



Consorti CSIC-IRTA
Consell Superior d'Investigacions Científiques
Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
Institut de Biologia Molecular de Barcelona
Departament de Genètica Molecular



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Regulació gènica de proteïnes de reserva en cereals.

Factors de transcripció implicats.

Elisabet Gas Pascual

Barcelona, Març de 2006

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA

BIENNI 2001-2003

*Regulació gènica de proteïnes de reserva en cereals.
Factors de transcripció implicats.*

Memòria presentada per Elisabet Gas i Pascual per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Aquest treball, realitzat al Laboratori de Genètica Molecular Vegetal del Consorci CSIC-
IRTA, ha estat finançat per la Generalitat de Catalunya amb la beca predoctoral per a la
formació de personal investigador 2002 FI 00032.

la directora de tesi

l'autora

el tutor

M^a Dolors Ludevid Múgica

Elisabet Gas Pascual

Albert Ferrer Prats

Barcelona, Març de 2006

Tard o d'hora tot s'acaba
però tornarà a començar
com la llum del dia
(que) en deixa l'obscuritat.

El silenci del poeta
i la pàgina en blanc
conviuràn fins que el
cercle es torni
un altre cop a tancar. A tancar...

Cercles (SAU)

Agraïments

Acabar una tesi és una feina més dura del que sembla i que seria molt més difícil encara si no comptéssim amb l'ajuda de molta gent. Així que allà va un reconeixement a tots aquells que han fet possible que avui estigueu davant d'un llibre com aquest.

En primer lloc agrair als meus pares la seva infinita paciència amb mi i per fer-me costat en totes les decisions que prenc.

A l'Alicia Sáez i la Dra. Susanna Ricard, sense elles probablement la història que s'explica a continuació mai no hauria començat, o hauria anat un xic diferent.

A la Dra. Dolors Ludevid, Lola, per haver-me permès incorporar-me al seu grup. Per aquest projecte que s'acaba amb aquest mecanoscrit (i algun *paper*, esperem). Per tot el que he après al seu costat. Per tots els consells, per la paciència i per la confiança.

A la Dra. Margarita Torrent, Marga, sempre allà per donar un cop de mà. Per tot el que m'ha ensenyat, pel suport amb tots els bombardejos, totes les opinions i per l'interès en saber tot el que fan tots "els nens" del lab vermell.

Al Dr. Jesús Vicente-Carbajosa por sus ideas, su colaboración y su interés en los avances del grupo.

Al Dr. Albert Ferrer, per acceptar ser el meu tutor i per totes les facilitats en el tràmits burocràtics.

A tots els vermells, d'avui, d'ahir i de sempre...

Al Pau, que va fer molta feina a la seva tesi, però que va deixar també moltes coses pendents... el que fa que avui es pugui llegir aquest treball. Agrair-te el quasi malaltís interès per tot el que té a veure amb la PBF, l'ajuda amb els *bandshifts*, la inesgotable font d'idees. Saber que malgrat em posa dels nervis el desordre, només l'existència de la selva permet entreveure que hi ha un oasi a l'altra banda de la poiata. *Merci bien, enfant terrible!*

Al Marc, company de poiata durant aquests 4 anys. Sé lo difícil que és aguantar dia rere dia les meves queixes, els meus mals humors, els dies tontos, les bronques per haver acabat els *tissues* o pels robatoris indiscriminats de bolígrafs i retoladors. Merci per les skiades, els sopars i les festes... que encara en queden de pendents! Saber que el teu positivisme també s'enganxa i que has estat el millor *compí* que es pot demanar.

A Maite, siempre dispuesta a echar un cable y a preparar un poquito de LB de más para las innumerables inducciones que he llegado a hacer en estos cuatro años. Que junto con Marc habéis institucionalizado el viernes como día de la risa y habéis convertido mi paso por el rojo en un agradable paseo. Por todos los buenos momentos tanto dentro como fuera del lab.

A la Imma, que malgrat anar sempre a mil i ser supermama, està sempre disposada a donar un cop de mà, un consell o una idea constructiva. Merci!!!

A la Carme Romera, que em va introduir en el funcionament de "este, nuestro departamento" i em va ensenyar quasi tot el que sé d'*E.coli*.

A la Sílvia, que tot i tenir un caràcter, ens alegrava els matins amb l'Aire de José Mercé i la Cabra Mecànica.

A la Tere (que no lo Tere, que lo és masculí!), que tot i estar acabant la tesi quan jo vaig entrar al vermell, va estar sempre a punt per respondre les meves preguntes de principiant i per l'ajuda en aquell meu primer *Northern*, que de fet és més seu que meu.

A la Sabine, de qui vaig heretar el joc de pipetes, i segons el Pau, l'obsessió per l'ordre.

Al amigo Lorenzo, el selvàtic més selvàtic de tots. Agraceder tu alegría, las risas que nos hemos echado contigo, por el protocolillo de la tinción GUS y las consultillas técnicas que todavía hoy, vía *mail*, solucionas prontamente. Y a pesar que debo reconocer que entre *Monsieur Paul* y tú llegabais a saturar mi nivel de tolerancia musical francesa, tu paso por el rojo fue de veras de lo más simpático.

To Minu Joseph, it was really a pleasure to share the lab with you. All of us still use your protocol to quantify GUS activity at the fluorimeter. Thanks for being so kind and best wishes for all your family.

A tots els nens de pràctiques que han passat pel lab, sobretot a la Núria, que es va encarregar pràcticament sola dels bombardejos i les corresponents mesures GUS/LUC d'aquell estiu en que em vaig lesionar el dit.

A la Mina, que amb el permís dels grocs és també una mica vermella. Gracias por hacer de mama y por conseguir para el rojo todo ese material extra... así la gente de los otros labs saben a donde tienen que ir a pedir... Gracias a ello ya todos saben que antes de pedirnos material deben decir aquello de "es triste de pedir pero más triste..."

I a tota la gent del departament...

Als taronges, que em van adoptar des del primer dia per baixar a dinar. A la Teresa, el Hans i el Carles. Al Carles, merci per tots els protocols i tot el *software* que em vas passar, totes les midis que em vas arribar a fer (tu perquè oblides, però han estat moltes), per la opinió crítica sobre els resultats presentats and so so.

I als verds-i-negres dels inicis, sobretot al Sergi F. i al David, que van haver de partir no només la meua lentitud al menjador sinó també la meua incontinença verbal. Als verds de sempre, la Núria i el Cristian. Que dir de tots 2! Wendy!!! Merci per ser sempre allà, per l'amistat, per totes les bones estones viscudes i pels ànims. Per les xerrades de ciència (que també n'hem tingut) i els drames amb "my embryos". Wendissimo, no soy capaz de contar todos los buenos ratos pasados contigo. Gracias por todos ellos!!! A Carlos, por sus consejos e ideas acerca del embrión de maíz en desarrollo. I als negres d'ara! Valeria, eres encantadora, sigue como siempre y paciencia con la gente de tu lab!!! Silvia y Fathy, gracias por los ánimos y los MYB-consejos.

Als liles d'abans, sobretot a la Marta Boter. I als d'ara, que gairebé han adoptat a "esta amiga teua del roig". Irma, Wen!!! Gràcies per tot!!! Merci pels moments compartits, per

les clarettes, per tots els cops que has estat allà “para llorar las penas” i per les *celebrations*, per l'amistat, and obviously for careful reading & critical revision on present manuscript. Jaume, Jordi, Céline, Anahit i també als ex-nens de pràctiques Sergi P. i Manuel... sou encantadors, you're incredible!

Als rebatejats com amarillo-rosados. Laura, merci per la paciència amb tots els que anem acabant després i, en part, gràcies a tu!!! I a tota la gent dels dos labs, que sempre que se us ve a veure, s'acaba marxant del lab amb un somriure! Marta, això va també per tu, que encara ens queden sopars per compartir i xerrera per estona!

A la Desi, per totes les converses sobre coses útils i inútils que hem arribat a mantenir, tots els cafès matiners i tots els cops que m'has aprofitat a casa, això sí, parant sempre a tots els semàfors. Merci per totes “las risas que nos echamos”.

Als blaus. A Sami, sus buenos intentos de sobreexpresión con PBF, que ya sabemos que es una mala compañera de poyata, y por esas paellas. A Alicia, los experimentillos de fosforilación a medias y los robos (consentidos) de marcos y peines! A la Vicky, les idees sobre FUS3 i LEC2. A la Cris, per tots els cops que t'he donat la llauna amb l'or, els discs i tot plegat. Si queda clar que la violència no ens porta enlloc, perquè seguim bombardejant?

A los niños del gris (y también a Céline, que pasa con vosotros muchas muchas horas). A Néstor, que eres un solete. Cuídate mucho y sigue así, siempre dispuesto a perder 5 minutitos para preocuparte por los demás. A l'Enric, totes les converses de ciència o no...

A las niñas de Soraya, que siempre están ahí, para lo que se pueda necesitar y con una sonrisa! Gracias por vuestra alegría!

A Nahuel, que sigue igual de ... como el primer día. Aunque nos quejemos de tus bromas, agradecemos todos tu buen humor, así que no cambies!

A la Mari Carme, que intenta que això de tenir tots els papers “en regla” no sigui tan traumàtic!

A la gent d'insectes... Laurita, gracias por todo! Sin tu ayuda mis inmunos no serian lo mismo!

A la gent d'hivernacles... Sou tots genials! A la Pilar, sobretot, tots els “quicos” que m'ha proporcionat ens aquests 4 anys, tot i les adversitats... (obres, nous hivernacles i “altres” contratemps) i a Àlex per cuidar de mi maíz. I a tot l'equip d'abans i d'ara que, tot i venir-vos a veure només a l'estiu, m'adopteu de bon grat.

A la Mònica, totes les imatges de microscòpia i pel “descobriment” de que FUSCA no és nuclear!!!

A l'equip de seqüenciació, sempre eficient, i a l'Àngel, que fa que el drama d'imprimir la tesi sigui menys drama.

A la Pepita i l'Eva de l'estabulari, que fan que això d'obtenir un anticòs sigui tan senzill (o tan complicat) com tenir la quantitat suficient de proteïna per les immunitzacions.

A Raúl, que ens ho arregla tot, tot i tot, tan de pressa com pot.

A la gente de almacén, que han hecho que ser responsable de nieve carbónica y nitrógeno líquido haya sido "casi" un juego de niños. Y evidentemente a Luís, ya que sin él la conexión con almacén no existiría!

A las niñas del bar, que a fuerza de ir todos los días, al final Montse ha descubierto como me gusta el café!

I a tots aquells que han fet que la feina d'aquests 4 anys hagi estat més fàcil de compaginar amb una vida fora del lab... perquè sí, hi ha vida fora del CSIC!

A la Veva. Totes les clarettes (aquí agrair també als senyors del Mango les ametlles), les converses, les vacances, els cines, els riures, i sobretot els ànims en tot moment. Merci per ser sempre a l'altra banda (del telèfon, de la Diagonal, del *món*...).

A la BQ people. Heu fet "todos plegados" que el fer una carrera hagi estat d'allò més divertit... Gràcies a les Meris, Laura, Ingrid, Davids, Luís, Víctor, Joan, Ari, Jorge, Pedro, Núria, Rosa, Irenes, Marcs, Laia, Toni... Ha estat un plaer "estudiar" amb vosaltres! Nurieta, sense els teus apunts ja et dic ara que molts de nosaltres no hauríem acabat la carrera. Merci a l'equip insulina, per aquells dissabtes a la biblioteca del campus Vall d'Hebron! Meri peque (ara Txell), merci per tots els anys que ens has convidat a barraques i tots els sopars a casa teva. Laura, merci per les santes. Pedro, gracias por aguantarme en clase y también fuera! Jorge, gracias por las claritas y el descubrimiento del chill out en la playita! Joan, merci per les peazo converses, per ser com ets i perquè en el fons ja ens agrades així! Rosita, gracias por cuidarme el último año. A tots i totes, moltes gràcies i molta sort!!!

Al meu tete, la meva cu i als peques Roger i Albert, que tot i que només entenguin el títol, el meu nom i poca cosa més després de la introducció, també mereixen un lloc destacat en aquests agraïments pel suport, el carinyo i la paciència d'ara i de sempre.

A les meves ex-jefes Lourdes, Carme i Mercedes, que em van donar suport i em van animar a arriscar-me amb això de fer la tesi. Avui puc dir que ha valgut la pena!

A tots aquells amb qui he compartit bons i mals moments en aquests darrers 4 anys, als que m'han animat a seguir i als que han sabut dir quan més ho necessitava "nena, tú vales mucho". A tots aquells, que sense pensar-s'ho, han fet que aquest temps hagi estat una de les millors experiències de la meua vida.

A tots i totes, moltes gràcies i fins sempre!!!

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ	1
1. La llavor: endosperma, embrió i proteïnes de reserva	3
Estructura de la llavor i desenvolupament	3
1.1. Endosperma: funció, origen i desenvolupament	5
L'origen de l'endosperma	5
L'endosperma dels cereals	6
Fases del desenvolupament de l'endosperma a blat de moro	7
1.2. Embriogènesi: etapes del desenvolupament	8
Fases del desenvolupament de l'embrió a blat de moro	10
1.3. Les proteïnes de reserva de la llavor en cereals	11
2. Regulació de l'expressió gènica en gens de llavor	12
Factors de transcripció i elements reguladors en gens de proteïnes de reserva	13
2.1. Factors de tipus bZip	15
2.1.1. Generalitats	15
2.1.2. Factors bZip de cereals i les seves dianes de reconeixement	15
2.1.3. Factors bZip d'expressió específica a endosperma	17
2.2. Factors de tipus Ditz de Zinc	18
2.2.1. Generalitats dels Dits de Zinc	18
2.2.2. Proteïnes Dof	19
2.2.3. Dianes de reconeixement pels factors de tipus Dof: <i>Prolamin-box</i> (Pb)	21
2.2.4. Factors de tipus Dof implicats en l'expressió dels gens de prolamines a cereals: <i>Prolamin Binding Factors</i> (PBF)	22
2.3. Factors de tipus Myb	22
2.3.1. El domini Myb	23
2.3.2. Generalitats dels factors de tipus Myb de plantes	23
2.3.3. Dianes de reconeixement pels factors de tipus Myb: caixes AACA	26
2.3.4. Factors de tipus Myb implicats en l'expressió dels gens de prolamines a cereals	27
2.4. Factors de tipus B3	28
2.4.1. El domini B3	28
2.4.2. Factors de transcripció que contenen dominis B3	30
2.4.3. Dianes de reconeixement pels factors B3 específics de llavor: els motius RY	31

2.4.4. Factors de tipus B3 implicats en l'expressió gènica de proteïnes de reserva	32
II. OBJECTIUS	35
III. MATERIAL I MÈTODES	39
A. Materials	41
1. Material biològic	41
1.1. Bactèries	41
1.2. Material vegetal	41
2. Plasmidis, oligonucleòtids i construccions	41
2.1. Plasmidis	41
2.2. Oligonucleòtids	42
2.3. Construccions	43
2.3.1. Vectors per a expressió transitòria en planta	44
2.3.2. Vectors d'expressió a <i>E.coli</i>	47
2.3.3. Altres vectors	51
3. Anticossos	52
4. Medis de cultiu	52
4.1. Bacteris	52
4.2. Plantes	52
5. Tampons i solucions	52
5.1. Relacionats amb les proteïnes	52
5.2. Relacionats amb els àcids nucleics	53
B. Mètodes	54
1. Assaigs d'activitat transcripcional. Transformació d'endospermes de blat de moro per biolística	54
1.1. Preparació de l'estoc de partícules d'or	54
1.2. Esterilització i dissecció de grans de blat de moro	54
1.3. Precipitació del DNA sobre les partícules d'or	55
1.4. Transformació d'endospermes de blat de moro	55
1.5. Quantificació de les activitats luciferasa i glucuronidasa per luminometria i fluorimetria	56
1.5.1. Activitat luciferasa	57
1.5.2. Activitat glucuronidasa per luminometria	57

1.5.3. Activitat glucuronidasa per fluorimetria	58
1.6. Detecció de l'activitat glucuronidasa per tinció histoquímica	58
2. Expressió i purificació de proteïnes recombinants	59
2.1. Sobreexpressió dels diferents factors de transcripció a <i>E. coli</i>	59
2.2. Purificació dels factors de transcripció produïts a <i>E. coli</i>	60
2.2.1. Purificació de les proteïnes amb His-tag (sèrie pET28) per columnes d'afinitat de níquel	60
2.2.2. Purificació de les proteïnes fusionades a GST (sèrie pGEX) per columnes d'afinitat de glutatí	61
2.2.3. Tampons emprats en la purificació per columnes d'afinitat	62
2.3. Transcripció i traducció <i>in vitro</i> de proteïnes recombinants	62
2.4. Electroforesi SDS-PAGE i tinció de proteïnes	63
2.4.1. Transferència de proteïnes (<i>Western-blot</i>)	63
2.4.2. Tinció amb blau de Coomassie	64
2.4.3. Tinció amb plata	64
3. Assaigs de retard en gel (EMSA)	65
3.1. Obtenció d'extractes nuclears	65
3.2. Preparació dels oligonucleòtids utilitzats en els assaigs de retard en gel	66
3.2.1. Purificació dels oligonucleòtids monocadena	67
3.2.1.1. Electroforesi en gel desnaturalitzant d'urea	67
3.2.1.2. Elució de l'oligonucleòtid	67
3.2.1.3. Precipitació de l'oligonucleòtid	68
3.2.2. Hibridació i precipitació dels oligonucleòtids	68
3.2.3. Marcatge dels oligonucleòtids de doble cadena a utilitzar com a sonda	68
3.3. Assaig EMSA	69
4. Anàlisi i manipulació d'àcids nucleics	71
4.1. Extracció d'RNA	71
4.1.1. Extracció d'RNA total (a mitjana escala)	71
4.1.2. Extracció d'RNA total (a petita escala)	71
4.1.3. Purificació d'mRNA-poli A+	72
4.2. Obtenció de DNA plasmídic	72
4.2.1. A mitjana escala	72
4.2.2. Minipreparacions	72

4.3. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis	72
4.3.1. Reaccions de modificació del DNA	72
4.3.2. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	72
4.3.3. Preparació i transformació de cèl·lules competents d' <i>E.coli</i>	72
4.4. PCR	73
4.4.1. Condicions generals de PCR emprades en aquest treball	73
4.4.2. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR	74
4.4.3. RT-PCR	74
4.5. Transferència i hibridació d'àcids nucleics	74
4.5.1. <i>Northern-blot</i>	74
4.5.2. Hibridació de les membranes	75
4.5.3. Tampons emprats en la hibridació de les membranes	75
5. Anticossos	76
5.1. Producció d'anticossos policlonals contra les proteïnes recombinants purificades	76
5.1.1. Obtenció de les proteïnes recombinants purificades per a la immunització	76
5.1.1.1. Obtenció de GAMYB	76
5.1.1.2. Obtenció de FUSCA3	76
5.1.2. Immunització de conills	76
5.2. Purificació dels anticossos per columnes d'immunoafinitat	77
5.3. Immunodetecció per <i>Western-blot</i>	78
5.3.1. Obtenció d'extractes totals d'endospermes de blat de moro	78
5.3.2. Obtenció d'extractes nuclears crus d'endospermes de blat de moro	79
5.3.3. Immunodetecció	79
5.4. Immunolocalització al microscopi òptic	80
5.4.1. Fixació de grans de blat de moro	80
5.4.2. Inclusió en parafina	80
5.4.3. Preparació dels blocs de parafina per a l'obtenció de seccions.	81
5.4.4. Microtomia i preparació de les seccions	81
5.4.5. Incubació dels talls de blat de moro amb els anticossos: $\alpha 2$ bdPBF (anti-PBF), $\alpha 2$ myb (anti-GAMYB) i $\alpha 2$ fus (anti-FUSCA3)	81
5.4.6. Observació al microscopi	82
5.4.7. Tinció dels grànuls de midó	83

5.4.8. Tampons i solucions	83
IV. RESULTATS	85
Antecedents	87
1. Caracterització de PBF com activador transcripcional del gen γZ	89
1.1. Determinació del domini activador de PBF sobre el promotor γZ	93
1.2. L'activació de l'expressió de γZ a través de PBF requereix la unió del factor al promotor	95
2. GAMYB, un nou regulador transcripcional del promotor γZ	97
2.1. Introducció a GAMYB	99
2.2. Clonatge de <i>ZmGAMYB</i> , el gen GAMYB de blat de moro	102
2.2.1. Anàlisi <i>in silico</i> dels gens GAMYB a monocotiledònies i dicotiledònies	102
2.2.2. Clonatge de <i>ZmGAMYB</i> a blat de moro	102
2.3. Patró d'expressió del gen <i>ZmGAMYB</i> durant el desenvolupament del gra de blat de moro	106
2.4. Caracterització de GAMYB com a regulador transcripcional del gen γZ	109
2.5. Interacció de GAMYB i PBF amb seqüències reguladores del promotor γZ	112
2.5.1. Obtenció dels factors GAMYB i PBF per a la realització dels assaigs de tipus EMSA	112
2.5.2. GAMYB interacciona amb la caixa AACAA del promotor γZ de forma específica	115
2.5.3. La unió de GAMYB a la caixa AACAA s'altera per la presència d'anticossos específics (<i>supershift</i>)	117
2.5.4. La unió de GAMYB al promotor γZ depèn d'altres elements en <i>cis</i> intactes propers a caixa AACAA	120
2.6. Determinació de la presència de mGAMYB en extractes proteics d'endosperma de blat de moro en desenvolupament	122
2.6.1. Perfil de proteïnes presents en extractes proteics de blat de moro	122
2.6.2. Obtenció d'anticossos específics contra mGAMYB	123
2.6.3. El patró d'acumulació de mGAMYB coincideix espacialment amb l'acumulació de la γ -zeïna	125
2.7. Immunolocalització de GAMYB i PBF sobre grans de blat de moro al llarg del desenvolupament	127

3. ZmFUSCA3, un nou factor B3 lligat al desenvolupament del gra de blat de moro	135
3.1. Introducció a FUSCA3	137
3.1.1. Factors B3 a blat de moro	137
3.1.2. Anàlisi <i>in silico</i> dels gens FUSCA3 a monocotiledònies i dicotiledònies	138
3.2. Clonatge del gen <i>ZmFUSCA3</i> de blat de moro	139
3.3. Patró d'expressió del gen <i>ZmFUSCA3</i> durant el desenvolupament de la llavor	141
3.4. Estudi de la capacitat d'activació de ZmFUSCA3 sobre el promotor γZ	143
3.5. Interacció de ZmFUSCA3 amb motius de tipus RY	145
3.5.1. Obtenció del factor ZmFUSCA3 recombinant per a la realització dels assaigs de tipus EMSA	145
3.5.2. FUSCA3 interacciona amb seqüències de tipus RY	146
3.6. ZmFUSCA3 en extractes proteics d'endosperma i embrió de blat de moro en desenvolupament	149
3.6.1. Perfil de proteïnes presents en extractes proteics de blat de moro	149
3.6.2. Obtenció d'anticossos específics contra ZmFUSCA3	150
3.6.3. El patró d'acumulació de ZmFUSCA3 no coincideix espacialment amb l'expressió de proteïnes de reserva de l'endosperma	152
3.7. Immunolocalització de ZmFUSCA3 en grans de blat de moro al llarg del desenvolupament	153
V. DISCUSSIÓ	163
1. Caracterització de PBF com activador transcripcional del gen γZ	165
2. GAMYB, un nou regulador transcripcional del promotor γZ	171
3. FUSCA3, un nou factor B3 lligat al desenvolupament del gra de blat de moro	181
Sincronització de l'expressió de proteïnes de reserva amb el desenvolupament del gra de blat de moro	191
VI. CONCLUSIONS	193
VII. BIBLIOGRAFIA	197
VIII. APÈNDIX	215

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1. El procés de doble fertilització en el cicle vital d'una angiosperma.	4
Figura 2. Tipus cel·lulars i fases del desenvolupament de l'endosperma a blat de moro.	6
Figura 3. Imatge d'una cèl·lula d'endosperma de blat de moro.	8
Figura 4. Visió general de l'embriogènesi a <i>A.thaliana</i> .	9
Figura 5. Estadis de l'embriogènesi a <i>Zea mays</i> .	9
Figura 6. Principals processos fisiològics del desenvolupament del gra de blat de moro.	10
Figura 7. Famílies de factors de transcripció a <i>A. thaliana</i> .	13
Figura 8. Elements en <i>cis</i> conservats en promotors de gens de proteïnes de reserva de cereals i <i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
Figura 9. Procés de dimerització entre factors de transcripció de tipus bZIP.	15
Figura 10. Anàlisi filogenètic de les bZIP relacionades amb l'expressió de gens de proteïnes de reserva de cereals.	16
Figura 11. Seqüència consens pels motius o2.	16
Figura 12. Comparació de la seqüència dels motius <i>GCN4-like</i> .	17
Figura 13. Estructura del domini Dof.	19
Figura 14. Alineament filogenètic entre diferents DOFs.	20
Figura 15. Comparació de la seqüència dels motius Pb identificats en els promotors dels gens d'algunes prolamines.	22
Figura 16. Estructura del domini Myb.	23
Figura 17. Alineament de les proteïnes MYB d' <i>A.thaliana</i> .	25
Figura 18. Llocs d'unió putatius per factors MYB al GARC (<i>GA Responsive Complex</i>) del promotor de l' α -amilasa d'alt PI d'ordi.	26
Figura 19. Comparació dels motius AACA en els promotors dels gens de les glutelines d'arròs, la B-hordeïna d'ordi i la γ -zeïna de blat de moro.	27
Figura 20. Dominis de les proteïnes ABI3/VP1.	29
Figura 21. Estructura del domini B3 dels factor RAV1, ARF1 i ABI3 d'arabidopsis i model d'interacció amb el DNA.	29
Figura 22. Alineament de dominis B3 de factors RAVs, ARFs i relacionats amb ABI3/VP1.	30
Figura 23. Arbre filogenètic de factors amb dominis B3 conservats.	31
Figura 24. Comparació dels motius RY presents en gens de proteïnes de reserva específiques de llavor.	32
Figura 25. Conservació estructural entre les proteïnes ABI3/VP1 i FUSCA3.	33

MATERIAL I MÈTODES

Figura 26. Vectors per a expressió transitòria en planta (I)	44
Figura 27. Vectors per a expressió transitòria en planta (II)	45
Figura 28. Vectors per a expressió transitòria en planta (III)	46
Figura 29. Vectors d'expressió a <i>E.coli</i> (I)	47
Figura 30. Vectors d'expressió a <i>E.coli</i> (II)	48

Figura 31. Vectors d'expressió a <i>E.coli</i> (III)	49
Figura 32. Vectors d'expressió a <i>E.coli</i> (IV)	50
Figura 33. Altres vectors	51
Figura 34. Transformació per a expressió transitòria per biolística.	56
Figura 35. Representació esquemàtica d'un oligonucleòtid model utilitzat en els assaigs EMSA.	67
Figura 36. Representació esquemàtica de les diferents etapes de la reacció d'incubació en els assaigs EMSA.	70

RESULTATS

CAPÍTOL 1

Figura 37. Anàlisi de la regió proximal del promotor del gen γZ .	88
Figura 38. Tinció histoquímica d'endospermes de blat de moro de 15 DAP transformats amb la construcció 1639 γZ :GUS.	92
Figura 39. Capacitat d'activació de PBF i els seus dominis sobre el promotor γZ en experiments de co-transformació sobre endospermes de blat de moro de 12-15 DAP.	94
Figura 40. Comparació a nivell de seqüència aminoacídica entre les diferents PBF de cereals descrites.	95
Figura 41. Capacitat d'activació de PBF quimèrica sobre el promotor γZ en experiments de co-transformació sobre endospermes de blat de moro de 12-15 DAP.	96

CAPÍTOL 2

Figura 42. Similitud de seqüència entre la caixa AACA i els elements GARE.	99
Figura 43. Capacitat d'activació de GAMYB d'ordi sobre el promotor γZ en experiments de co-transformació sobre endospermes de blat de moro de 12-15 DAP.	101
Figura 44. Alineament de ESTs de blat de moro i dels gens GAMYB d'ordi i arròs.	103
Figura 45. Alineament de la EST 0903 de blat de moro amb els gens GAMYB d'ordi i arròs.	103
Figura 46. RT-PCR pel gen <i>ZmGAMYB</i> sobre RNA total de blat de moro.	104
Figura 47. Seqüència aminoacídica deduïda per GAMYB de blat de moro.	104
Figura 48. Alineament de seqüències de les proteïnes GAMYB de blat de moro, ordi, arròs i civada.	105
Figura 49. Alineament filogenètic de les proteïnes GAMYB de blat de moro, ordi, arròs i civada.	105
Figura 50. Anàlisi del patró d'expressió de <i>ZmGAMYB</i> per <i>Northern-blot</i> .	107
Figura 51. Nivells d'expressió relatius de <i>ZmGAMYB</i> , <i>ZmPBF</i> i del gen γZ respecte 18S rRNA.	108
Figura 52. Capacitat d'activació de mGAMYB sobre el promotor γZ en experiments de co-transformació sobre endospermes de blat de moro de 12-15 DAP.	110
Figura 53. Tinció histoquímica amb X-Gluc d'endospermes de blat de moro de 12 DAP co-transformats amb el promotor γZ i els efectors PBF i GAMYB.	111
Figura 54. Sobreexpressió de bdPBF a <i>E.coli</i> .	113
Figura 55. Sobreexpressió de GAMYB a <i>E.coli</i> .	114
Figura 56. Assaig de retard en gel de GAMYB amb la caixa AACA.	116
Figura 57. Assaig de <i>supershift</i> de GAMYB per αmyb sobre la caixa AACA.	118
Figura 58. Assaig de <i>supershift</i> de GAMYB per αGST sobre la caixa AACA.	119
Figura 59. Assaig de retard en gel amb GAMYB i PBF sobre la regió compresa entre -457 i -404 bp del promotor γZ .	121
Figura 60. Patró de proteïnes d'endosperma al llarg del desenvolupament separades per SDS-PAGE.	122

Figura 61. Producció d'anticossos policlonals contra GAMYB de blat de moro. Sobreexpressió a <i>E.coli</i> i titulació del sèrum α -myb.	124
Figura 62. Determinació del patró d'acumulació de GAMYB a blat de moro. Titulació de l'anticòs α -myb purificat.	126
Figura 63. Densitat nuclear en seccions d'endosperma en desenvolupament per marcatge amb DAPI.	128
Figura 64. Tinció de grànuls de midó sobre talls d'endosperma en desenvolupament amb lugol.	129
Figura 65. Detecció immunohistoquímica de GAMYB i PBF sobre talls d'endosperma en desenvolupament.	130
Figura 66. Localització cel·lular de GAMYB i PBF sobre talls d'endosperma a 15 DAP per immunodetecció i marcatge amb DAPI.	131
Figura 67. Localització cel·lular de GAMYB i PBF sobre talls d'endosperma a 20 DAP per immunodetecció i marcatge amb DAPI.	132
Figura 68. Localització subcel·lular de GAMYB i PBF sobre talls d'endosperma a 20 DAP.	133
Figura 69. Immunolocalització de GAMYB i PBF sobre talls d'embrió a 15 DAP.	134
Figura 70. Immunolocalització de GAMYB i PBF sobre talls d'embrió a 20 DAP.	134
CAPÍTOL 3	
Figura 71. RT-PCR pel gen <i>ZmFUSCA3</i> sobre RNA total de blat de moro.	139
Figura 72. Seqüència aminoàcida deduïda pel factor FUSCA3 de blat de moro.	139
Figura 73. Alineament de seqüències de les proteïnes FUSCA3 d'arabidopsis, blat de moro i arròs.	140
Figura 74. Anàlisi del patró d'expressió del gen <i>ZmFUSCA3</i> a blat de moro per <i>Northern-blot</i> .	142
Figura 75. Nivells d'expressió gènica relatius de FUSCA3, PBF i γ -zeïna respecte 18S rRNA.	142
Figura 76. Capacitat d'activació de FUSCA3 de blat de moro sobre el promotor γ Z en experiments de co-transformació sobre endospermes de blat de moro de 12-15 DAP.	144
Figura 77. Expressió de ZmFUSCA3 a <i>E.coli</i> .	146
Figura 78. Assaig de retard en gel de FUSCA3 sobre la caixa RY i <i>supershift</i> per α fus.	147
Figura 79. Assaig de competició de les sondes RY i RY* per la unió de FUSCA3 a la seva caixa.	148
Figura 80. Patró de proteïnes d'endosperma, embrió i aleurona separades per SDS-PAGE.	150
Figura 81. Producció d'anticossos policlonals contra ZmFUSCA3. Expressió a <i>E.coli</i> .	151
Figura 82. Determinació del patró d'acumulació de ZmFUSCA3 a blat de moro. Titulació de l'anticòs α -fus purificat.	152
Figura 83. Immunolocalització de FUSCA3 sobre seccions transversals d'endosperma en desenvolupament.	154
Figura 84. Immunolocalització de FUSCA3 sobre seccions transversals d'endosperma a 15 DAP i marcatge amb DAPI.	154
Figura 85. Immunolocalització de FUSCA3 sobre seccions transversals d'endosperma a 20 DAP i marcatge amb DAPI.	155
Figura 86. Localització subcel·lular de FUSCA3 sobre talls d'endosperma a 15 i 20 DAP.	156
Figura 87. Immunolocalització de FUSCA3 sobre seccions transversals d'embrió a 15 DAP.	157
Figura 88. Immunolocalització de FUSCA3 amb α pfus sobre seccions transversals d'embrió a 15 DAP per microscòpia confocal.	158
Figura 89. Immunolocalització de FUSCA3 amb α pfus i marcatge amb DAPI sobre seccions transversals d'embrió a 15 DAP per microscòpia confocal.	159

Figura 90. Immunolocalització de FUSCA3 sobre seccions transversals d'embrió a 20 DAP.	160
Figura 91. Immunolocalització de FUSCA3 amb α pfus sobre seccions transversals d'embrió a 20 DAP per microscòpia confocal.	161
Figura 92. Immunolocalització de FUSCA3 amb α pfus i marcatge amb DAPI sobre seccions transversals d'embrió a 20 DAP per microscòpia confocal.	162
Figura 93. Esquema dels oligos utilitzats en els assaigs d'unió (tipus <i>EMSA</i>) de PBF al promotor γ Z.	167
Figura 94. Model d'activació dels gens de l' α -zeïna i la γ -zeïna per factors tipus Dof i tipus bZip.	169
Figura 95. Arbre filogenètic de factors relacionats amb GAMYB d'ordi.	172
Figura 96. Seqüència diana per miR159 present als gens GAMYB.	175
Figura 97. Esquema dels oligos utilitzats en els assaigs d'unió (tipus <i>EMSA</i>) de GAMYB al promotor γ Z.	179
Figura 98. Arbre filogenètic de factors amb dominis B3 conservats.	182
Figura 99. Regions promotores de gens específics d'embrió amb elements RY.	187
Figura 100. Principals esdeveniments en el desenvolupament de la llavor a <i>Zea mays</i> i a <i>Arabidopsis thaliana</i> .	189

ABREVIACIONS

%: Tant per cent

A: Adenina

Aa: Aminoàcid

ABA: Àcid abscísic

Adh: Alcohol deshidrogenasa

Amp: Ampicil·lina

Amp^R: Resistència a ampicil·lina

APS: Amonium persulfate

BB: *Bifactorial box, Endosperm motif*

BSA: Albúmina sèrica bovina

C: Citosina

CaMV: Virus del Mosaic de la Col·i-flor

cDNA: DNA complementari

CDTA: Àcid *trans*-1,2-diaminociclohexà tetraacètic

Cfu: Unitats formadores de colònies

cpm: Comptes per minut

Ci: Curie

C-terminal: extrem carboxil

DAP: Dies després de la pol·linització

DEPC: Dietil pirocarbonat

dNTP: Desoxiribonucleòtids

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DO: Densitat òptica

DTT: Ditiotreitòl

EDTA: Àcid etilendiamín tetraacètic

EMSA: *Electroforetic Mobility Shift Assay*,
assaig de retard en gel

EST: *Expressed Sequence tag*

FUS: FUSCA

g: Grams

g: Força centrífuga relativa (*RCF*)

G: Guanina

GA: Gibberel·lines

GZM: *GCN-4 like zein motif*

h: Hores

His-tag: Cua d'hexa-His

IgG: Immunoglobulina de tipus G

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactòsid

Kan: Kanamicina

Kan^R: Resistència a kanamicina

Kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

LUC: Luciferasa

MCP: Mort cel·lular programada

min: Minuts

mL: Mililitres

mg: Milígrams

M: Molar

MEN: Tampó d'electroforesi per a *Northern*

MOPS: Àcid 2-(N-morfolín) etansulfònic

mRNA: RNA missatger

mS: Milisieverts

MU: Metilumbel·liferona

MUG: Metilumbel·liferil- β -glucurònid

mV: Milivolts

ng: Nanògrams

nm: Nanòmetres

Nos: Nopalina sintasa

N-terminal: Extrem amino

o/n: *Overnight*, 16-24h

pb: Parells de bases

Pb: *Prolamin box*

PBF: *Prolamin binding factor*

PCR: Reacció en cadena de la Polimerasa

PMSF: Fenilmetan-sulfonil fluoride

p/v: Relació pes/volum

RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends*

RE: Reticle endoplasmàtic

RNA: Àcid ribonucleic

rpm: Revolucions per minut

SDS: Dodecilsulfat sòdic

SDS-PAGE: Electroforesi en gels desnaturalitzats de poliacrilamida

seg: Segons

T: Timina

T^a: Temperatura

TA: Temperatura ambient

TNT: Transcripció i traducció

UV: Ultraviolada

V: Volts

v/v: Relació volum/volum

α Z: Gen de l'alfa-zeïna

γ Z: Gen de la gamma-zeïna

A les seqüències aminoacídiques:

F Phe, fenilalanina

L Leu, leucina

I Ile, isoleucina

M Met, metionina

S Ser, serina

P Pro, prolina

T Thr, treonina

A Ala, alanina

Y Tyr, tirosina

H His, histidina

Q Gln, glutamina

N Asn, asparagina

K Lys, lisina

D Asp, aspàrtic

E Glu, glutàmic

C Cys, cisteïna

W Trp, triptòfan

R Arg, arginina

G Gly, glicina

V Val, valina

