

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) inferior a la requerida para subsanar el desorden digestivo del ganado rumiante que genera hinchamiento por gases de efecto invernadero 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 aplicable a varios genotipos de alfalfa con una eficiencia de embriogénesis somática y 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., 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. Por otro lado, la limitación en la proliferación celular asociada a la expresión constitutiva de *MstFL1a* en *M. sativa*, apoya la hipótesis de que los genes *TFL1-like* podrían participar en la regulación de distintas vías de señalización celular a través de su asociación con diversas clases de proteínas. *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. Por otro lado, 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*.