresión de <i>MtSOC1a</i> y <i>MtSOC1b</i>	101
1.4.2.2. Patrón de expresión de <i>MtSOC1-like</i>	103
1.5. <i>MtAGa</i> , <i>MtAGb</i> y <i>MtSHP</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>AG</i>	105
1.5.1. Aislamiento de <i>MtAGa</i> , <i>MtAGb</i> y <i>MtSHP</i>	105
1.5.2. Análisis de secuencia de <i>MtSHP</i>	107
1.5.3. Patrón de expresión de <i>MtSHP</i>	110
1.6. <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>DEF/AP3</i>	113
1.6.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i>	113
1.6.2. Patrón de expresión de <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i>	121

1.6.2.1. Patrón de expresión de <i>MtTM6</i>	121
1.6.2.2. Patrón de expresión de <i>MtNMH7</i>	122
DISCUSIÓN	125
1. <i>MtSEP</i> es el ortólogo de los genes <i>SEP1/2</i> en <i>Medicago truncatula</i>	129
2. <i>MtAGL6</i> es el ortólogo del gen <i>AGL6</i> en <i>Medicago truncatula</i>	131
3. <i>MtAGL6-like</i> forma parte de un nuevo grupo génico exclusivo de leguminosas ..	134
4. <i>MtSOC1a</i> y <i>MtSOC1b</i> son ortólogos del gen integrador floral <i>SOC1</i>	135
5. <i>MtSOC1-like</i> es un gen del grupo <i>TDR3/SOC1</i> que se expresa en tejido floral adulto	137
6. <i>MtSHP</i> : gen ortólogo de los genes <i>SHP1/SHP2</i> con expresión en óvulos.....	138
7. <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> : genes de clase B originados por una duplicación génica, pertenecientes al linaje <i>AP3/DEF</i>	141
V. CAPÍTULO II: Caracterización molecular y funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i>	147
RESULTADOS	149
1. Caracterización molecular y funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i>	151
1.1. Caracterización molecular de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i>	151
1.1.1. Análisis de las secuencias proteicas de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i>	151
1.1.2. Análisis de las secuencias genómicas de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i>	158
1.1.3. Análisis <i>Southern blot</i>	163
1.1.4. Patrón de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i>	164
1.1.4.1. Patrón de expresión de <i>MtAGa</i>	164
1.1.4.2. Patrón de expresión de <i>MtAGb</i>	166
1.2. Caracterización funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i>	168
1.2.1. Silenciamiento génico mediante RNA interferente	168
1.2.1.1. Fenotipo de las plantas transgénicas 35S::RNAi- <i>MtAGb</i>	172
1.2.1.2. Niveles de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> en las plantas transgénicas 35S::RNAi- <i>MtAGb</i>	174

1.2.2. Mutante <i>mtagb</i> : etiquetado por inserción del retrotransposón <i>Tnt1</i>	175
1.2.2.1. Caracterización molecular de la inserción y genotipado	176
1.2.2.2. Caracterización fenotípica del mutante <i>mtagb</i>	178
1.2.3. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	180
1.2.3.1. VIGS en <i>Pisum sativum</i>	181
1.2.3.2. VIGS en <i>Medicago truncatula</i>	189
1.2.4. Expresión constitutiva en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	193
1.2.4.1. Expresión constitutiva de <i>MtAGa</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	194
1.2.4.2. Expresión constitutiva de <i>MtAGbS</i> y <i>MtAGbL</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	199
DISCUSIÓN	205
1. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> presentan homología estructural con genes de función C	207
2. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> funcionan como genes de clase C	210
3. El umbral de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> requerido para determinar el meristemo o para establecer la identidad de órgano floral es variable	214
4. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> son genes duplicados parcialmente redundantes que se han subfuncionalizado adquiriendo papeles en diferentes aspectos de la función C..	216
VI. CONCLUSIONES	221
VII. BIBLIOGRAFÍA	225
VIII. ANEXOS	257
1. Secuencia genómica amplificada que contiene la región codificante del gen <i>MtAGa</i> de <i>Medicago truncatula</i>	259
2. Secuencia genómica amplificada que contiene la región codificante del gen <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i>	260