**ÍNDICE**

 **ABREVIATURAS** VII

**I. INTRODUCCIÓN**  1

1. Las leguminosas: alta diversidad e importancia agronómica 3

2. La alfalfa (*Medicago sativa* 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. Biotecnología 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 *Arabidopsis thaliana* 17

 3.1.1.1. Control de la iniciación floral en Arabidopsis. Genes de identidad de meristemo floral 19

 3.1.1.2. *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) es un regulador negativo de la iniciación floral en Arabidopsis 20

 3.1.1.2.1. *TFL1* y el desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis 21

 3.1.1.2.2. La proteinaTFL1 23

 3.1.1.2.3. Ortólogos de *TFL1* en leguminosas 25

3.2. Interés de la biofortificación de cultivos forrajeros: producción *de novo* 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 nutracéuticos 32

 3.2.1.2. Interés de activar *de novo* 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

**II. OBJETIVOS** 43

**III. MATERIALES Y MÉTODOS** 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 *Medicago sativa* y *Medicago truncatula* 49

 1.1.1.2. Cultivo de *Nicotiana benthamiana* en maceta 50

 1.1.1.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* 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 *E. coli* 54

 4.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* 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 *Medicago sativa* 72

 5.1.1. Solución mineral y vitamínica del medio de propagación clonal *in vitro*

 (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

 *Medicago sativa* 35S*::MsTFL1a* 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 eficacia (HPLC) 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 *Nicotiana benthamiana* 86

5.3. Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana* 87

 5.3.1. Selección de transformantes 87

5.4. Transformación estable de *Nicotiana tabacum* 88

 5.4.1. Cultivo de explantes primarios 88

 5.4.2. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* 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 *N. tabacum* 91

 5.4.6.4. Medios de cultivo estándar 92

6. Análisis estadístico 92

**IV. CAPÍTULO I: *Diseño de una metodología eficiente para la transformación genética de la alfalfa (Medicago sativa L.) mediada por Agrobacterium tumefaciens*** 93

 **RESULTADOS** 95

1. Elección del genotipo de alfalfa, de la estirpe de *Agrobacterium* 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 *Agrobacterium* 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 *A. tumefaciens* 99

2.1. Germinación de semillas de alfalfa 99

2.2. Preparación del inóculo de *A. tumefaciens* 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

 **DISCUSIÓN CAPÍTULO I** 113

 Puesta a punto de un protocolo de transformación mediante embriogénesis somática en *M. sativa* 115

**V. 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*** 121

 **RESULTADOS** 123

1. Aislamiento de los ortólogos de *TFL1* de *M. sativa*. Diseño de construcciones y obtención de plantas con ganancia de función 123

1.1. Aislamiento de los ortólogos de *TFL1 de M. sativa* 123

1.2. Sobreexpresión de *MsTFL1a* y *MsTFL1c* en *Arabidopsis thaliana* 124

2. Sobreexpresión del gen *MsTFL1a* en *M. sativa* 130

2.1. Obtención y caracterización de las plantas transgénicas 130

2.2. Análisis del nivel de expresión de *MsTFL1a* en las plantas transgénicas T1 131

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

 **DISCUSIÓN CAPÍTULO II** 157

1. La expresión constitutiva de uno de los dos ortólogos de *TFL1* en alfalfa modifica el tiempo de floración y la arquitectura de la planta en *Arabidopsis thaliana* 159

2. *MsTFL1a* podría tener funciones adicionales en alfalfa a las descritas para *TFL1* en *A. thaliana* 160

3. Los genes *TFL1*-like podrían participar en vías de señalización que regulan la diferenciación celular en plantas 161

4. Los genes *TFL1*-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 *M. sativa* 165

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 167

**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*** 169

 **RESULTADOS** 171

1. Diseño de la construcción para la expresión constitutiva de *Delila*-*Rosea1*-*MtANR*-*MtLAR* 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::*Delila*::T35S-35S::*Rosea1*::

 T35S-35S::*MtANR*::T35S-35S::*MtLAR*::T35S 176

2. Validación funcional de la construcción *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR*

 mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* 181

2.1. Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* 181

2.2. Detección y cuantificación de PAs en las hojas agroinfiltradas de

 *N. benthamiana* 185

3. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* por transformación estable 187

3.1. Ensayos en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Medicago sativa* 187

3.2. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *A. thaliana* 188

 3.2.1. Caracterización de las plantas transgénicas 190

3.3. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *N. tabacum* 192

 3.3.1. Caracterización de las plantas transgénicas 194

 3.3.2. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas

 T1 de *N. tabacum* 197

 3.3.3. Detección y cuantificación de PAs 199

3.4. Validación de la construcción multigénica *Delila-Rosea1-MtANR-MtLAR* en *M.sativa* 203

 3.4.1. Caracterización de las plantas transgénicas de *M. sativa* 203

 3.4.2. Detección de PAs en hojas de plantas transgénicas de *M. sativa* 207

 **DISCUSIÓN CAPÍTULO III** 211

1. Validación funcional de la construcción multigénica 35S*::Delila- Rosea1-MtANR-MtLAR* en *N. benthamiana* 214

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 214

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

**VII. CONCLUSIONES** 225

**VIII. BIBLIOGRAFÍA**  231