



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**“BASES FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE LA DORMICIÓN EN
CARIOPSES DE SORGO GRANÍFERO: IDENTIFICACIÓN DE
SITIOS REGULATORIOS DEL METABOLISMO DE GIBERELINAS Y
DE LA SENSIBILIDAD AL ABA”**

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área de Ciencias Biológicas

LIC. MARÍA VERÓNICA RODRÍGUEZ

Director: Ing.Agr. PhD. Roberto L.Benech-Arnold (FAUBA)

Consejero de Estudios: PhD. Norberto Daniel Iusem (FCEyN)

Lugar de Trabajo: Cátedra de Cerealicultura e IFEVA.

Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires

Año 2007

“BASES FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE LA DORMICIÓN EN
CARIOPSES DE *SORGHUM BICOLOR* (L.): IDENTIFICACIÓN DE SITIOS
REGULATORIOS DEL METABOLISMO DE GIBERELINAS Y DE LA
SENSIBILIDAD AL ABA”

RESUMEN

Esta tesis explora las bases fisiológicas y moleculares de los mecanismos que controlan la dormición en semillas de *Sorghum bicolor*, usando como sistema modelo dos líneas comerciales endocriadas con comportamiento contrastante para el brotado pre-cosecha (BPC): RedlandB2 (baja dormición, susceptible) e IS9530 (alta dormición, resistente al BPC). La imposición de un determinado patrón de salida de la dormición en sorgo (y otras especies) y su expresión en el grano embebido dependen principalmente de la acción antagónica del ácido abscísico (ABA) y de las giberelinas (GA). Para caracterizar a nivel molecular la acción de estas hormonas en el control de la germinación en cariopses dormidos y no-dormidos se midió la expresión por QPCR de un grupo de genes candidatos implicados en el metabolismo y señalización de las GA y la señalización del ABA. Estos patrones se compararon con mediciones de ambas hormonas, y con las respuestas de germinación. Los ensayos comparativos entre genotipos mostraron una menor acumulación de GA activas en el embrión durante la incubación de cariopses de IS9530, y una mayor expresión de diferentes genes implicados en la señalización del ABA y en la inactivación de GA. Paralelamente, el ABA exógeno redujo los niveles de GA activas, y los resultados apoyan un modelo en el cual el ABA promueve el catabolismo de GA mediante la inducción de genes de inactivación de GA. Adicionalmente se observó que *SbGAMYB*, un factor de transcripción involucrado en la germinación promovida por GA, está regulado por splicing alternativo. Los resultados en general muestran que los componentes analizados están altamente conservados entre sorgo y otras especies, aunque se observaron mecanismos de regulación durante la expresión de la dormición que resultan novedosos, y no fueron descritos en otras especies.

Palabras clave:

DORMICIÓN, SEMILLAS, BROTAO PRE-COSECHA, SORGO GRANÍFERO, CEREALES, HORMONAS, ÁCIDO ABSCÍSICO, GIBERELINAS, INTERACCIÓN HORMONAL, SPLICING ALTERNATIVO.

“PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BASES OF SEED DORMANCY IN
SORGHUM BICOLOR (L.) GRAINS: IDENTIFICATION OF REGULATORY SITES
OF GA METABOLISM AND ABA SIGNALING”

ABSTRACT

This project explored the physiological and molecular bases of the mechanisms underlying the expression of seed dormancy in grain sorghum (*S. bicolor*), by studying and comparing two inbred commercial lines with contrasting pre-harvest sprouting behavior: IS9530 (deep dormancy, sprouting resistant) and RedlandB2 (low dormancy, sprouting susceptible). The establishment of dormancy in the developing seed and its maintenance upon imbibition are both processes regulated hormonally, mainly by the antagonistic action of abscisic acid (ABA) and gibberellins (GA). The expression profiles of several candidate genes (identified after *in silico* search) involved in ABA signaling and GA metabolism, were determined by QPCR in dormant and non-dormant imbibed seeds. These results were then compared with the germination response and also with hormone profiles (GA metabolites and ABA) for both genotypes. Comparative assays for both genotypes showed that imbibed IS9530 seeds accumulate lower levels of active GA1+3 in the embryo and also display higher expression levels of genes involved in ABA signaling and GA inactivation. Also, ABA down-regulated GA levels in isolated embryos; gene expression results support that this is mediated by ABA promotion of GA inactivation genes. Additionally, expression analysis of a sorghum orthologue for *GAMYB* (a transcription factor involved in transcriptional control of GA response genes during germination) indicated that this gene is affected by alternative splicing and may be involved in the expression of dormancy. Results obtained so far indicate that the components included in this study are highly conserved at the sequence level in sorghum and other species, but regulation of these genes in imbibed sorghum seeds shows some new features not described before. These results add to the general understanding of the mechanisms underlying the expression of physiological dormancy in cereal seeds.

Key words:

SEEDS, DORMANCY, PRE-HARVEST SPROUTING, GRAIN SORGHUM, CEREAL CROPS, HORMONES, ABSCISIC ACID, GIBBERELLINS, HORMONAL INTERACTION, ALTERNATIVE SPLICING.

Agradecimientos

A Gustavo Gudesblat, mi Co-Director encubierto, por el aporte permanente de ideas, papers y entusiasmo. A Mirta Tinaro (Piti) y Guillermina Mendiando, mis compañeras del sorgo, por hacer de cada campaña de cultivo a campo y laboratorio una aventura. A Rodolfo Sánchez, por estar siempre dispuesto a discutir resultados y aportar ideas. A Norberto Iusem, por prestarme su laboratorio donde tuve la oportunidad de aprender los secretos de la PCR en tiempo real, además de conocer a un grupo de gente increíble, y que ahora son mis amigos: Silvana, Laura, Itatí, Gustavo, Paula, que de mil maneras contribuyeron a mi trabajo de todos los días mientras estuve ahí. A mi amiga Déborah Rondanini, por las muchas horas compartidas (en su mayoría tardías) en el IFEVA. A Roberto Benech-Arnold, mi Director, por confiar en (y financiar) todas mis propuestas, y dejarme actuar con total libertad, además de orientarme y obligarme a crecer como investigadora (debo reconocer que muchas veces en contra de mi voluntad). A mis amigos Sergio Líbenson y Paola Bacalini por su cercanía y apoyo logístico total durante todos estos años. A las autoridades del IFEVA y a mis compañeros de la Cátedra de Cereales, por darme siempre un lugar. A mis padres, Elvira y Carlos, por darme todo lo que necesité para hacer mi camino, este, que me hace feliz.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires, a la ANPCyT, y a CONICET por las becas otorgadas y por hacer posible este proyecto.

Le dedico esta tesis a mi hija Sofía Glionna (querida: no estás obligada a leerla). Casi todo es posible.

INDICE

• INTRODUCCIÓN	<u>1</u>
• OBJETIVOS E HIPÓTESIS	<u>14</u>
• METODOLOGÍA	<u>16</u>
• RESULTADOS. CAPÍTULO 1 <i>“Regulación a nivel transcripcional de componentes de la señalización del ABA durante la expresión de la dormición en sorgo granífero”.</i>	
Resumen e Introducción	<u>30</u>
Resultados	<u>36</u>
Conclusiones del Capítulo 1	<u>52</u>
• RESULTADOS. CAPÍTULO 2 <i>“Regulación del metabolismo de las giberelinas durante la expresión de la dormición en sorgo granífero”.</i>	
Resumen e Introducción	<u>53</u>
Sección A: <i>“Evolución del contenido de GA durante la incubación de las semillas”.</i>	<u>55</u>
Sección B: <i>“Expresión de genes del metabolismo de GA”.</i>	<u>64</u>
Sección C: <i>“Regulación de genes del metabolismo de GA”.</i>	<u>70</u>
Conclusiones del Capítulo 2	<u>73</u>
• RESULTADOS. CAPÍTULO 3 <i>“Regulación de SbGAMYB durante la expresión de la dormición en sorgo granífero. Evidencias de splicing alternativo.”</i>	
Resumen e Introducción	<u>76</u>
Resultados	<u>77</u>
Conclusiones del Capítulo 3	<u>87</u>
• RESULTADOS. CAPÍTULO 4 <i>“Interacción entre la acción del ácido abscísico y el metabolismo de las giberelinas en cariopses embebidos”.</i>	
Resumen e Introducción	<u>89</u>
Sección A: <i>“Evolución del contenido de GA y su regulación por ABA”.</i>	<u>91</u>
Sección B: <i>“Regulación de genes del metabolismo de GA por ABA”.</i>	<u>95</u>
Sección C: <i>“Efecto de las GA sobre genes de señalización del ABA”</i>	<u>99</u>
Conclusiones del Capítulo 4	<u>102</u>
• DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	
Discusión general y Conclusiones	<u>104</u>
Presentación de un modelo integrador	<u>110</u>
• BIBLIOGRAFÍA	<u>115</u>

INTRODUCCIÓN

Dormición y germinación

La dormición es el resultado de la acción de mecanismos que restringen de manera total o parcial el rango de condiciones ambientales en que puede ocurrir la germinación, y se detecta por comparación con la respuesta de germinación que se observaría en condiciones donde la dormición está ausente. El hecho de que la dormición se detecte como la ausencia de germinación ha presentado dificultades para distinguir entre factores que promueven la remoción de la dormición y factores que afectan a la germinación. Baskin y Baskin (2004) propusieron una definición bastante útil para el estudio experimental de la dormición: “una semilla dormida no será capaz de germinar dentro de un período de tiempo determinado aún en condiciones ambientales que resultarían adecuadas para la germinación de esas mismas semillas en ausencia de dormición”. Así, una semilla que ha perdido completamente la dormición, germinará dentro de un rango de condiciones ambientales que será el más amplio para semillas de esa especie. Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006) avalan esta definición, y además proponen que “la dormición es una propiedad intrínseca de las semillas que determina las condiciones ambientales que deben cumplirse para que pueda ocurrir la germinación”. Baskin y Baskin (2004) presentaron una clasificación de las diferentes formas de dormición encontradas en los diferentes taxa de las plantas vasculares. Brevemente, la dormición puede ser de origen morfológico (embrión inmaduro), físico (cubiertas impermeables) o fisiológico, y pueden encontrarse combinaciones de estas clases (ver review de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La dormición de origen fisiológico es la clase más común tanto en gimnospermas como angiospermas, e involucra la acción de fitohormonas que actúan sobre el potencial de crecimiento del embrión y/o sobre la resistencia de los tejidos que se oponen a la expansión del mismo. La dormición fisiológica resulta de la acción de una variedad de mecanismos regulados hormonalmente que culminan en el bloqueo del crecimiento del embrión en la semilla embebida; de no actuar estos mecanismos el crecimiento del embrión es reanudado como resultado del proceso de germinación. Estos mecanismos de bloqueo, presentes en una enorme variedad de especies de plantas superiores, se activan en alguna etapa durante el desarrollo de las semillas (luego de completarse la organogénesis del embrión) mientras están en la planta madre, y esto conduce a lo que se ha denominado dormición primaria. Generalmente las semillas de muchas especies mantienen un grado elevado de dormición hasta alcanzar la madurez fisiológica (MF; momento a partir del cual se interrumpe la conexión vascular con la planta madre). Luego de MF la dormición puede desaparecer con mayor o menor rapidez dependiendo principalmente del genotipo y en menor medida del ambiente, y con la pérdida de dormición se amplía el rango de condiciones ambientales en que las semillas pueden germinar. La duración de la dormición es variable aún dentro de una población de semillas provenientes de una misma planta. Una de las principales consecuencias ecológicas de la dormición en especies silvestres es que la germinación no puede ocurrir hasta pasado un tiempo suficiente para la dispersión de las semillas hasta distintos

microambientes, más o menos lejos de la planta madre. Las semillas de especies con dormición prolongada pueden permanecer semanas, meses ó incluso años formando parte del banco de semillas en el suelo; la presencia de semillas con diferentes niveles de dormición permite distribuir en el tiempo la germinación con la consecuente exploración de diferentes condiciones ambientales por parte de las plántulas emergidas.

En muchas especies la dormición además impone una serie de restricciones para la germinación, que solamente serán revertidas luego de que la semilla haya sido expuesta a factores ambientales específicos, que podrían considerarse como indicadores de un ambiente favorable para la posterior supervivencia de la nueva plántula. Por ej., una especie de maleza, *Polygonum aviculare*, requiere de bajas temperaturas durante varias semanas combinadas con ciclos de hidratación y desecación para acelerar la pérdida de la dormición, pero además de esto debe ocurrir una breve exposición a la luz para terminar con la dormición (Battla y Benech-Arnold, 2003) y esto es similar también a lo que sucede con *Arabidopsis thaliana* y *Datura ferox* (chamico). En otras especies, y entre estas se incluyen los cultivos de cariopses, la dormición se pierde gradualmente durante la post-maduración, aún cuando ésta ocurra en un ambiente seco y a temperatura constante (por ejemplo, en cariopses de cebada cosechados y almacenados hasta el momento de malteo) y no requieren de un “factor terminador” de la dormición. En contraste con las ventajas que pueda representar la dormición para el establecimiento exitoso de las plántulas de una especie en condiciones naturales, en los sistemas de producción agrícola (donde intervienen especies domesticadas y malezas), la presencia de una dormición prolongada o, alternativamente, la pérdida precoz de la dormición, pueden generar diferentes problemas para la siembra de un cultivo o la utilización de los cariopses cosechados (malteado, harina, siembra, etc.). Paralelamente, la presencia de dormición en especies de malezas dificulta su erradicación del banco de semillas del suelo en un sistema agrícola mediante prácticas convencionales que están basadas en la alta vulnerabilidad de las plántulas a la aplicación de herbicidas, mientras que las semillas enterradas en el suelo son resistentes.

La presencia de dormición se percibe de manera indirecta, y se mide como la ausencia de germinación de semillas viables incubadas en condiciones de humedad y temperatura adecuadas para la germinación de esa especie. Para una semilla, la detección de la dormición a través de la germinación resulta en una variable de respuesta binaria, aunque la dormición como hemos visto no es un proceso de “todo ó nada”. Sin embargo, para una población de semillas se puede cuantificar el nivel de dormición de manera continua a través del registro del número de semillas germinadas en determinadas condiciones de temperatura y humedad. La dormición puede afectar tanto la tasa de germinación como el porcentaje final alcanzado, y las variables que se suelen usar están basadas en uno o ambos parámetros. Por ej., el índice de germinación (IG, ver materiales y métodos) usado en algunas figuras de este trabajo considera el nº de semillas germinadas por día durante un período de 12 días en relación al total de semillas incubadas, ponderando positivamente aquellas que germinaron más temprano.

La expresión de un determinado nivel de dormición en general depende fuertemente de la temperatura de incubación de las semillas; por ej., en especies de cereales de invierno, como trigo y cebada, la dormición se expresa menos a

bajas temperaturas (i.e., entre 6 y 10°C) y se expresa más a temperaturas mayores a 20°C. Esto significa que una población de semillas de cebada con dormición va a germinar con mayor tasa y porcentaje final durante la incubación a 6°C con respecto a la incubación a 25°C. Si ese mismo lote de semillas se deja post-madurar el tiempo suficiente hasta la desaparición de la dormición, y luego se repiten los ensayos de incubación, el porcentaje final de germinación será máximo en ambas temperaturas, y solamente se verá el efecto de la temperatura sobre la tasa de germinación (y es posible discriminar este efecto de la temperatura mediante el ajuste de los datos a un modelo de tiempo térmico). Alternativamente, en especies de verano como el sorgo granífero, la dormición se expresa más fuertemente a temperaturas menores, mientras que su expresión es menor a temperaturas mayores (i.e., 30°C). La expresión de la dormición es aún menor cuando las semillas embebidas son expuestas a un régimen de temperaturas alternadas (20° / 30°C). En estos casos se desconoce aún cómo la temperatura actúa sobre los mecanismos de dormición. La inhibición de la germinación por alta temperatura (termoinhibición) está regulada a nivel del metabolismo del ABA, como se observó en semillas de cebada, lechuga y *Arabidopsis* (Benech-Arnold *et al.*, 2007; Dahal *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2006). En sorgo granífero y otras especies anuales de verano, la promoción de la germinación por alta temperatura no parece depender del metabolismo del ABA, y está asociada con cambios en la sensibilidad a las giberelinas (Benech-Arnold *et al.*, 2003).

La absorción de agua por una semilla que germina presenta un patrón trifásico. Al entrar en contacto con el agua del medio el peso fresco de la semilla aumenta más o menos rápidamente (dependiendo de variables físicas como la conductividad hidráulica de las cubiertas y el gradiente de potencial agua entre la semilla y el medio) debido al ingreso pasivo de agua hasta que se equilibran los valores de potencial agua de los tejidos y del medio; esta fase inicial de absorción de agua se denomina fase I de imbibición. Durante la fase II de imbibición, de tiempo variable (horas ó días ó semanas, según la especie) el contenido de agua permanece estable. Si las semillas no están dormidas, durante esta fase se retoma el metabolismo energético, se disparan mecanismos de reparación y el ciclo celular puede reiniciarse, mientras que los eventos asociados con la maduración de la semilla son suprimidos; se inicia la hidrólisis de reservas y el relajamiento de las paredes celulares y/o el ablandamiento localizado del endosperma (como ocurre por ej., en muchas especies de solanáceas) que culminarán con la expansión de la radícula. El crecimiento del embrión está acoplado a la absorción de agua, y esta etapa donde ocurre un nuevo aumento del peso fresco corresponde con la fase III de imbibición. La absorción de agua por parte del eje embrionario ocurre debido a una caída en el potencial agua de las células del mismo, resultado del relajamiento de las paredes celulares ó de la menor presión ejercida por los tejidos circundantes. La emergencia o protrusión de la radícula por fuera de las cubiertas seminales es, en la práctica, el indicador más común de que se ha completado la germinación, y el crecimiento posterior se considera post-germinativo.

Durante la incubación de una semilla dormida, el metabolismo de la misma se halla igualmente activo, pero no se reanuda el crecimiento del embrión y la fase II de imbibición se prolonga de manera indefinida. Se sabe que una gran cantidad de genes se “encienden” o se “apagan” durante la transición desde un

estado previo de semilla en desarrollo a un nuevo estado de plántula, y se han descrito patrones de expresión claramente distintos en semillas al pasar de un modo de desarrollo a un modo germinativo (Kermode, 1995; Bradford et al., 2000). Estudios previos muestran que procesos como la removilización de reservas y síntesis de precursores para la fotosíntesis son activados durante la incubación en semillas que van a germinar, mientras que éstos son reprimidos durante la imbibición en semillas dormidas, y están regulados a nivel transcripcional (Kermode, 1995; Bradford et al. 2000). Usando microarreglos Cadman et al., (2006) estudiaron el transcriptoma durante la incubación de semillas de *Arabidopsis* (usando un cultivar Cvi que exhibe una dormición más prolongada que otras accesiones y presenta además ciclos de dormición) dormidas y no dormidas, y comparando además situaciones de dormición primaria y secundaria; estos experimentos mostraron que existe un grado de superposición importante en el transcriptoma para los diferentes estados de dormición; los genes expresados están asociados con la embriogénesis tardía y muchos de ellos también aparecen en tejidos vegetativos sometidos a estrés y regulados por ácido abscísico.

Pérdida temprana de la dormición y brotado pre-cosecha en cultivos de cereales

La dormición está controlada genéticamente, aunque pueden existir interacciones con el ambiente. Algunas especies de cereales (i.e., cebada, trigo, sorgo granífero) presentan una amplia variabilidad intraespecífica para la dormición, y así pueden encontrarse genotipos de una misma especie con patrones altamente contrastantes para la salida de la dormición. La ocurrencia de genotipos con pérdida temprana de dormición (i.e., antes de la dispersión o de la cosecha de las semillas) es característica de especies que han sido objeto del mejoramiento por parte de las personas durante siglos, como cebada, trigo y sorgo, entre otros cereales. La necesidad de contar con semilla lista para germinar inmediatamente o unos pocos meses después de la cosecha constituyó una forma de selección a lo largo del tiempo que promovió la difusión de genotipos con baja dormición al momento de cosecha. Este proceso de selección “inconsciente” derivó en la difusión de cultivares con niveles de dormición extremadamente bajos.

El brotado precosecha (BPC) se define como la germinación anticipada del grano cuando el mismo se encuentra todavía en la planta madre. Este fenómeno ha sido descrito para cereales como trigo, sorgo, y cebada cervecera, y con menos frecuencia también en arroz y maíz. El brotado ocurre cuando las semillas presentan un bajo nivel de dormición y la maduración de los cariopses a campo coincide con períodos de lluvias y alta humedad ambiental. El BPC tiene consecuencias negativas para la utilización de los cariopses cosechados debido a que conduce a i) la pérdida inmediata de viabilidad de las semillas producidas como resultado de la desecación subsecuente, cuando el proceso de germinación ha avanzado más allá del “punto de no retorno”, el cual se define por la emergencia de la radícula y la consecuente pérdida de tolerancia a la desecación; ii) la hidrólisis del almidón en el endosperma, lo que resulta no solamente en una disminución del peso del grano (y por lo tanto del rendimiento), sino también en la creación de un ambiente favorable para el ataque de hongos saprófitos (Castor and Frederiksen, 1977) y, para el caso del trigo, la pérdida de

aptitud para la elaboración de harina; iii) un acortamiento significativo en la longevidad potencial de las semillas, aún cuando el proceso de germinación ha comenzado pero no ha avanzado más allá del “punto de no retorno” (en este caso no hay radícula visible, se denomina pre-germinado), lo cual reduce el tiempo en que un lote de semillas puede ser almacenado antes de su siembra (Hofmann and Steiner, 1994). El cúmulo de conocimientos acerca de las bases fisiológicas y moleculares de la resistencia al BPC proviene de estudios llevados a cabo con cada uno de esos cereales (trigo, cebada y sorgo granífero) en forma individual. Sin embargo, la información obtenida hasta el presente indica que operan mecanismos similares en las distintas especies analizadas.

En los últimos años han aumentado enormemente los conocimientos a nivel molecular de los mecanismos involucrados en el control de la dormición. En este sentido, numerosos estudios basados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* han contribuido a caracterizar la participación de hormonas (ABA, GA, Etileno, Brasinosteroides, etc.) en la dormición a través del uso de mutantes de síntesis y de señalización. Más recientemente, estudios con microarreglos dieron testimonio de los profundos cambios que ocurren en el transcriptoma cuando una semilla pasa de un modo “de dormición” a un modo “germinativo”, y actualmente el énfasis está puesto en la identificación de los responsables primarios de estos cambios globales, por un lado, y de la caracterización de elementos regulatorios comunes en los grupos de genes que se co-expresan. Paralelamente, y aunque gran parte de los componentes de las vías (o redes) de señalización de hormonas están altamente conservados entre especies, los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la dormición parecen operar de maneras distintas entre *Arabidopsis* y especies de cereales. Resulta entonces necesario abordar estudios en otras especies con valor productivo con el fin de caracterizar los mecanismos de dormición que son propios de ellas y de especies filogenéticamente cercanas, aprovechando la información generada en *Arabidopsis* pero a la vez prestando atención a las diferencias (Nambara *et al.*, 2003).

Entre las causas por las cuales los mejoradores aún no han logrado controlar la herencia de este carácter en cereales se puede destacar que la dormición fisiológica es un carácter cuantitativo y de origen complejo, que involucra múltiples genes, y se han identificado numerosos QTL en diferentes genotipos de varias especies. La dormición fisiológica no está necesariamente asociada con variables morfológicas, como el color de las cubiertas, que permitan un fácil seguimiento. El nivel de dormición cambia durante el desarrollo y post-maduración de las semillas en la planta madre, y muestra interacción significativa con el ambiente del cultivo, y esto hace difícil la caracterización de los genotipos y el “fenotipeado” de gran cantidad de plantas individuales como es necesario para estudios de QTL; adicionalmente, la observación de brotado en las panojas depende no solo del nivel de dormición adquirido por las semillas, sino de las condiciones del ambiente en la etapa previa a la cosecha (lluvias, humedad persistente, temperatura adecuada). Todo esto contribuye a que la dormición de origen fisiológico sea un carácter esquivo para los mejoradores. Cabe mencionar que, aparte de la dormición de las semillas, caracteres morfológicos, como la estructura de la panoja o la espiga (según la especie) pueden contribuir a la respuesta al BPC; una estructura más compacta favorecerá la retención de agua de lluvia y mantendrá a las semillas en estado de imbibición por más tiempo.

La necesidad de contar con otras especies modelo alternativas a

Arabidopsis y que a la vez posean valor productivo, ha derivado en proyectos como la secuenciación del genoma de arroz, y en aproximaciones a cubrir el genoma y el transcriptoma (mediante secuenciación de GSSs –*genomic survey sequences*- e ESTs –*expressed tag sequences*-) en sorgo y maíz, entre otras especies. Esta información, clasificada y volcada en bases de datos accesibles a través de Internet mediante herramientas bioinformáticas, constituye actualmente un aporte fundamental al estudio de las bases moleculares de la dormición en estas especies. Entre estas especies de cereales actualmente usadas como sistemas modelo para estudios moleculares, el sorgo granífero cuenta con ventajas decisivas frente a otras especies con metabolismo C4 como el maíz y la caña de azúcar (ambas tetraploides), ya que por ser diploide tiene un genoma de menor tamaño y esto facilita la realización de estudios genéticos, análisis de QTL y tareas de secuenciación. El tamaño aproximado del genoma de sorgo granífero es de 770Mb, organizado en 2n=20 cromosomas. Adicionalmente, y comparando el maíz con el sorgo, el maíz posee una dormición muy leve, solo detectable en condiciones poco favorables para la germinación (i.e., bajas temperaturas), pero aunque este cultivo puede eventualmente sufrir brotado pre-cosecha, los cariopses están protegidos del brotado por las “chalias” que recubren la espiga y evitan en alguna medida el agua de lluvia.

Adicionalmente, el sorgo granífero presenta una alta variabilidad intraespecífica para la resistencia al brotado pre-cosecha y el patrón de salida de la dormición. Existen genotipos de sorgo que mantienen altos niveles de dormición durante varias semanas después de MF y son resistentes al BPC, en contraste con otros genotipos que pierden precozmente la dormición y son susceptibles al brotado.

Rol del ABA en el control de la dormición en semillas: Componentes de la señalización del ABA identificados y evidencias experimentales que demuestran su participación en la dormición.

Se sabe que la diferente susceptibilidad al brotado pre-cosecha en varias especies de cereales está asociada con la sensibilidad que presentan los embriones al efecto inhibitorio del ABA. La obtención de mutantes de *Arabidopsis* resistentes al ABA durante la germinación y de mutantes vivíparos de maíz ayudó a identificar varios componentes implicados en la señalización de esta hormona. Las semillas de los mutantes *abi3*, *abi4* y *abi5* (*aba-insensitive*) son defectuosas en la acumulación de sustancias de reserva, y estos mutantes fueron aislados por tener germinación resistente al ABA (review de Finkelstein *et al.*, 2002). Sin embargo, solamente *abi3* exhibe menor dormición, mientras que *abi4* y *abi5* tienen dormición normal. Por otro lado, el mutante *vp1* de maíz (*VP1* es ortólogo de *ABI3*) produce semillas vivíparas, capaces de germinar aún sin el aporte externo de agua. Estos tres genes, *VP1/ABI3*, *ABI4* y *ABI5*, son factores de transcripción del tipo B3, AP2 y bZIP respectivamente (Finkelstein *et al.*, 2002; Nakabayashi *et al.*, 2005) y actúan positivamente en la señalización del ABA a través de la inducción de la transcripción de genes que participan en procesos promovidos por ABA en la semilla, como la acumulación de reservas, adquisición de la tolerancia a la desecación (síntesis de proteínas LEA) y bloqueo de la germinación. También se han identificado proteínas fosfatasa pertenecientes a la clase PP2C, como *ABI1* y *ABI2* de *Arabidopsis* (y sus ortólogos en otras especies), que regulan negativamente la señalización del ABA (González-García

et al., 2003).

En los casos en que se logró manipular el nivel de expresión de estos genes y/o de las proteínas codificadas, se obtuvieron cambios en la dormición de las semillas. Particularmente, McKibbin *et al.* (2002), encontraron que el transcripto del gen *VP1* de trigo (ortólogo de *ABI3*) presenta formas múltiples debido a un proceso de *splicing* “anómalo” que genera transcriptos de tamaño y estructura variables; esto se asoció con menores niveles de la proteína *VP1* en su forma funcional, y una mayor susceptibilidad al BPC. Este mismo grupo generó plantas transgénicas de trigo expresando el gen *VP1* de *Avena fatua*, que carece de estas formas de *splicing* alternativo, y éstas mostraron una mayor resistencia al BPC. Sin embargo, no hay evidencias de que este *splicing* “anómalo” ocurra en genotipos susceptibles al brotado en otros cereales. En sorgo granífero, luego de clonar y secuenciar *VP1* en dos genotipos con respuesta contrastante al BPC, no se encontraron diferencias a nivel de secuencia, aunque la expresión de *VP1* resultó ser mayor durante la imbibición en semillas dormidas (Carrari *et al.*, 2001). Por otro lado, la sobreexpresión de *ABI5* en semillas de *Arabidopsis*, aunque no inhibió la germinación, resultó en una hipersensibilidad al ABA en semillas y plántulas (López-Molina *et al.*, 2001). Otro componente de la señalización del ABA cuya manipulación derivó en niveles de dormición alterados es una fosfatasa de tipo PP2C (ortóloga de *ABI1/2*) aislada de una especie de *Fagus* (González-García *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *FsPP2C1* en plantas de *Arabidopsis* resultó en una reducción de la dormición, consistente con una función de regulador negativo de la señalización del ABA descrita para los ortólogos de estas proteínas en *Arabidopsis*. Otro componente de la señalización del ABA que fue caracterizado en detalle en semillas, esta vez de trigo, es PKABA1 (Johnson *et al.*, 2002). Esta proteína-quinasa es más abundante en semillas dormidas y participa en la supresión de la expresión génica promovida por el ABA en semillas. Entre los numerosos genes cuya expresión es reprimida en presencia de PKABA está el gen que codifica para alfa-amilasa. Johnson *et al.* (2002) demostraron que un sustrato para la fosforilación por PKABA1 es el ortólogo de *ABI5* en trigo, TaABF. La evidencia de estos autores sugiere que el factor de transcripción TaABF/*ABI5* serviría de sustrato para la fosforilación por PKABA1 en la vía de señalización del ABA durante la maduración de las semillas, expresión de la dormición y en la supresión de la expresión génica en respuesta al ABA.

El ABA no está solo: Balance ABA / GA en el control de la dormición.

Estudios realizados con mutantes ABA-deficientes e insensibles en maíz y con inhibidores de hormonas en sorgo muestran que es el balance hormonal ABA/GA lo que determina el establecimiento y la expresión de un determinado patrón de dormición (White *et al.*, 2000 a y b; Steinbach *et al.*, 1997). La pérdida de dormición en diferentes especies está asociada con la pérdida de sensibilidad al efecto inhibitorio del ABA y un aumento en la sensibilidad al efecto promotor de las GA (Finch-Savage, 2006). White *et al.* (2000 a) mostraron que la germinación de semillas de maíz requiere del efecto promotor de las GA solo cuando existe una inhibición por acción del ABA; si se elimina este bloqueo, por ejemplo en un mutante deficiente para la síntesis de ABA, la germinación puede ocurrir en ausencia de GA.

Los puntos de interacción posibles para los actores involucrados en el balance hormonal ABA/GA en el control de la germinación podrían darse en

varios niveles diferentes, y recientemente se describió una dimensión de esta interacción a nivel molecular; numerosos genes que contienen en su región promotora secuencias cis-regulatorias ABRE y cuya expresión se induce por ABA, también responden, pero de manera opuesta, a las giberelinas (GA) (Yamaguchi and Kamiya, 2002; Ogawa *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2004). Mediante el uso de microarreglos en *Arabidopsis*, Yazaki *et al.*, (2004) mostraron que ambas hormonas actúan, de manera opuesta, en la activación/represión de un gran conjunto de genes; se encontraron secuencias específicas en la región promotora de estos genes para el pegado de factores de transcripción propios de la vía de cada una de ambas hormonas. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias de una interacción entre estas dos hormonas que involucre otros niveles, como por ej. la alteración de los niveles de las GA por acción del ABA. Según mediciones preliminares de GA endógenas durante la incubación de embriones de sorgo en presencia de ABA, los niveles endógenos de GA podrían estar regulados negativamente por acción del ABA. Este bloqueo de la síntesis de GA por el ABA debería ser confirmado mediante análisis más detallados, incluyendo la expresión de genes de metabolismo de GA en respuesta al ABA. Esto podría aportar información valiosa en relación a los modos de interacción de ambas hormonas en el control de la dormición y otros procesos gobernados por el balance ABA/GA.

Rol de las giberelinas en la imposición y expresión de la dormición:

Evidencias fisiológicas de su participación en la imposición de la dormición en el desarrollo temprano y promoción de la germinación en el grano embebido.

A pesar de que la evidencia obtenida para semillas de sorgo y otros cereales sugieren un rol principal del ABA en el establecimiento de la dormición y su expresión en el grano embebido, la acción de esta hormona por sí sola no explica totalmente el diferente comportamiento de cariopses inmaduros de líneas de sorgo granífero con resistencia contrastante al BPC (Steinbach *et al.*, 1995). El efecto promotor de la germinación de las GA se halla bien documentado para semillas maduras de numerosas especies (Hilhorst, 1995). Sin embargo, no se le había prestado atención al papel que jugaban en el control de la germinación en semillas inmaduras y en la expresión de diferentes niveles de dormición a partir de la imbibición, a pesar de que es conocido desde hace tiempo que esta hormona se acumula en niveles importantes durante el desarrollo de semillas de muchas especies (Khan, 1982; Lange, 1998). Utilizando inhibidores de la biosíntesis de giberelinas (GA), Steinbach *et al.* (1997) pusieron en evidencia el papel de la síntesis de GA durante una etapa temprana del desarrollo (hasta los 11 DPA) en la imposición de un determinado patrón de salida de la dormición en sorgo granífero: panojas de sorgo granífero tratadas con paclobutrazol inmediatamente después de anthesis produjeron cariopses que permanecían dormidos por un lapso de tiempo mucho mayor que los controles sin tratar. El requerimiento de GA para la germinación en cariopses maduros de maíz no ha quedado claro aún a partir del análisis de mutantes GA deficientes. Sin embargo, los mutantes *vp5* de maíz no sintetizan ABA y son vivíparos, pero este fenotipo se revierte en el doble mutante *vp5-d1* que es ABA y GA deficiente. Las semillas maduras *vp5-d1* (ABA y GA deficientes), aunque generan plántulas albinas y de crecimiento lento, son capaces de germinar. Esto muestra que la imposición de la dormición en maíz depende del balance ABA-GA, y sugiere que en ausencia de ABA la germinación de las semillas maduras se independiza de las GA endógenas (White *et al.*, 2000

a). En semillas de *Arabidopsis* los niveles de GA₄ (una GA activa) aumentan durante la imbibición y se anticipan por unas horas a la emergencia de la radícula, mientras que mutantes GA-deficientes no germinan a menos que se les agregue GA de forma exógena. El agregado de GA al medio de incubación también promueve la germinación de cariopses dormidos de una línea de sorgo resistente al BPC (Steinbach *et al.*, 1997), de manera similar a lo que ocurre en cariopses dormidos de cebada y otras especies. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que posiblemente el menor nivel de dormición que presentan los cariopses inmaduros de líneas susceptibles al BPC se exprese no sólo a través de una menor sensibilidad de sus embriones al ABA, sino también a través de una mayor producción de GA a partir de la imbibición.

El sorgo granífero como sistema modelo para el estudio de la regulación hormonal de la dormición; un poco de historia...

Desde hace más de 15 años el grupo de Dr. Benech-Arnold de la Facultad de Agronomía (UBA) viene trabajando en el estudio de las bases fisiológicas y moleculares de la dormición en cereales. El modelo experimental utilizado constó desde el principio de dos líneas endocriadas de sorgo con susceptibilidad contrastante al BPC: la línea RedlandB2, susceptible al BPC, con cariopses que salen de la dormición mucho antes de la madurez fisiológica, y la línea IS9530, resistente al BPC y con cariopses que poseen una dormición que se prolonga más allá de la madurez de cosecha (ver Fig.1). En los primeros trabajos con este sistema experimental se puso en evidencia que, aunque los cariopses presentan una dinámica de salida de la dormición contrastante, los embriones de ambas líneas son capaces de germinar rápidamente (24 horas) luego de ser separados cuidadosamente del endosperma y pericarpio e incubados en agua (Fig.2), aun desde los 15 días después de anthesis (DPA) (Steinbach *et al.*, 1995). Esto sirvió para demostrar el papel de las cubiertas (endosperma + pericarpio) en la expresión de la dormición, y que el diferente comportamiento frente al BPC de ambas líneas se relaciona con la duración de la dormición impuesta por las cubiertas (en la pág.12 se muestra un corte esquemático de un cariopse de sorgo granífero con el detalle de los tejidos que rodean al embrión). El mismo trabajo sirvió para sugerir que, al igual que en semillas de otros cereales, el ácido abscísico (ABA) podría formar parte de los mecanismos de imposición y expresión de la dormición, que en estas líneas funcionan en forma contrastante: a pesar de que el contenido de ABA es similar durante el desarrollo en embriones de ambas líneas, los embriones de la línea IS9530 son 10 veces más sensibles al efecto inhibitorio de la germinación ejercido por el ABA, que los embriones de la línea RedlandB2 (i.e. para inhibir la germinación de embriones RedlandB2 se necesita una concentración 10 veces más alta de ABA que la necesaria para inhibir la de embriones IS 9530) (Steinbach *et al.*, 1995). El papel del ABA en la expresión de la dormición en cariopses incubados a diferentes temperaturas también fue puesto en evidencia utilizando el mismo sistema experimental (Benech-Arnold *et al.*, 1995). El uso de sustancias que interfieren con la biosíntesis de ABA (fluridone) y GA (paclobutrazol) permitió no sólo acumular más evidencia a favor de un papel para el ABA en la imposición de un determinado patrón de salida de la dormición, sino que además permitió por primera vez sugerir el rol de las GA como antagonista del ABA en la determinación de ese patrón (Steinbach *et al.*, 1997). Más recientemente, Benech-Arnold *et al.*, (2003) mostraron que el antagonismo

ABA/GAs también opera en la expresión de la dormición en cariopses incubados a diferentes temperaturas: la menor expresión de la dormición en cariopses incubados a altas temperaturas se asoció con una mayor sensibilidad a las GA, medida como la capacidad de concentraciones decrecientes de GA para revertir el efecto de una concentración inhibitoria de ABA en embriones aislados.

Lijavetzky *et al* (2000), utilizando el sistema RedlandB2 x IS9530, mostraron que el carácter de dormición (medido como el índice de germinación en un momento fijo después de MF) presenta variación continua en poblaciones segregantes, y encontraron dos QTLs no ligados entre sí que en forma conjunta explican mas del 80% de la varianza fenotípica observada. Uno de estos QTLs estaba ligado al marcador RFLP UMC3 que en maíz está ligado al gen *VP1*, que codifica para un factor de transcripción (McCarty *et al.*, 1991). Las plantas de maíz mutantes para este gen no tienen afectado el metabolismo del ABA, pero sus semillas son vivíparas y, de manera similar a los materiales susceptibles al BPC, muestran una marcada reducción en la sensibilidad a la acción inhibitoria del ABA sobre la germinación. Tomados en conjunto, estos resultados apoyaban la posible participación del ortólogo de *VP1* de sorgo en la resistencia al BPC. Después de clonar, secuenciar, mapear y analizar la expresión de *VP1* durante la ontogenia e incubación de cariopses RedlandB2 e IS9530, los autores llegaron a las siguientes conclusiones: i) las secuencias de *VP1* obtenidas para IS9530 y RedlandB2 indican que la proteína sería igualmente funcional en ambas líneas (Carrari *et al.*, 2001a; Carrari *et al.*, 2001b); ii) no existe correlación entre el nivel de expresión del gen a lo largo de la ontogenia de los cariopses y la sensibilidad al ABA que presentan los embriones de una y otra línea (Carrari *et al.*, 2001a); iii) *VP1* no mapea dentro de ninguno de los 2 QTLs identificados por Lijavetzky *et al.* (2000) (Carrari *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que *VP1* no está involucrado en la imposición de la diferente dinámica de la salida de la dormición de los cariopses a lo largo de la ontogenia a través del control de la sensibilidad de los embriones al ABA, lo que significó un cambio de paradigma en el estudio de la resistencia al BPC en cereales. Sin embargo, la mayor expresión de *VP1* observada durante la imbibición de los cariopses de IS9530 (el genotipo resistente al BPC) comparado con el RedlandB2, sugiere que este factor de transcripción está involucrado positivamente en la expresión de la dormición a través de una mayor actividad de señalización del ABA.

Con el fin de identificar otros elementos de la señalización del ABA involucrados en la expresión (i.e., en el grano embebido) de diferentes niveles de dormición, es que se propone analizar la expresión de los ortólogos de otros genes *ABI* (además de *SbVP1*) en sorgo granífero. La actividad de uno o varios de estos componentes en la expresión de mayores niveles de dormición en semillas embebidas podría estar regulada diferencialmente a nivel transcripcional en genotipos con diferente sensibilidad al ABA (sin descartar la existencia de otras instancias de regulación post-transcripcional). Se espera observar que la expresión de alguno de estos genes en semillas embebidas de sorgo granífero muestre una asociación positiva con mayores niveles de dormición.

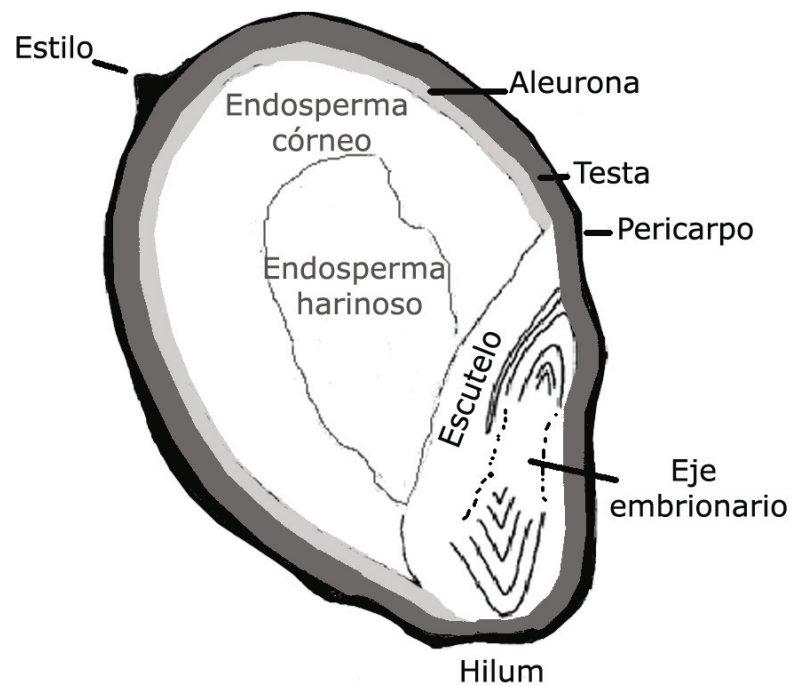
En relación a la participación de las giberelinas (GA) en la expresión de la dormición en sorgo granífero, la información reunida hasta el inicio de esta tesis en el año 2003, no era suficiente para extraer conclusiones con respecto a la síntesis *de novo* de GA y la germinación en cariopses de sorgo granífero. En experimentos realizados por Steinbach *et al.*, (1997) la incubación de las semillas

en presencia de paclobutrazol (un inhibidor de la síntesis de GA) no afectó la germinación al cabo de 48 h, y esto se mantuvo para cariopses cosechados en diferentes momentos del desarrollo. Aunque no se puede considerar un dato concluyente, esto sugiere que la síntesis *de novo* no es un proceso activo durante la incubación. Por otro lado, diferentes mediciones realizadas con cariopses de estas dos líneas de sorgo mostraron un aumento en el contenido de GA activas durante las primeras 24 h de incubación, y este aumento fue mayor en muestras que exhibieron mayores porcentajes de germinación (Pérez-Flores *et al.*, 2003; Benech-Arnold *et al.*, 2003). Los mismos autores clonaron en sorgo el gen que codifica para una enzima clave de la síntesis de GA, GA20-oxidasa, y analizaron su expresión en el embrión durante la incubación de los cariopses. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de este gen (en el embrión) aumentó significativamente en cariopses de RedlandB2 (baja dormición) mientras que los niveles de expresión alcanzados fueron menores para IS9530 (alta dormición) (Pérez-Flores *et al.*, 2003). Estos resultados apoyan una posible participación de este gen en la diferente regulación de la síntesis de GA entre estos genotipos y en relación con la diferente dormición que expresan. Sin embargo, se sabe que el metabolismo de GA es complejo y depende de la actividad de numerosas enzimas de síntesis y de catabolismo, varias de las cuales estarían reguladas negativamente por producto (GA activas). Esto permite plantear la importancia de otras instancias de regulación, como por ejemplo, otras enzimas de la biosíntesis, o, paralelamente, a nivel de la inactivación de GA.

Aunque estos datos de GA y expresión de la GA 20-oxidasa apoyan una síntesis *de novo* diferencial en cariopses de ambos genotipos, una posible objeción es que las mediciones de hormonas no se extendieron nunca más allá de las primeras 24 h, y estas GA “tempranas” podían provenir de la hidrólisis de conjugados y no de la síntesis *de novo*. Por ejemplo, Rood y Pharis (1983) detectaron la liberación de GA4 a partir la hidrólisis de conjugados con glucósidos durante la germinación de cariopses de maíz; la hidrólisis de estos conjugados se logró luego de una hidrólisis ácida (incubación durante 6 h con HCL 1N). Por lo tanto queda aún por demostrar la relevancia de la síntesis *de novo* de GA para la germinación y su regulación durante la expresión de diferentes niveles de dormición.

La caracterización fisiológica llevada a cabo durante los últimos años en torno a los procesos detrás de la respuesta contrastante al BPC en ambas líneas de sorgo permitió identificar los siguientes procesos como los que están siendo regulados diferencialmente entre genotipos y que contribuyen al balance ABA/GA: i) La sensibilidad de los embriones al efecto inhibitorio del ABA y, posiblemente, ii) el diferente metabolismo de las giberelinas. La sensibilidad a las GA, medida como la pendiente de respuesta a concentraciones crecientes de GA en embriones incubados en presencia de una concentración inhibitoria de ABA, no mostró diferencias entre genotipos (Benech-Arnold *et al.*, 2000). Por otro lado, el metabolismo del ABA durante el desarrollo y durante la incubación tampoco fue diferente entre genotipos. Por lo tanto, en la presente tesis se exploró una posible regulación a nivel transcripcional de los procesos fisiológicos relevantes en la expresión de diferentes niveles de dormición; particularmente, se estudiaron a nivel transcripcional los genes de diferentes componentes de la señalización del ABA y su correspondencia con la diferente sensibilidad al ABA, y también se analizó la expresión de genes del metabolismo de GA, además de confirmar la

observación de mayores niveles de GA durante la incubación de cariopses despiertos en contraste con cariopses más dormidos.



Esquema de un corte longitudinal transversal de un cariopse maduro de sorgo granífero mostrando: el pericarpo (que incluye: cutina, epicarpo, mesocarpo, cél. tubulares y cruzadas, testa, pedicelo, y estilo), el endosperma córneo y el endosperma harinoso, la aleurona, y el embrión (que incluye el escutelo y el eje embrionario). El largo aproximado del cariopse es de unos 3-4 mm.

Fig. 1: Evolución del índice de germinación (ver materiales y métodos) para cariopses de IS9530 y RedlandB2 cosechados en diferentes días post- antesis e incubados en agua a 25°C. A los 50 días post-antesis (DPA) se cosecharon los cariopses maduros (para evitar el brotado a campo) y se almacenaron en bolsas de papel a temperatura ambiente. Los ensayos posteriores a 50 DPA se hicieron con semilla post-madurada en estas condiciones (datos del año 2002). Las curvas mostradas en esta figura pueden variar significativamente entre años debido a un importante efecto del ambiente del cultivo; sin embargo, el contraste observado entre genotipos es siempre en la misma dirección.

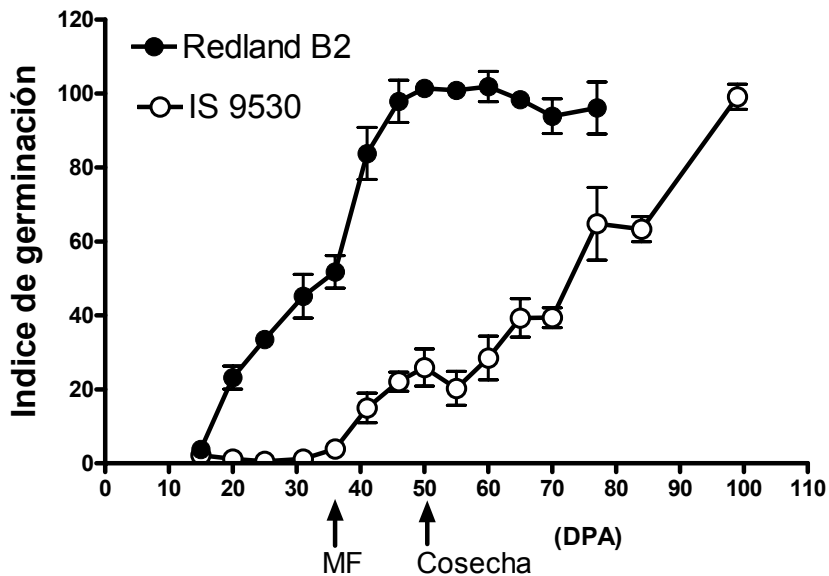
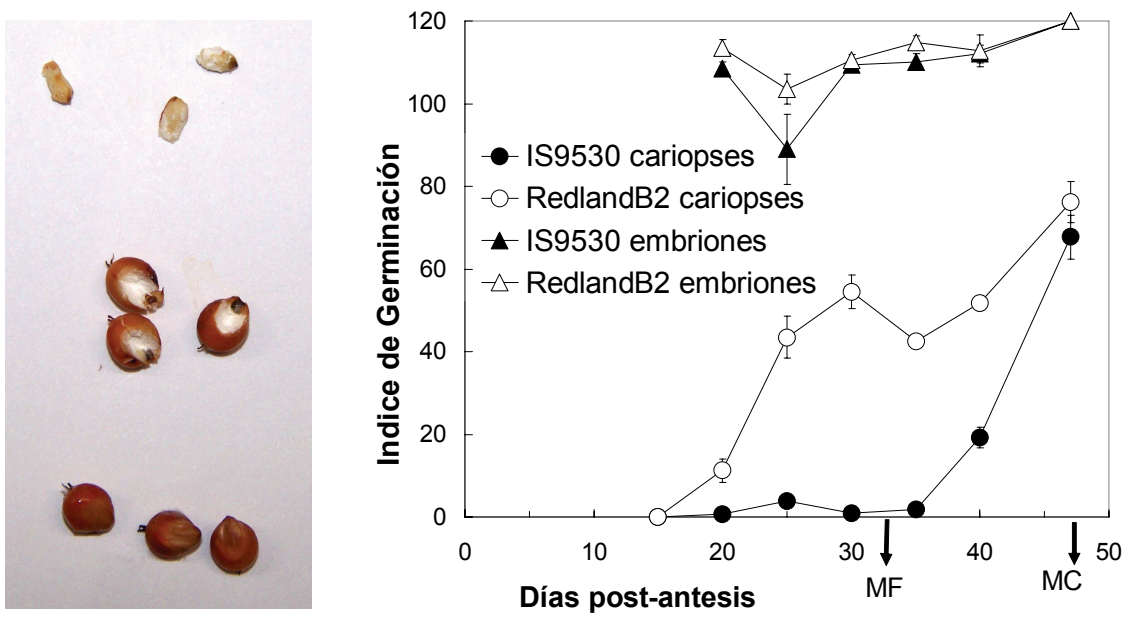


Fig.2: A) Cariopses de sorgo enteros (abajo), y embriones aislados (arriba) luego de separarlos del endosperma y pericarpo. **B)** Evolucion de un índice de germinacion (calculado según Steinbach *et al.*, 1995) obtenido en diferentes momentos del desarrollo para embriones aislados (triángulos) o para cariopses (circulos) incubados a 25°C sobre papel de filtro + agua destilada en cajas de Petri, para dos genotipos (IS9530, alta dormición y RedlandB2, baja dormición; campaña 2003).



OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El objetivo general de este trabajo fue identificar componentes del balance ABA / GA que cumplieran un rol regulatorio en la expresión de la dormición en semillas de sorgo granífero. Específicamente se buscó identificar aquellos componentes involucrados en la señalización del ABA y el metabolismo de las GA que estuvieran regulados diferencialmente a nivel transcripcional en situaciones de dormición contrastante. Partiendo de la hipótesis general de que estas vías metabólicas y de señalización de hormonas, así como la secuencia de los genes involucrados y la función de sus productos, están altamente conservados en diferentes especies, se trabajó con un grupo de genes candidatos seleccionados en base a información generada con otras especies que sirven como modelo para estudios moleculares (como *Arabidopsis* y arroz) con el objetivo de trasladar esta información a (y contrastarla con) una especie de interés agronómico, pero menos estudiada a nivel molecular, como el sorgo granífero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) ampliar el conocimiento de las bases moleculares de la diferente sensibilidad al ABA que presentan los embriones de sorgo con niveles de dormición contrastantes a través del análisis de la expresión de genes candidatos que en otras especies han sido involucrados en la modulación de la sensibilidad al ABA y/o en la señalización del ABA;
- b) evaluar la participación del metabolismo de las GA en la expresión de diferentes niveles de dormición durante la incubación de cariopses de sorgo provenientes de dos líneas con alta y baja dormición (IS9530 y RedlandB2 respectivamente) o con diferente tiempo de desarrollo (i.e., cariopses inmaduros de 30 DPA y cariopses maduros de más de 40 DPA, en los cuales ya ha comenzado la salida de la dormición);
- c) identificar, de entre los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de GA, aquellos con responsabilidad regulatoria de la síntesis diferencial de GA activas en semillas de líneas con susceptibilidad contrastante al BPC. Este objetivo se perseguirá a partir del análisis de la expresión de genes del metabolismo de GA y de la medición de los niveles endógenos de GA (precursores, GA activas, y catabolitos);
- d) evaluar la existencia de una interacción entre el ABA y el metabolismo de las GA; esto se hará mediante la cuantificación de GA y el análisis de expresión de genes de metabolismo de GA durante la incubación de embriones en presencia o ausencia de ABA exógeno.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

I - El nivel de dormición de cariopses inmaduros de sorgo se expresa como un balance entre la acción del ABA y las giberelinas (GA) en el embrión, cuyo resultado está determinado por la sensibilidad al ABA, y la capacidad de producir GA durante la incubación. En particular,

- i) La menor sensibilidad al ABA que presentan los embriones de cariopses con baja dormición obedece a una diferente actividad transcripcional para alguno de los genes que codifican para componentes de la señalización del ABA (como ABI1/ABI2, ABI3, ABI4, ABI5, PKABA1). Esta diferente sensibilidad al ABA se reflejara tambien en una diferente expresión de un gen regulado por ABA, como el *RAB28*.
- ii) Los cariopses con baja dormición (i.e., RedlandB2) alcanzan mayores niveles de GA activas en el embrión durante la fase II de imbibición, en comparación con embriones de cariopses con alta dormición (i.e., IS9530), en los cuales los niveles de GA se mantienen bajos y la germinación no se completa. Esta diferente acción de las GA se reflejará también en una diferente expresión del gen que codifica para GAMYB, un factor de transcripción inducible por GA y necesario para la producción de alfa-amilasas durante la germinación.
- iii) La menor producción de GA durante la incubación en cariopses dormidos está regulada a nivel transcripcional, a través de la inhibición de la expresión de genes que codifican para enzimas clave en la biosíntesis de GA (i.e. GA 20-oxidasa, GA 3 β -hidroxilasa y/u otras), o de la mayor expresión de genes que codifican para enzimas que inactivan GA, como las GA-2 oxidasas.
- iv) El ABA regula negativamente la biosíntesis de GA en el embrión durante la incubación de cariopses de sorgo. Esto debería verse como un menor contenido de GA durante la incubación de embriones de sorgo en presencia de ABA en comparación con los embriones en agua.
- v) El ABA interfiere con el metabolismo de las giberelinas a través de la inhibición de uno o varios genes de la biosíntesis de GA, y/o a través de la inducción de la expresión de genes del catabolismo de GA.

METODOLOGÍA

Elección de la metodología

La metodología general para abordar el análisis de las bases moleculares de la distinta sensibilidad al ABA (objetivo específico “a”) y de la regulación de la biosíntesis de GA (objetivo específico “c”) incluyó las siguientes etapas:

- 1) Búsqueda bibliográfica de genes conocidos involucrados en los procesos de establecimiento de la dormición o control de la germinación en semillas, y genes de enzimas de la biosíntesis de GA en cereales y otras especies.
- 2) Identificación de secuencias de sorgo para los genes “candidatos”: la mayoría de estos genes “candidatos” no han sido clonados en sorgo, aunque sí se han secuenciado en otras especies de cereales, como arroz, trigo o maíz; sin embargo las secuencias de más de 200,000 ESTs (*expressed sequence tags*) y 590,000 GSSs (*genomic survey sequences*) de *Sorghum bicolor* están disponibles en Internet (<http://www.plantgdb.org/>) ofreciendo la posibilidad de identificar, mediante el uso de programas de comparación de secuencias (blast), aquellas secuencias de sorgo con distinto grado de identidad con una determinada secuencia “candidata” perteneciente a otra especie; por ejemplo, *ABI5* de *Hordeum vulgare*, (código de acceso al GeneBank: AY150676) tiene una alta identidad con el EST de sorgo BE125130 (identidad de ambas proteínas: 91% [75 de 82 aa], positivos: 95% [78 de 82 aa]). La validez de la secuencia así obtenida se establece mediante la comparación de la secuencia encontrada traducida a proteína contra todas las proteínas conocidas y que están disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); solamente se aceptarán aquellas secuencias de cuyo blast de proteínas surja inequívocamente la proteína buscada (y sus ortólogos, si es que se ha clonado en varias especies). Adicionalmente a la búsqueda de un alto grado de identidad “global” para la secuencia de sorgo y el gen candidato, se considerará en cada caso particular y dependiendo de si se conocen, la presencia de los sitios conservados necesarios para la funcionalidad específica de la proteína. En estos sitios se espera que la identidad sea muy alta (>90%), en contraste con otras partes de la proteína que admiten mayor variación ya que en ellas no se encuentra un sitio regulatorio o catalítico. En el caso de pertenecer el EST o GSS a un CONTIG (secuencia compuesta a partir del empalme -mediante algoritmos especiales- de varios EST o GSS), se identifica el extremo 3’ del CONTIG, y se diseñan los primers sobre esta región para maximizar la probabilidad de que el templado esté presente en el cDNA luego de la transcripción reversa.
- 3) Análisis de expresión de cada gen a partir de muestras de RNA de sorgo mediante RT-QPCR (transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa o en tiempo real; se relativiza la expresión de cada gen al nivel de un gen de referencia de expresión constitutiva, como actina o ubiquitina).

- 4) Análisis de la correspondencia entre los patrones de expresión de cada gen con procesos fisiológicos como la germinación o evolución de niveles de GA; esto permitirá plantear asociaciones funcionales entre un gen y el proceso fisiológico en cuestión. Por ejemplo, la expresión de un gen clave en la regulación de la biosíntesis de GA en cariopses con distinto nivel de dormición (i.e., de líneas con distinta susceptibilidad al BPC) debería estar asociada positivamente a un incremento en los niveles endógenos de GA activas o precursoras durante la incubación (y anticipándose ambos procesos a la emergencia de la radícula). De manera inversa, la expresión de este gen “clave” debería estar reprimida en cariopses con un alto nivel de dormición, y corresponderse con una menor acumulación de GA activas.

De las diferentes técnicas disponibles para el análisis de expresión de genes (como northern-blot y revelado con radioactivo), la técnica de RT-QPCR tiene una alta sensibilidad frente a otras técnicas; esta técnica es apropiada para analizar de manera cuantitativa los niveles de mRNA de genes aún con muy bajos niveles de expresión, como puede ocurrir con genes que codifican, por ejemplo, para factores de transcripción (como los genes *ABI*) o genes que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de hormonas (como por ej., *GA20-oxidasa*, *GA3 β -hidroxilasa*). Además esta técnica permite la medición rápida y simultánea de una cantidad mayor de muestras (96 reacciones en una corrida de 2 h y 30 min). Se utilizó un equipo de PCR en tiempo real marca Applied Biosystems, modelo 7500, con SYBRgreen como indicador para la cantidad de DNA doble cadena sintetizado y ROX como pigmento de referencia del volumen de muestra de reacción. Este equipo se encuentra en el laboratorio de UV del Dr. C. Ballaré en el IFEVA (CONICET-FAUBA).

La cuantificación de GA endógenas se hizo con un cromatógrafo de gases acoplado con un detector de masas (GC-EIMS). Esta técnica es la más indicada para la detección de diferentes compuestos en una misma muestra, y es comúnmente utilizada por los grupos que trabajan con hormonas de plantas. Las muestras de los experimentos del año 2004 fueron procesadas siguiendo un protocolo descrito en Gaskin *et al.*, (1985) y en Benech-Arnold *et al.* (2003). Este protocolo contempla el uso de GA deuteradas (producidas bajo supervisión del Dr. Lew Mander, Australian National University, Canberra, Australia) como estándares internos para la identificación y cuantificación de las distintas especies de GA.

Potenciales limitaciones de la metodología

La aproximación propuesta para la detección de genes relevantes en la expresión de diferentes niveles de dormición en líneas de sorgo con susceptibilidad contrastante al BPC se basa en el análisis de los patrones de expresión de un conjunto reducido de genes “candidatos” y la correlación de estos patrones con parámetros fisiológicos relevantes, como la germinación o la evolución del contenido de hormonas. Estos genes candidatos fueron seleccionados en base a lo que se conoce de la participación del ABA y las GA en la dormición en estas líneas de sorgo, y el análisis de su expresión podría mostrar hasta que punto los mismos están implicados en la diferente expresión de la

dormición en ambos genotipos. Sin embargo se pueden destacar como limitaciones en esta aproximación los siguientes puntos:

No serían detectables mediante este método proteínas cuya acción diferencial dependa solamente de eventos post-transcripcionales, o que sea consecuencia de una mutación que afecte la funcionalidad de la proteína, sin por ello presentar un patrón de expresión diferente a nivel de mRNA. Podrán detectarse todas aquellas situaciones que resulten en la expresión diferencial (comparando tratamientos y genotipos) de un gen candidato, ya sea porque existe una asociación positiva entre el proceso observado, o negativa, por ej., como resultado de un mecanismo de regulación negativa de un gen mediada por su propio producto.

- Al trabajar con dos líneas endocriadas diferentes surge la posibilidad de que se observen diferencias en el nivel o patrón de expresión de un gen que respondan a un factor asociado al genotipo distinto del fenómeno de la dormición. La correspondencia entre el comportamiento de un determinado gen y la dormición se evaluará, además del análisis comparativo entre genotipos, a partir de ensayos donde se manipularán los niveles de ABA y GA.

- Aunque se encuentre que el patrón de expresión para un gen candidato (p.ej., un factor de transcripción involucrado en la señalización del ABA) es diferente entre los genotipos estudiados, esto no es suficiente para establecer una relación funcional entre este gen y el fenotipo de dormición, o para decir que ese gen es el responsable primario del fenotipo de dormición; la transcripción de dicho gen podría estar a su vez regulada por otros factores cuya actividad está diferencialmente regulada durante la expresión de la dormición en la semilla embebida. La secuenciación del gen y su promotor en ambas líneas permitirá también evaluar si la diferente expresión se debe a una alteración de un elemento *cis* en la región promotora del gen, o si depende de un factor *trans*. Aún así, resulta valioso caracterizar el comportamiento de estos genes candidatos en este sistema en el cual poco se conoce a nivel molecular hasta hoy; de encontrarse diferencias, quedará planteado el análisis de su rol regulatorio principal o secundario para futuras investigaciones donde se podría manipular directamente la expresión de estos genes en sorgo o en otra especie, por ej., a través de RNAi (RNA de interferencia) para inhibir su expresión durante la incubación de las semillas, ó, de encontrarse variantes alélicas, evaluar su funcionalidad a través del clonado y expresión en otro sistema más accesible actualmente para esta clase de manipulaciones, como *Arabidopsis*.

- El hecho de que no haya rasgos visibles que distingan a una semilla dormida de otra que no lo está hasta que la germinación ha ocurrido, plantea un problema metodológico para el estudio de los eventos en la fase II de imbibición y donde se expresan los genes particulares de la dormición; aunque se evalúa la etapa previa a la observación de semillas germinadas (radícula visible), algunas muestras estarán compuestas parcialmente por semillas que permanecerán dormidas y no germinarán, y semillas menos dormidas y que germinarán en las condiciones del experimento. Las mediciones bioquímicas (expresión de genes, niveles de hormonas) se basan en muestras de semillas que pueden incluir entonces dos fracciones diferentes: aquellas semillas que no están dormidas y van a germinar (si se las deja el tiempo suficiente) y aquellas que no lo harán en las condiciones del ensayo, debido a que están dormidas. Por lo tanto las mediciones realizadas durante la etapa previa a la detección de semillas germinadas (ie., radícula visible)

estarán siempre condenadas a ser el promedio de los valores aportados por ambas fracciones, y no es posible separar por completo los procesos de germinación y dormición. En muestras de semillas donde la germinación es nula debido a un alto nivel de dormición, este problema es menor, ya que existe una mayor homogeneidad para el nivel de dormición y los procesos que ocurren en las semillas que componen esa muestra.

A diferencia de otras especies como *Arabidopsis* y maíz, para sorgo granífero no se han identificado mutantes que tengan afectada la señalización del ABA o la dormición, y que puedan ser contrastados con un mismo fondo genético. Por otro lado, al inicio de este proyecto en 2003 y aún hoy la tecnología de microarreglos es muy costosa y los chips de sorgo no constituyen un producto estandarizado y accesible como en *Arabidopsis*. En este contexto, aparece como válida la opción de llevar adelante el análisis de expresión de un conjunto de genes candidatos, y realizar estudios comparativos con genotipos que exhiban patrones contrastantes para la salida de la dormición, como las líneas endocriadas que se usaron en este estudio. Estas líneas establecen un vínculo entre los estudios de dormición y el brotado pre-cosecha, ya que ambos genotipos tienen un comportamiento contrastante para este carácter en situaciones de campo y además dieron origen a muchas variedades comerciales usadas en la actualidad. Por otro lado, dado que los mecanismos de transducción de señales y las rutas metabólicas de hormonas como ABA y GA se hallan altamente conservados entre especies, es que se propone avanzar en la identificación de genes implicados en la expresión de la dormición (y de la susceptibilidad al BPC) en sorgo a través del análisis de una selección de genes candidatos. La obtención de las secuencias de estos genes dependerá de las secuencias GSS y EST presentes en las bases de datos de PlantGDB. Al no estar completamente secuenciado el genoma ni el transcriptoma de sorgo cuando se realizaron las búsquedas de las secuencias de los genes candidatos (durante 2005 y 2006), podrían existir secuencias de genes homólogos que no se detecten y por lo tanto no se puedan incluir en este análisis.

Procedimientos generales

Material vegetal y cultivo:

Para todos los experimentos que se describen a continuación se utilizaron dos líneas de sorgo granífero con susceptibilidad al brotado pre-cosecha (BPC) contrastante: IS9530 (resistente al BPC) y RedlandB2 (susceptible al BPC). La semilla fue originalmente provista por el banco de germoplasma de Novartis S.A. en 1995 y luego replicada en la FAUBA. Para la obtención de semilla para los experimentos, se sembraron manualmente las líneas mencionadas en el campo experimental de la FAUBA a mediados de noviembre en distintos años (2002, 2003 y 2005) siguiendo un diseño de bloques al azar (3 bloques), sobre una superficie total de aproximadamente 250 m², dejando una distancia entre surcos de 70 cm, y la distancia entre plantas dentro cada surco fue de 15 cm. Las plantas fueron etiquetadas individualmente e identificadas en una planilla según su posición dentro del cultivo, y se registró la fecha de antesis. El momento de antesis se determinó visualmente como la presencia de anteras en la parte media de la panoja (la floración es basípeta; la floración completa de la panoja puede demorar hasta 5-6 días según las condiciones ambientales). Las prácticas de manejo del cultivo fueron las convencionales: se regó por manualmente por aspersión durante todo el ciclo del cultivo; se fertilizó con urea dos veces (120 k/Ha en total), una a las dos semanas después de la emergencia y una segunda vez durante el período de encañazón. Se controlaron los ataques de hongos e insectos con aplicaciones periódicas de funguicida y cipermetrina más dimetoato (no se realizaron aplicaciones durante la época de antesis para no afectar a los polinizadores, aunque la fecundación es principalmente autógena). A partir del primer tercio del período de llenado de cariopses (unos 10 días después de antesis), todo el cultivo se cubrió con una red anti-pájaros, montada sobre una estructura de madera por encima de las plantas de sorgo (la disminución de la radiación debido a la red fue del 11% y homogénea para toda la superficie del cultivo).

Cosecha de cariopses para los ensayos y monitoreo del nivel de dormición:

A partir de las planillas de registro de antesis, se identificaron grupos de plantas por bloque y por genotipo que tuvieran la misma fecha de antesis, y los "grupos de antesis" así obtenidos (compuestos por 10 - 20 plantas por bloque y genotipo) se asignaron a los diferentes experimentos o al monitoreo de la dormición. Para el monitoreo de la salida de la dormición las plantas asignadas se muestrearon periódicamente (mediante la cosecha de una ramita con unos 50 cariopses de la parte media de la panoja, de 8 plantas tomadas al azar en cada muestreo dentro del "grupo de antesis") a partir de los 15-20 días post-antesis (DPA) y hasta madurez de cosecha, mediante ensayos de germinación y cálculo de un índice de germinación (IG) según Steinbach *et al.* (1995).

En todos los casos las semillas cosechadas se trillaron manualmente (las glumas se remueven fácilmente, ya que solamente recubren la base del cariopse) y se agruparon en una sola muestra por bloque y por genotipo. De este *pool* de semillas se pusieron a incubar muestras de 50 cariopses por caja de Petri, por triplicado (50 cariopses / caja de Petri sobre papel filtro + 6ml de

agua destilada). El valor promedio de las tres réplicas para un mismo bloque se consideró como una repetición ó duplicado biológico. Las semillas se incubaron a 25°C durante 12 días en cámaras con temperatura controlada en el IFEVA, FAUBA (las cajas de Petri se aleatorizaron dentro de la cámara). Se hicieron recuentos diarios de germinación (retirando de la caja las semillas germinadas con una pinza). Las semillas no fueron protegidas de la luz ambiental durante los recuentos, y dentro de las incubadoras permanecieron en oscuridad. En algunos casos se calculó un índice de germinación (IG) según se describe en Steinbach *et al.*, 1995, o se graficaron los datos como evolución del porcentaje de germinación a lo largo del período de incubación.

Ensayos de incubación para extracción de RNA y medición de hormonas:

Para cumplir con los objetivos propuestos en esta tesis se hicieron los siguientes experimentos, presentados en orden cronológico:

- En marzo de 2003 (campaña 2003) se llevó a cabo un ensayo para evaluar la posible interferencia del ABA sobre la síntesis de GA (objetivo específico “d”, hipótesis “v”): se disectaron embriones de cariopses recién cosechados (provenientes de cariopses de 40 DPA de ambas líneas, dos bloques por genotipo = dos repeticiones) y se incubaron a 25°C en cajas de Petri (50 embriones / caja) con papel de filtro y 5 ml de a) agua destilada ó b) 50uM ABA (SIGMA Co., USA). Al cabo de diferentes tiempos de incubación, se congelaron los embriones para la extracción de hormonas (200 embriones por tubo). Paralelamente se hicieron ensayos de sensibilidad al ABA durante el desarrollo del cultivo.
- Febrero a abril de 2003 (campaña 2003): se cosecharon cariopses para el monitoreo de la salida de la dormición; para evaluar una posible síntesis de GA *de novo* (en relacion con el objetivo específico b) se incubaron cariopses en agua y también en soluciones de dos inhibidores de la biosíntesis de GA: paclobutrazol (1g/L) (CRESTAR) ó 100 uM prohexadiona. Para cada tratamiento (solución) se incubaron tres réplicas (cajas de Petri con 50 cariopses) por bloque y genotipo, a 25°C.
- Marzo de 2004 (campaña 2004): Para abordar los objetivos específicos a), b) y c), se incubaron (25°C) cariopses enteros en agua provenientes de IS9530 y RedlandB2 cosechados en una etapa donde ambas líneas presentan niveles moderados a altos de dormición (antes de MF, 30 DPA). Al cabo de diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras de embriones para la posterior extracción de RNA y de hormonas (y poner a prueba las hipótesis ii, iii y iv).
- Marzo de 2004 (campaña 2004): para evaluar la posible interferencia del ABA sobre la expresión de genes del metabolismo de GA (objetivo específico “d”, hipótesis “v” y “vi”), se disectaron embriones de cariopses recién cosechados (30 DPA) y se incubaron a 25°C en cajas de Petri con papel de filtro y a) agua ó b) 50uM ABA. Al cabo de diferentes tiempos de incubación, se congelaron muestras para extracción de RNA y hormonas.
- Durante marzo y abril de 2006 (campaña 2006) se repitió el experimento de incubación con cariopses cosechados a los 30 DPA del 2004, y además se hizo otro experimento similar donde se incubaron cariopses enteros en agua

de ambas líneas cosechados a los 42 DPA. En este momento los cariopses ya alcanzaron la madurez fisiológica y ha comenzado la salida de la dormición; los cariopses de RedlandB2 presentan un nivel de dormición bajo (RedlandB2) y los cariopses de IS9530 moderado o aún elevado. Todos los experimentos realizados este año fueron hechos a 20°C, con el objetivo de favorecer la expresión de la dormición. Para evaluar una posible regulación negativa (inhibición por producto) de los diferentes genes de biosíntesis de GA (objetivo específico "c"), se modificó el contenido de GA en cariopses durante la incubación; paralelamente a las incubaciones de ambos genotipos en agua a 20°C y en ambos momentos del desarrollo (30 y 42 DPA), se incubaron cariopses de IS9530 (alta dormición) en una solución 100uM GA₃₊₄ y cariopses de RedlandB2 (baja dormición) en una solución de paclobutrazol (1g / L; CRESTAR). Se tomaron muestras para extracción de RNA a los mismos tiempos que para los controles en agua. La observación de una asociación negativa entre la expresión de algunos genes de síntesis de GA y el nivel de dormición de las semillas derivó en la formulación de una sexta hipótesis:

vi) "Algunos genes de biosíntesis de GA podrían estar regulados negativamente por producto, y esto resulta en una relación inversa entre los niveles de GA y la expresión de estos genes".

Para cada ensayo de incubación y muestreo de RNA y hormonas, se seleccionó una fecha de antesis que incluyera suficientes plantas por bloque y por genotipo, de tal manera que todas las semillas utilizadas en un mismo experimento tuvieran el mismo tiempo desde antesis además de haberse desarrollado bajo las mismas condiciones ambientales. El mismo día del inicio del ensayo, se cosecharon cariopses de la parte central de la panoja (2do tercio) de unas 10-12 plantas para cada uno de dos bloques y por genotipo. Las semillas cosechadas se trillaron manualmente (eliminando las glumas) y se agruparon en una sola muestra por bloque y por genotipo. De este *pool* de semillas se pusieron a incubar muestras de 50 cariopses por caja de Petri, sobre papel filtro + 6ml de agua destilada. La cantidad de cajas incubadas dependió de la cantidad y tamaño de las muestras (para hormonas o RNA, y tiempos de incubación). Las incubaciones se iniciaron de manera escalonada en el tiempo (horas de diferencia) de manera tal de tener tiempo para disectar los embriones para las diferentes muestras manteniendo el mismo tiempo de incubación entre tratamientos o duplicados. El mismo día en que se cosechó el material para cada experimento, se disectaron los embriones correspondientes al tiempo cero (sin incubar) y se inició la incubación de las semillas que luego fueron muestreadas y congeladas en las horas o días sucesivos, según un cronograma de tiempos de incubación. Al cabo de cada tiempo de incubación se disectaron los embriones (eliminando restos de endosperma y pericarpio) y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido (para RNA: 80 embriones por tubo; para cuantificación de hormonas: 120 embriones) y luego se almacenaron en freezer a -80°C hasta su procesamiento. Los tiempos de incubación se ajustaron al patrón de germinación particular al momento del ensayo, de manera de obtener al menos cuatro muestreos en la etapa previa a la emergencia de radícula de hasta el 20% de la población de semillas; en las muestras donde se encontraron

cariopses germinados (radícula visible), éstos fueron excluidos de las muestras para extracción de RNA o GA debido a que representan una etapa post-germinativa. Paralelamente, se incubaron tres réplicas por bloque y genotipo en iguales condiciones para el monitoreo de la germinación durante 12 días.

Búsqueda “in silico” de secuencias de genes ortólogos de sorgo para los genes candidatos; bioinformática

Una vez seleccionados los genes candidatos para analizar su expresión se siguió una serie de pasos para la búsqueda e identificación de secuencias ortólogas en sorgo granífero (*Sorghum bicolor*):

1. Para cada gen candidato se buscó en la base de datos GeneBank la secuencia correspondiente para *Arabidopsis* y al menos otra especie monocotiledónea evolutivamente más próxima al sorgo, por.ej, maíz o arroz.
2. La secuencia proteica (aa) correspondiente a cada gen candidato se usó como referencia (*Query*) en el servidor de PlantGDB usando el programa de búsqueda tBlastn; este programa busca alineamientos locales entre una secuencia de aminoácidos y secuencias de nucleótidos en una base de datos definida; para lograr esto, el programa traduce cada secuencia de nucleótidos presente en la base de datos seleccionada en seis secuencias de aa según los seis marcos de lectura teóricos posibles, y las compara con la secuencia de referencia ó *Query*. El output del programa presenta un ranking de secuencias con identidad significativa con la secuencia de referencia ó *Query*; el nivel de significancia de cada alineamiento está expresado por el valor E (*E-value*) y por los bits. El *E-value* es la probabilidad de encontrar una secuencia con mayor *score* (puntaje) dentro de esa base de datos; cuando el *E-value* es igual a cero, indica que la secuencia encontrada es idéntica a la referencia, y que no existe otra secuencia con mayor identidad. El *score* considera el nº de “aciertos” y penaliza los “desaciertos” y los “gaps” (cuando está ausente una base); el alineamiento es localizado, por lo cual el alineamiento se interrumpe ante la presencia de intrones y esta clase de interrupciones no se penaliza (no entran en el cálculo del *score*).
3. Análisis de los EST's y GSS contigs de sorgo obtenidos mediante tBlastn: se identifican aquellas secuencias no redundantes (por ej., varios ESTs pueden superponerse entre sí, también pueden estar incluidos en un GSS contig). Utilizando las secuencias de ADN de sorgo como *Query* se hace un nuevo tblastx (*translated blast; translated nt sequence vs protein database*) contra todas las proteínas (*non-restricted*) del GeneBank. Se confirma la identidad putativa de la secuencia de sorgo solamente si las proteínas más parecidas de toda la población de proteínas conocidas y registradas en GeneBank corresponden a la candidata original (generalmente aparecen proteínas ortólogas de distintas especies, u homólogas de una misma especie).
4. Finalmente se traduce la secuencia de sorgo (que es de ADN) a los 6 marcos de lectura posibles mediante la función “6-frame translation” en el servidor BCM search launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/readseq.html>). La identificación del marco de lectura apropiado se hace mediante la comparación con las secuencias de referencia. La posibilidad de comparar EST's y ADN genómico (GSS-contigs) de sorgo, además del

alineamiento con secuencias homólogas conocidas, aporta a la identificación y confirmación de límites de intrones y exones.

5. Alineamiento de la proteína putativa de sorgo y las ortólogas conocidas, para localizar dominios relevantes, zonas más o menos conservadas, etc. Para el alineamiento múltiple se usaron programas disponibles en el servidor LALIGN: Clustal Wallis (versión 1.8) y Boxshade. Los resultados para cada gen candidato se muestran en el ANEXO de esta tesis.

Medición de hormonas

La purificación y cuantificación de giberelinas (GA) en las muestras del experimento de embriones en agua y ABA (campaña 2003) se hizo mediante un protocolo similar al citado en Steinbach *et al.* (1997). Para identificar y cuantificar las distintas especies de GA se agregaron 100 ng de GA deuteradas [²H₂]-GA_{1/3/4} como estándares internos (producidos bajo supervisión del Dr.L. Mander, Australian National University, Canberra, Australia). Se incluyó también 100 ng [²H₂]-ABA para la cuantificación de esta hormona. La separación y detección de GA se hizo por GC-MS en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Río Cuarto en el año 2003. La extracción de las muestras se hizo en metanol 80 % - H₂O 20 % con 1 % ácido acético (con un pH estimado cercano a 5).

Las muestras del experimento con cariopses inmaduros enteros (campaña 2004) se enviaron al Laboratorio de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza), donde fueron procesadas y analizadas bajo supervisión del Dr. Rubén Bottini durante el año 2006. Hasta el momento de las mediciones las muestras liofilizadas se conservaron en freezer a -20°C. En este caso se usó un protocolo modificado con respecto al usado en mediciones anteriores. A continuación se describe en detalle el nuevo protocolo de extracción, que difiere del anterior en cuanto un paso adicional que consiste en el uso de columnas de C18 que permiten un grado de purificación aún mayor, apropiado para la detección de una cantidad mayor de compuestos de la vía metabólica de las GA. En este caso también se trabajó con dos condiciones de pH contrastantes durante la extracción en metanol – agua, debido a que se exploró la posible existencia de formas conjugadas de GA reversibles a pH ácido.

- Protocolo para la extracción y purificación de GA:

Cada muestra de embriones (almacenada a -80°C) fue liofilizada, molida en un mortero, y pesada (cerca de 400 mg / peso seco, 120 embriones). A una mitad de cada muestra (unos 200 mg) se le agregaron 1000 uL de 80% metanol en agua y 1% de ácido acético (pH = 3.0) dentro de un tubo de vidrio. Luego de sonicar durante 6 minutos, se dejó extrayendo en reposo a 4 °C durante 12 h en oscuridad. La otra mitad de cada muestra se extrajo de la misma forma pero en este caso no se acidificó el pH de la fase acuosa del metanol 80%, y fue de 7.0. El resto del protocolo fue el mismo para ambos sets de muestras. Al cabo de este período se le agregaron 100 ng de cada uno de los compuestos deuterados [²H₂]-GA_{1/3/4/8/9/17/19/20/24/25/34/51} (L. Mander, Australian National University, Adelaide, Australia) y [²H₂]-ABA como estándares internos, más BHT (Sigma Chem Co, St Louis, MO, USA) como antioxidante, dejando equilibrar durante una hora en baño

de hielo; luego se centrifugaron los tubos durante 10 min a 10.000 g a 4 °C. El metanol del sobrenadante se evaporó en un speed-vac y al extracto acuoso remanente se le ajustó el pH a 3.0 con ácido acético y se particionó tres veces con un volumen igual de acetato de etilo saturado con 1% de ácido acético (pH 2.8-3.0). La fracción de acetato de etilo se evaporó y el residuo fue disuelto en agua pH 3.0 y cargado en una columna Sep-Pack C18 (Waters Associates, Milford, MA, USA) previamente lavada con agua y secuencialmente lavada con agua bi-destilada, 80 % metanol - 1 % ácido acético, 100 % metanol, y finalmente 0.25 % ácido fosfórico. La columna se enjuagó con agua bi-destilada a pH 3.0, y la muestra fue finalmente eluida por triplicado con 300 uL de metanol. Las fracciones de metanol unidas en una sola se secaron bajo flujo de N₂, se re-disolvieron en un pequeño volumen de methanol, y se metilaron con un exceso de diazometano etéreo recién preparado (preparado de diazald, M. González Sierra, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Tras la evaporación del solvente bajo flujo de N₂ los extractos se liofilizaron, fueron re-disueltos en piridina y derivatizados con BSTFA 1 % (Sigma Chem Co) por 1 h a 80°C de manera de obtener derivados Me-TMSI previo al análisis de GC-EIMS. Después de la evaporación de los solventes bajo flujo de N₂ el extracto se disolvió en 50 uL de hexano, y se inyectó 1 uL en el modo split-split less en un sistema GC-MS (PerkinElmer Clarus 500, Atlanta, GA, USA). La columna usada fue una PerkinElmer Elite-5MS, cross-linked methyl silicone capillary column (30m largo, 0.25mm diámetro interno, y 0.25µm de espesor) eluída con helio (1 mL min⁻¹). El programa de temperatura del GC fue de 100°C a 190°C a 15°C min⁻¹, luego de 190°C a 260°C a 5°C min⁻¹. El impacto electrónico fue de 70 eV. La caracterización de las GA se hizo con un modo de *full scan* y el espectro obtenido comparado con los espectros de estándares verdaderos GA_{1/3/4/8/9/17/19/20/24/25/34/51}, o espectros de masa disponibles en Internet del sitio (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>) para GA_{5/29/97/110}. La cantidad de cada especie de GA en los extractos se calculó por comparación del área de los picos obtenidos para los iones parentales para los derivados Me/Me-TMSi de los estándares deuterados internos, y los derivados Me/Me-TMSi de las GA endógenas. Los análisis se hicieron por duplicado (dos inyecciones de cada muestra).

- *Medición de ABA mediante técnica de radio inmuno ensayo (RIA):*

Se siguió el mismo protocolo que en Steinbach et al. (1997). Los embriones fueron liofilizados durante 24 h, se molieron en un mortero de mano y se determinó el peso seco del polvo en una balanza de precisión. Las muestras liofilizadas se almacenaron en microtubos sellados y en el freezer hasta su procesamiento. Al material liofilizado se le agregó agua destilada en una relación 20:1 (20 uL de agua / mg de PS). Para la extracción en agua se dejaron las muestras en agitación durante 12 h a 4°C. Tras centrifugar para precipitar los restos insolubles, se separó el sobrenadante claro y se usó para la cuantificación de ABA. La técnica RIA usa un anticuerpo monoclonal AFRC MAC 252 que se une específicamente a cis-trans (+) ABA, tritiado o normal. El ABA de cada muestra compete por el sitio activo del anticuerpo con una cantidad predeterminada de ABA tritiado, y luego de precipitar el anticuerpo se obtiene una lectura de radioactividad en un contador de centelleo líquido. En cada medición se incluyó una curva patrón compuesta de diluciones estándar de concentraciones conocidas de (+) ABA (125, 250, 500, 1000, 2000 pg/50uL). La curva patrón

permite relacionar valores de ABA conocidos con las lecturas de radioactividad (cpm); la recta de regresión obtenida se usó para calcular los valores de concentración de ABA en las muestras a partir de los valores de cpm medidos (y teniendo en cuenta el agua agregada, y el peso seco original de cada muestra). Para cada muestra se hicieron dos réplicas cuyos valores se promediaron (siempre y cuando su CV fue igual ó menor al 6%). Solamente se consideraron válidas aquellas mediciones para las cuales el R^2 de la regresión de la curva patrón fue mayor a 0.95 (n=10).

Medición de expresión de genes por RT seguida de PCR en tiempo real

-*Diseño de primers para PCR en tiempo real (QPCR)*: se usó el programa Oligo Express, provisto por Applied Biosystems. En general se priorizó para el diseño la ubicación de los *primers* en la región 3' del gen, incluyendo la región no-codificante más próxima, para garantizar la amplificación de la mayor parte de la población de moléculas de cDNA de la especie de interés. Los primers usados para la detección de cada gen se muestran en la Tabla 2 (pág. 3) del ANEXO de esta tesis. El tamaño promedio de los amplicones fue de unas 60 nt, aunque en algunos casos (como Actina) el amplicón fue de 200 nt, sin por ello afectar la eficiencia de la medición

- *Extracción de RNA*: Se usó un kit para extraer RNA total de plantas marca *Nucleospin RNA plant mini kit* (Macherey-Nagel, Alemania); al protocolo original se le agregó un paso previo de purificación con PVP: se agregaron 60 uL de PVP 10% en 6ml del primer buffer de extracción incluido en el kit (RAP). El material vegetal (50-75 mg) fue molido en mortero con N2 líquido e inmediatamente (sin descongelar) se sumergió en el buffer y luego de centrifugar 3 min a 12 rpm, se tomó solamente el sobrenadante más claro y se pasó por la columna de filtrado del kit. Luego se siguió el protocolo exactamente como lo indica el fabricante. El protocolo incluye tratamiento con DNAsa durante la purificación. El RNA se resuspendió en un volumen de 50 uL de agua MQ. Para chequear la calidad del RNA obtenido se corrieron 4 uL de RNA de cada muestra en un gel de agarosa 1,5% (tinción con EtBr). Se usaron 6 uL para cada reacción de transcripción reversa (RT) con un volumen final de 25 uL (enzima M-MLV RT, de Invitrogen). El producto de la RT se diluyó 1 en 5 con agua MQ y se usó para las reacciones de PCR en tiempo real.

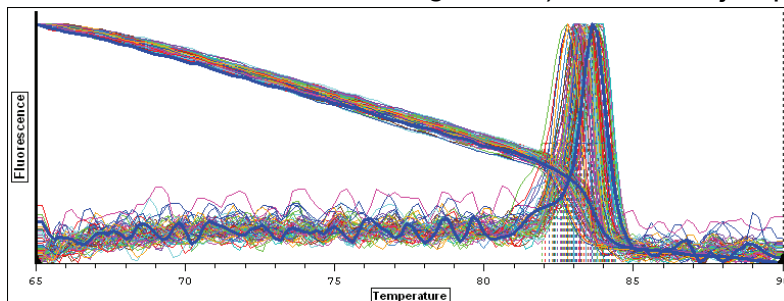
- *PCR en tiempo real (método cuantitativo)*:

En cada reacción de PCR de 10uL se usó 1 uL de templado (cDNA ó dilución patrón). Siempre se hicieron duplicados de reacción para cada muestra. Las reacciones de PCR se realizaron en micro-placas de 96 wells (marca Applied Biosystems) selladas con film transparente. En cada medición (sin excepción) se incluyó en la misma placa de PCR una curva patrón que consistió en al menos 4 diluciones seriadas obtenidas para el amplicón correspondiente al par de *primers* utilizado. La mezcla de reacción para PCR utilizada fue la SYBRgreen Master Mix de Applied Biosystems (2X), que incluye SYBRgreen para la cuantificación de ADN doble cadena y ROX como pigmento de referencia para el volumen, además de la Taq polimerasa (bloqueada con un anticuerpo para "HOT Start"; esto evita la formación de dímeros en los casos en que estos puedan ocurrir) dNTPs, Mg y

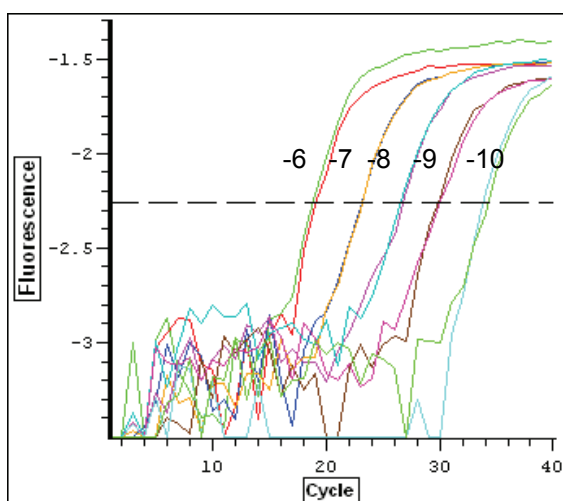
demás reactivos necesarios. Antes de cada reacción se agregaron los primers, agua y el cDNA ó templado según las cantidades indicadas por el fabricante.

Reactivo	(uL)
Master Mix (2X)	5
Agua	3.84
Primer Fw (50pmol/uL)	0.08
Primer Rv (50pmol/uL)	0.08
cDNA ó templado	1
Vol. Final	10

Para la obtención de la curva patrón para cada par de *primers*, se purificó el producto de PCR de una primer reacción en la cual se usó cDNA como templado (se verificó la presencia de un solo producto mediante un gel de agarosa 1.5%; además de producir una curva de amplificación sigmoidea, y un solo pico en la curva de disociación ó “*melting curve*”), como se ejemplifica en la figura de abajo:

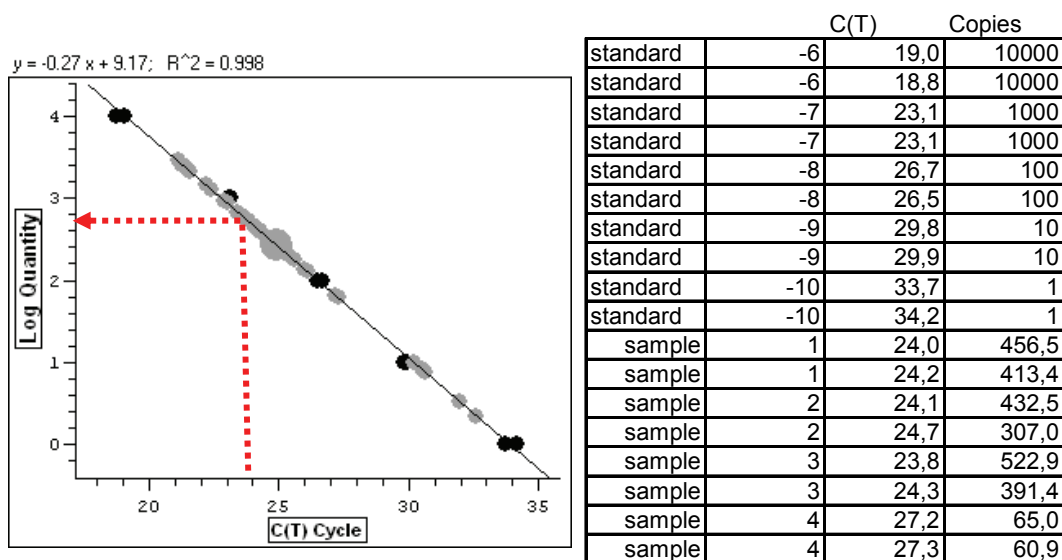


La purificación del ADN a partir del medio de reacción de PCR se hizo mediante un kit (Nucleospin extract, de Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en 50 uL de agua, y fue usado para obtener diluciones seriadas 1:10. Las diluciones 10^{-5} a 10^{-11} en general produjeron valores de Ct entre 16 y 33; las muestras de cDNA de sorgo diluidas 1/5 suelen presentar valores de Ct entre 18 y 24 para *Actina*.



El valor de Ct para un determinado cDNA en una muestra es el n° de ciclos de PCR ocurridos hasta alcanzar un valor umbral de fluorescencia; cuanto más abundante es el cDNA (que se asume que está en cantidad equivalente al mRNA original) del gen de interés, menor será el Ct ya que se alcanzará el umbral de fluorescencia en un número menor de ciclos. El umbral de fluorescencia se fija para todas las muestras en una misma medición como aquél que optimiza el ajuste de la regresión de la curva patrón, y se puede ver en la figura de la izquierda como la línea punteada horizontal.

La fluorescencia está relacionada directamente con el número de moléculas doble cadena en una muestra. La relación entre la cantidad de moléculas (medida como fluorescencia) expresada en escala logarítmica y el valor de Ct es lineal. En la figura de abajo se muestran en negro los valores de la curva patrón (con sus duplicados) que dan origen a la ecuación de regresión; los puntos grises corresponden a las muestras, ordenadas sobre el eje x según el valor de Ct obtenido, y sobre el eje y según el valor de cantidad calculado.



Los valores de Ct de cada muestra se asociaron, mediante la recta de regresión obtenida con las diluciones patrón, a un número de moléculas. Este valor de moléculas ó *Quantity* obtenido para cada muestra expresa la cantidad relativa para un mismo templado (cDNA) entre las distintas muestras.

En cada reacción de PCR se incluyó la curva patrón (5 diluciones, por duplicado) para el par de primers/amplicón correspondiente, y se le asignaron valores arbitrarios de nº de moléculas (ó "*Quantity*") de 10.000, 1.000, 100, 10 y 1 a las diluciones patrón que tuvieron valores de Ct de 17-18, 20-21, 23-24, 26-27 y 29-30 respectivamente. Es importante notar que este nº de moléculas ó valor de "*Quantity*" asignado a cada dilución patrón no es real, ya que no se cuantificó, pero la relación entre la concentración de una dilución y la siguiente es siempre 10 a 1; a partir de los valores de relativos de nº de moléculas y los valores de Ct obtenidos para cada una de las diluciones patrón, el software del ABI7500 calcula la ecuación de una recta de regresión que relaciona los valores de Ct con el log del nº (relativo) de moléculas; los valores de Ct obtenidos para cada una de las muestras experimentales es ingresado a este modelo de regresión y se obtiene (por interpolación) un valor de cantidad de moléculas ó "*Quantity*" (esto es válido para las muestras cuyo Ct cae dentro del rango de valores de Ct de la curva patrón).

- Análisis de los resultados de expresión de genes:

Los valores de cantidad de moléculas ó *quantity* obtenidos para un gen en cada muestra se normalizaron dividiendo por el valor de expresión de *SbActina* obtenido para cada muestra. Para ello los resultados de cada corrida se

importaron del software del ABI7500 a una planilla de cálculo de Excel (Microsoft) para su posterior procesamiento, que incluyó: cálculo del valor promedio de réplicas de reacción; división por el valor de *Actina* en cada muestra; cálculo de promedio y EE para duplicados biológicos (n=2). Así se obtuvo un valor de expresión relativa a *Actina* para cada gen por muestra o duplicado biológico. Los valores provenientes de dos duplicados biológicos (cada duplicado o repetición proviene de un pool de semillas de 10 plantas de un bloque a campo distinto) se promediaron y se calculó el error estándar (EE). Los datos se muestran en los gráficos sin transformación alguna. El EE se calculó como el valor del desvío estándar dividido por la raíz cuadrada de n=2. Los valores presentados en los gráficos son el promedio de los duplicados (dos bloques a campo) y su EE. Las escalas de todos los gráficos de expresión de genes en este trabajo corresponden a unidades relativas, y las comparaciones numéricas son posibles solamente para un mismo gen y par de *primers*. Los gráficos se hicieron con el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). En el Anexo (Tabla A-3, pág.18) se muestran los valores de Ct promedio para cada gen por experimento; esto permite comparar los niveles de expresión entre genes.

CAPÍTULO 1

“Participación de componentes de la señalización del ABA en la expresión de la dormición en semillas embebidas de *Sorghum bicolor*”.

RESUMEN

En este capítulo se abordó el objetivo específico a), que planteaba “ampliar el conocimiento de las bases moleculares de la diferente sensibilidad al ABA que presentan los embriones de sorgo provenientes de cariopses con niveles de dormición contrastantes a través del análisis de la expresión de genes que en otras especies han sido involucrados en la modulación de la sensibilidad al ABA y/o en la señalización del ABA”. Para ello se identificaron mediante una búsqueda in silico las secuencias de sorgo putativas para los ortólogos de un grupo de genes candidatos involucrados en la señalización del ABA en otras especies. Estos genes fueron ABI1, ABI4, ABI5 (y otros tres factores tipo bZIP), PKABA1, ABI3/VP1 (identificado previamente para sorgo) y un gen de respuesta al ABA, Rab28. Se analizó la expresión de estos genes durante la fase dos de imbibición en cariopses inmaduros (30 DPA) de IS9530 (dormición persistente) y RedlandB2 (pierde precozmente la dormición) en dos años diferentes.

Los resultados apoyan la hipótesis i) que postulaba una diferente actividad transcripcional para los genes candidatos implicados en la señalización del ABA durante la incubación de cariopses con diferente nivel de dormición; los cariopses de IS9530 (alta dormición) mostraron una mayor actividad transcripcional para SbABI5, SbABI4, SbVP1 y SbPKABA durante la incubación en contraste con RedlandB2 (baja dormición) donde la expresión de estos genes se mantuvo en un nivel basal. ABI1, que es un regulador negativo de la señalización del ABA, en sorgo también se indujo en respuesta al ABA al igual que en otras especies, y su expresión fue mayor en cariopses dormidos. Sin embargo, los niveles de expresión alcanzados por estos genes no fueron diferentes entre cariopses inmaduros (30 DPA) y maduros (42 DPA), aunque el nivel de dormición cambió significativamente. Se propone a partir de estos datos que la mayor sensibilidad al ABA en embriones de IS9530 depende no solamente de mayores niveles de expresión de estos genes, sino además de la expresión coordinada temporalmente de ABI5, ABI4 y ABI3. Los resultados obtenidos muestran que estos componentes participan en la señalización del ABA en semillas de sorgo granífero de manera similar a lo que se conoce en Arabidopsis y otras especies, pero además apoyan una participación de estos componentes en la expresión de diferentes niveles de dormición en semillas de genotipos de sorgo con diferente susceptibilidad al BPC.

INTRODUCCIÓN del CAPÍTULO 1

En esta sección se hace una descripción de la señalización del ABA en semillas (principales componentes regulatorios y niveles de control); selección de genes candidatos para su análisis en sorgo granífero; breve comentario sobre la metodología empleada.

La señalización del ABA es altamente compleja ya que involucra numerosos componentes y diferentes vías de regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional. Por ejemplo, hace unos años ya, y solamente en semillas, se habían identificado unos 50 genes involucrados en las respuestas al ABA (Nambara, 2003). Son muchos los procesos en los cuales participa el ABA, no sólo en semillas sino también en tejidos vegetativos en la planta adulta, y aunque muchos de los componentes son compartidos en los distintos escenarios, algunos parecen operar solamente en la semilla. Recientemente, estudios realizados con microarreglos mostraron que el ABA genera grandes cambios en el transcriptoma de las semillas, y esto involucra la acción de diferentes factores de transcripción cuya actividad está regulada por ABA, como ABI3, ABI4 y ABI5 (y otros homólogos); a nivel post-transcripcional, el ABA también modifica la estabilidad de mRNA específicos por la acción de proteínas que se unen al mRNA y afectan positiva o negativamente su direccionamiento a la traducción (Kuhn y Schroeder, 2003). Por otro lado, el ABA induce la actividad de kinasas y fosfatasa capaces de alterar la estabilidad y funcionalidad de otras proteínas a través de su estado de fosforilación; un ejemplo es la fosforilación de TaABF (ortólogo de ABI5 en trigo) por PKABA, una kinasa que se induce por ABA, lo cual aumenta la estabilidad de este factor de transcripción (Johnson *et al.*, 2002; Himmelbach *et al.*, 2003). Los niveles de proteína ABI5 en *Arabidopsis* son regulados negativamente a través de una proteína que interactúa físicamente con ella, AFP (ABI5 binding protein), y promueve su degradación en el proteasoma (López-Molina *et al.*, 2001), aunque este mecanismo no se ha descrito en especies de cereales. Una descripción detallada de los que se sabía sobre la señalización del ABA y los numerosos componentes implicados y sus interrelaciones fue elaborada por Finkelstein, Gampala y Rock en el año 2002.

A partir de la información reunida por estos y otros autores, los distintos componentes de la señalización del ABA pueden agruparse según su participación en la secuencia más o menos conocida de eventos desencadenados a partir de la unión de la molécula de ABA a un recientemente descubierto receptor, y hasta la regulación de la expresión génica. La clasificación que se presenta a continuación está muy acotada, y hay numerosos componentes e instancias de regulación que no se mencionan a favor de no incurrir en una complejidad que excede el nivel abordado para la señalización del ABA en esta tesis; simplemente se espera poner en el contexto de lo conocido hasta el presente los elementos de la señalización del ABA que se analizaron.

- *Receptores de ABA:* Recientemente se ha descubierto un receptor extracelular de ABA, que consiste en una proteína de membrana, GCR2, que se acopla a la subunidad alfa de una proteína G, GPA1 (Liu *et al.*, 2007). Estos autores demostraron que este receptor es específico para ABA, y que modificaciones en la expresión de este gen alteran el fenotipo de dormición y otros procesos

controlados por ABA en semillas y en estomas. Un segundo receptor de ABA, FCA (Razem *et al.*, 2007), está involucrado en el control de la floración y tal vez otros procesos, pero no parece estar implicado en la percepción de ABA en las semillas.

- *Intermediarios y mensajeros secundarios:* Hasta el momento se reconoce la participación de diferentes proteínas en los primeros eventos desencadenados por el ABA en semillas y en estomas: proteínas G de membrana (heterotriméricas, y monoméricas, como las GTP-asas Rop2, Rop9 y Rop10), que funcionan como “switches” moleculares; fosfolipasas (como las PLC y PLD); proteín-quinasas y proteín-fosfatasa. Cambios en la actividad de estos componentes mediante su manipulación afectan las respuestas a varias hormonas, y su especificidad en la señalización del ABA debería depender de su interacción con otras proteínas. Como mensajeros secundarios se han identificado los fosfatidilinosítidos IP3 e IP6, y ácido fosfático (PA), productos de las fosfolipasas C y D. La activación de flujos de Ca⁺⁺ a través de canales específicos también ocurre en respuesta al ABA en estomas, y esto parece estar mediado por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), proceso dependiente de la actividad de las GTPasas. La producción de ROS a su vez podría estar vinculada con la activación de una cascada de MAPquinasas en respuesta al ABA. El cierre de estomas inducido por ABA implica un aumento de pH en el citosol; esto a la vez promueve la actividad de ABI1, una fosfatasa tipo PP2C que regula negativamente la señalización del ABA (review de Finkelstein *et al.*, 2002). Sin embargo, no se conoce en detalle cómo estos procesos desembocan en la activación de factores de transcripción específicos, responsables de los cambios en la expresión génica que determinan la respuesta final al ABA.

- *Factores de transcripción:* Se han identificado varios factores de transcripción (FT) cuya actividad es necesaria para la regulación por ABA de la transcripción de genes que codifican para proteínas específicas de semillas, como por ej. las LEA (*late-embryogenesis abundant*). El ABA induce la expresión de los genes de algunos de estos FT pero además afecta la actividad de algunas de estas proteínas a través de cambios rápidos en su estado de fosforilación y/o su degradación vía proteasoma, como sucede con ABI5 y ABI3. Los factores de transcripción identificados y más estudiados hasta el momento son ABI3/VP1, ABI5/TaABF y ABI4, responsables de mediar la regulación por ABA de gran cantidad de genes en semillas y en estomas (Finkelstein *et al.*, 2002). La identificación y caracterización de genes ortólogos en diferentes especies muestra que la señalización del ABA está altamente conservada entre especies tan distantes como *Arabidopsis thaliana* y monocotiledóneas como trigo, maíz, cebada y arroz. Se han identificado y caracterizado secuencias *cis*-regulatorias reconocidas específicamente por cada uno de estos factores de transcripción y que se encuentran en los promotores de genes regulados por ABA. Se sabe que ABI3, ABI4 y ABI5 pueden formar parte de un mismo complejo transcripcional, pero que este complejo además involucra otras proteínas, como las 14-3-3. Adicionalmente, estos FT pueden regular (directa o indirectamente, no se sabe aún) mutuamente su expresión. Por ej., VP1/ABI3 es necesario para la expresión de ABI5 y su inducción por ABA en *Arabidopsis* (Suzuki *et al.*, 2003). ABI3/VP1 también parece modular positivamente la señalización del ABA a través de la inhibición de la expresión de ABI1 y ABI2, que son reguladores negativos de esta vía (Suzuki *et al.*, 2003). En general, la alteración de la expresión de uno de estos componentes

afecta la expresión de los demás, lo cual sugiere que la vía de señalización del ABA está regulada de manera compleja y a través de múltiples mecanismos de retroalimentación, positiva y negativa.

- **Proteínas que unen mRNA:** Existen numerosas evidencias de formas de regulación post-transcripcional en la señalización del ABA, y esta parece ser una instancia de regulación fina de la expresión génica inducida por ABA (Kuhn y Schroeder, 2003). Se han aislado diferentes mutantes de *Arabidopsis* hipersensibles al ABA para la germinación, y los genes mutados codifican para diferentes proteínas que se unen a mRNA. Estas proteínas modulan la señalización del ABA al afectar la abundancia de diferentes transcritos como resultado de la alteración de eventos del procesamiento del mRNA, como splicing, procesamiento 3', exportación desde el núcleo, estabilidad y degradación de los transcritos. Algunos de los componentes identificados son: HYL1, una proteína que une RNA de doble cadena (dsRNA); ABH1, una proteína que forma parte del complejo CAP binding-complex (CBC) que regula varios pasos post-transcripcionales; SAD1 es similar a una proteína Lsm de humanos que participa en el ensamble de proteínas snRNPs del complejo de spliceosoma, y participa de varios pasos del procesamiento del mRNA, como splicing, exportación y degradación. Aún falta describir la vinculación entre estas proteínas y los transcritos que son afectados por ellas, y su rol específico en la señalización del ABA. Algunas evidencias muestran relación entre algunas de estas proteínas con la activación de MAPKinasas y ABI5.

Selección de genes candidatos para evaluar su participación en la expresión de la dormición en sorgo granífero.

De los diferentes componentes de la señalización del ABA involucrados en la señalización del ABA en semillas que se encontraban descritos en la bibliografía al inicio de este proyecto de tesis, se seleccionaron como candidatos a cumplir un rol en la expresión de diferentes niveles de dormición en sorgo granífero aquellos componentes cuyos mutantes o sobreexpresantes en otras especies estuvieran asociados a un fenotipo alterado de dormición o sensibilidad de la germinación al ABA. Entre estos componentes, los factores de transcripción ABI3/VP1, ABI4 y ABI5 cumplen un rol crucial en el control de la expresión de numerosos genes inducibles por ABA y cuyos productos son proteínas características de la etapa de maduración de las semillas (proteínas de reserva y dehidrinas). La sobreexpresión ectópica de estos factores de transcripción resulta en la expresión en tejidos vegetativos de genes que son específicos de semillas (Suzuki *et al.*, 2003). Además estos factores de transcripción reprimen (directa ó indirectamente) la expresión de genes implicados en la germinación; por ej., VP1 inhibe la expresión de genes de alfa-amilasas específicas de la germinación en células de aleurona de cebada (Hoecker *et al.*, 1995). Estos factores de transcripción cumplen, además, un rol en la señalización del ABA en relación a otros procesos en la planta, ya que los mutantes generalmente presentan defectos en el desarrollo de la semilla y además poco crecimiento de la planta, debido a la falta de control del cierre estomático, aunque esto depende de la especie (por ej., *ABI4* de maíz se expresa específicamente en semillas, mientras que en *Arabidopsis* se expresa también en tejidos vegetativos). La regulación de la transcripción de los genes ABI y de la actividad de sus productos parece ser compleja, y aunque se ha avanzado

bastante en la exploración de diferentes formas de regulación a nivel de la proteína, es poco lo que se sabe en relación a los factores que regulan la transcripción de los genes ABI y que son disparados por la acción del ABA. Aunque la pérdida o ganancia de función de estos genes resulta en un fenotipo alterado de dormición o en cambios en la sensibilidad al ABA para la germinación, no se sabe si estos factores de transcripción cumplen un rol en la expresión de diferentes niveles de dormición como los que se observan entre diferentes genotipos de una misma especie. Por ej., no se sabe si las semillas de genotipos con patrones de salida de la dormición contrastantes difieren en la expresión de estos factores de transcripción durante su desarrollo y/o a partir de la imbibición. Además de estos factores de transcripción, las fosfatasa ABI1/ABI2, y la proteína-kinasa PKABA, también están implicadas en la señalización del ABA en semillas y su alteración resulta en un fenotipo alterado de dormición. Sin embargo, no se sabe si su actividad es diferente en la expresión de diferentes niveles de dormición en genotipos de cereales con dormición contrastante. Por ejemplo, en trigo se observó que la expresión de *PKABA* y de *TaABF* (el ortólogo de ABI5 en trigo) se mantiene estable durante la imbibición de cariopses dormidos mientras que disminuye en cariopses post-madurados (y que han perdido la dormición), lo cual sugiere que PKABA y TaABF participan en la expresión de diferentes niveles de dormición a medida que las semillas post-maduran (Johnson *et al.*, 2002). Esta correspondencia entre la expresión de estos genes y cambios en la dormición expresada antes y después del proceso de post-maduración en semillas de trigo, sugiere que estos genes también podrían estar regulados diferencialmente en genotipos que tienen patrones contrastantes de salida de la dormición.

Resultados de la búsqueda de secuencias de genes ortólogos para sorgo granífero:

Se identificaron secuencias (EST's y GSS-contigs, ver resultados de la búsqueda en el ANEXO 1; en este anexo se muestran además las secuencias originales de cada proteína candidata en las especies de referencia) de sorgo granífero con alta identidad con las secuencias candidatas correspondientes a los siguientes genes que codifican para cinco proteínas implicadas directamente en la señalización del ABA; se incluyó además el RAB28 como indicador positivo de la señalización del ABA. A continuación se mencionan los genes candidatos analizados:

- **ABI5 y otros factores bZIP.** Se identificaron en sorgo cuatro secuencias diferentes que codifican para factores de transcripción putativos tipo bZIP; la secuencia con mayor identidad con ABI5 de *Arabidopsis* y cebada se denominó *SbABI5*. Las otras tres secuencias identificadas que codifican para otros factores de transcripción bZIP también se incluyeron en el análisis en algunos experimentos y se denominaron según el código del Contig que representa a cada secuencia en PlantGDB: *SbBZIP* 70604, *SbBZIP* 48312 y *SbBZIP* 16042.
- **ABI4.** Se identificó una sola secuencia con alta identidad con *ZmABI4* de maíz.
- **ABI1/ABI2.** Se encontró una sola secuencia en sorgo, con alta identidad con ambas fosfatasas de *Arabidopsis*.

- **PKABA1**. Se encontraron dos secuencias en sorgo (solamente se midió la expresión de la que presentó mayor identidad con PKABA1 de trigo).
- **Rab28**. Se midió su expresión como indicador de la actividad de la señalización del ABA. El producto de este gen se acumula durante la embriogénesis tardía en especies como *Arabidopsis* y maíz. En maíz, a diferencia de *Arabidopsis*, su expresión se induce en tejidos vegetativos en respuesta al ABA y estrés hídrico. En *Arabidopsis* se observó que la función de esta proteína nuclear está asociada a la tolerancia de la germinación en presencia de bajo potencial osmótico y sales (Borrell *et al.*, 2002).
- **ABI3/VP1**. Este gen fue previamente clonado y secuenciado para sorgo granífero usando estas mismas líneas (Carrari *et al.*, 2001a).

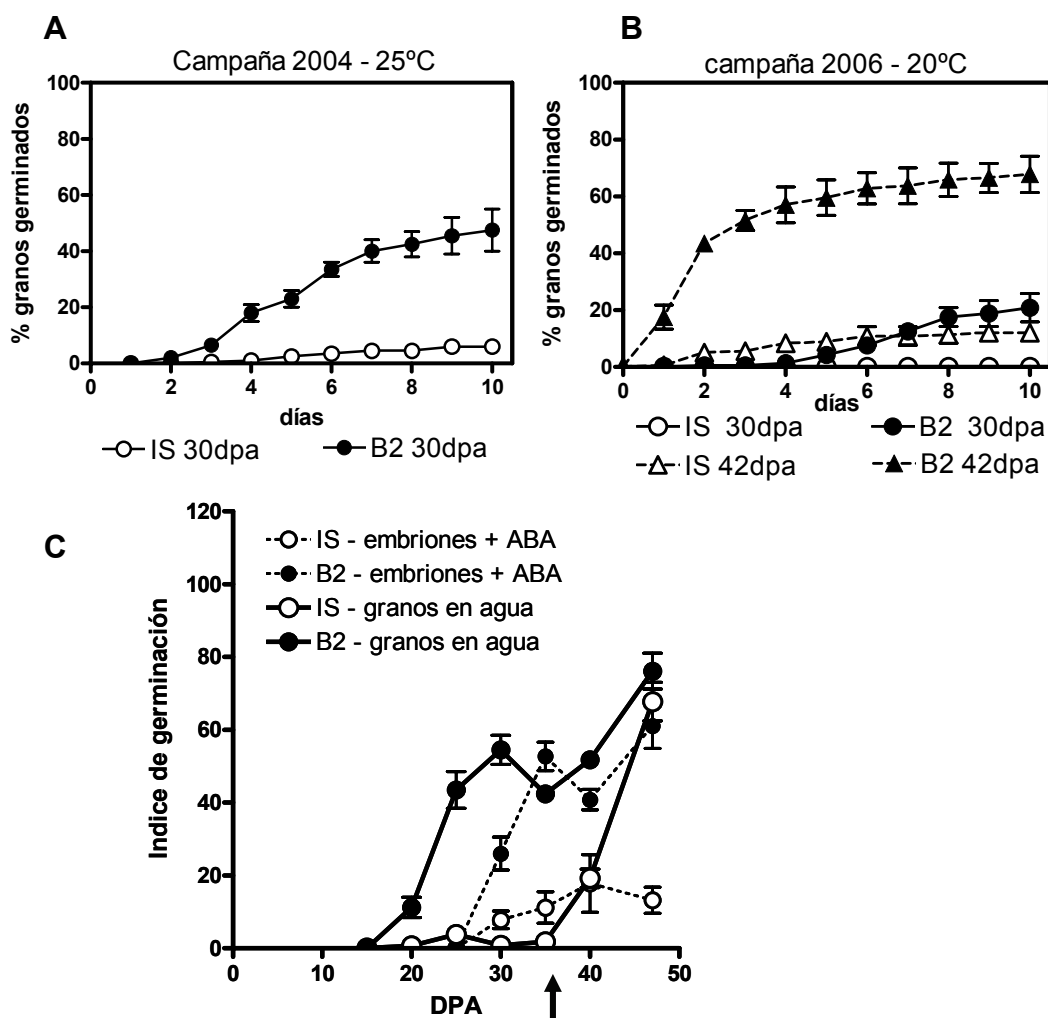
Metodología: La expresión de estos genes candidatos se analizó mediante RT seguida de PCR en tiempo real ó cuantitativa (RT-QPCR) en muestras de embriones con diferentes tiempos de incubación, para IS9530 (alta dormición) y RedlandB2 (baja dormición). A continuación se muestran los perfiles de expresión y la evolución del porcentaje de germinación, obtenidos para experimentos realizados en dos momentos del desarrollo: 30 DPA (antes de madurez fisiológica (MF), cariopses inmaduros) y 42DPA (después de MF, cariopses maduros*). Los experimentos con cariopses de 30DPA se hicieron en dos campañas diferentes: 2004 y 2006. En ambas campañas se separaron muestras para medición del contenido de ABA; en la campaña 2004, se midió ABA simultáneamente con giberelinas por GC-MS (ver capítulo 2). En la campaña 2006, se midió el contenido de ABA mediante radio inmuno ensayo (RIA) en el IFEVA.

(*) La maduración de las semillas aún no ha concluido, y se prolonga hasta que las mismas alcanzan su menor porcentaje de humedad (alrededor del 5-6 %); en el período entre MF y la cosecha, mientras la deshidratación de las semillas prosigue, continúan en actividad procesos bioquímicos asociados con la síntesis de compuestos de reserva y la protección frente a la deshidratación. Sin embargo, a lo largo de este manuscrito y por cuestiones prácticas, se denominarán “maduras” a aquellas semillas que ya han alcanzado la madurez fisiológica, tan solo para distinguirlas de las semillas que aún no lo han hecho.

RESULTADOS del CAPÍTULO 1

Las mediciones de genes que se presentan en este capítulo están basadas en muestras de embriones provenientes de cariopses de sorgo incubados durante diferentes tiempos. En la **Fig.1.1** se muestran las curvas de germinación correspondientes a tres experimentos, dos de ellos realizados con cariopses cosechados a los 30 DPA (inmaduros; expresan un nivel de dormición elevado ó moderado) y otro a los 42 DPA (cariopses maduros; han perdido parcialmente la dormición). En todos los casos, los cariopses de RedlandB2 comienzan a germinar desde tiempos más tempranos y alcanzan un porcentaje final significativamente mayor que los de IS9530.

Fig.1.1: Evolución del porcentaje de germinación para **A)** cariopses cosechados a los 30DPA e incubados en agua destilada a 25°C (campana 2004) y **B)** cariopses cosechados a los 30 y 42 DPA e incubados a 20°C (campana 2006). **C)** Evolución del índice de germinación obtenido para cariopses enteros cosechados en diferentes momentos del desarrollo e incubados en agua a 25°C ó embriones disectados e incubados en ABA 50uM. La flecha indica el momento aproximado de madurez fisiológica para ambos genotipos (campana 2003).



Evolución del contenido embrionario de ABA durante la incubación de los cariopses.

El contenido embrionario de ABA durante la incubación de cariopses no fue significativamente diferente entre IS9530 y RedlandB2 (Fig.1.2 y 1.3) y no parece explicar la diferente respuesta de germinación entre estos genotipos. Esto está de acuerdo con lo reportado por Gualano *et al.* (2007), quienes mostraron que el metabolismo del ABA no fue diferente entre estos genotipos durante la incubación de embriones aislados. Los datos presentados en las figuras 1.2 y 1.3 confirman los resultados de Gualano *et al.*, pero en semillas enteras.

Expresión de genes *SbABI4*, *SbABI5*, *SbVP1* y *SbPKABA* durante la incubación de cariopses inmaduros (30 DPA):

Los patrones de expresión observados para los distintos genes de señalización del ABA durante la incubación de cariopses inmaduros (30 DPA) mostraron en general una expresión mayor en IS9530 comparando con RedlandB2, aunque se encontraron algunas diferencias entre las campañas 2004 y 2006. En el experimento del 2004, la temperatura de incubación fue mayor que en el 2006 (25°C vs 20°C), y las curvas de germinación reflejaron esta diferencia (ver Fig.1.1). La expresión de los genes aumentó hacia el final del período muestreado en IS9530 en el experimento a 25°C (campaña 2004, Fig. 1.2); de manera similar, en el experimento a 20°C (campaña 2006, Fig. 1.3) se observó un aumento, aunque en este caso fue transitorio, en la expresión de estos genes en IS9530 (alta dormición) mientras que en RedlandB2, su expresión se mantuvo en un nivel basal y con variaciones relativamente pequeñas en ambos experimentos (Fig. 1.2 y 1.3). De los diferentes componentes analizados, solamente *SbABI5* y *SbPKABA* mostraron una correspondencia entre su patrón de expresión y la evolución del contenido de ABA en la campaña 2004 (Fig.1.2): la expresión de estos dos genes aumentó a las 96h en IS9530 al mismo tiempo que se observó un aumento en el contenido de ABA en este genotipo. Los patrones de expresión de los demás genes analizados, incluyendo *SbRab28*, no se asociaron con el contenido instantáneo de ABA. Ninguno de los genes se asoció con el contenido instantáneo de ABA en la campaña 2006 (Fig.1.3).

La expresión de *SbPKABA* se indujo fuertemente en cariopses dormidos de IS9530 pero no en cariopses de RedlandB2

A las 96 h la expresión de *SbPKABA* se indujo por un factor de 50 con respecto al tiempo cero de incubación (Fig. 1.1) y este patrón fue muy similar al de *SbABI5* en las mismas muestras. En la siguiente campaña, también en granos inmaduros, la expresión de *SbPKABA* se indujo significativamente en IS9530, en este caso transitoriamente a las 72 h y luego cayó a un valor similar al inicial (Fig. 1.3). En cambio, en cariopses inmaduros de RedlandB2, este gen se indujo en menor grado y a las 96 h. En conjunto estos resultados muestran una asociación positiva entre mayores niveles de expresión de este gen ortólogo putativo de PKABA y la expresión de mayores niveles de dormición observados en cariopses de IS9530.

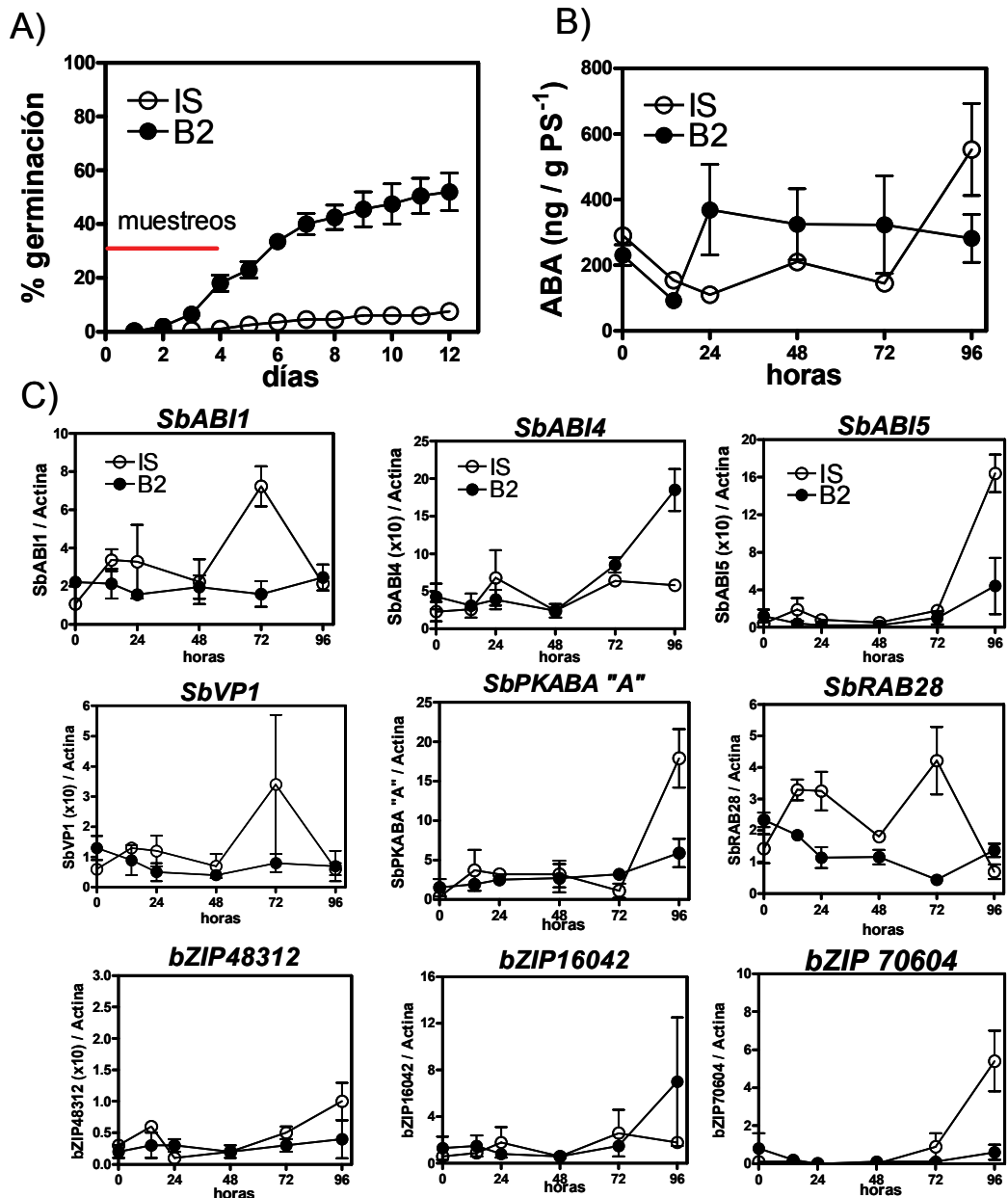


Fig.1.2: **A)** Curvas de germinación para cariopses enteros en agua a 25°C **B)** Contenido endógeno de ABA en embriones durante la incubación en agua a 25°C de cariopses inmaduros (30 DAP) (campeña 2004). Cuantificación de ABA por CG-MS. **C)** Expresión de genes que codifican para putativos factores de transcripción (ABI4, ABI5, VP1) y otras proteínas involucradas en señalización del ABA (PKABA, una kinasa y ABI1, una fosfatasa tipo PP2C) durante los primeros 4 días de incubación de cariopses de sorgo. Todos son reguladores positivos de la señalización del ABA excepto ABI1, que es un regulador negativo. Se incluyen además tres factores de transcripción tipo bZIP identificados en sorgo, con alta identidad con ABI5. Cariopses de sorgo cosechados a los 30 DPA e incubados a 25°C (campeña 2004). La expresión de genes se midió en los embriones luego de separarlos del resto del cariopse. Cada dato es el promedio de dos muestras independientes (cada repetición proviene de un pool de semillas de un bloque a campo). Los datos de expresión fueron relativizados a los valores de expresión de *SbActina* por muestra. Los valores no fueron transformados.

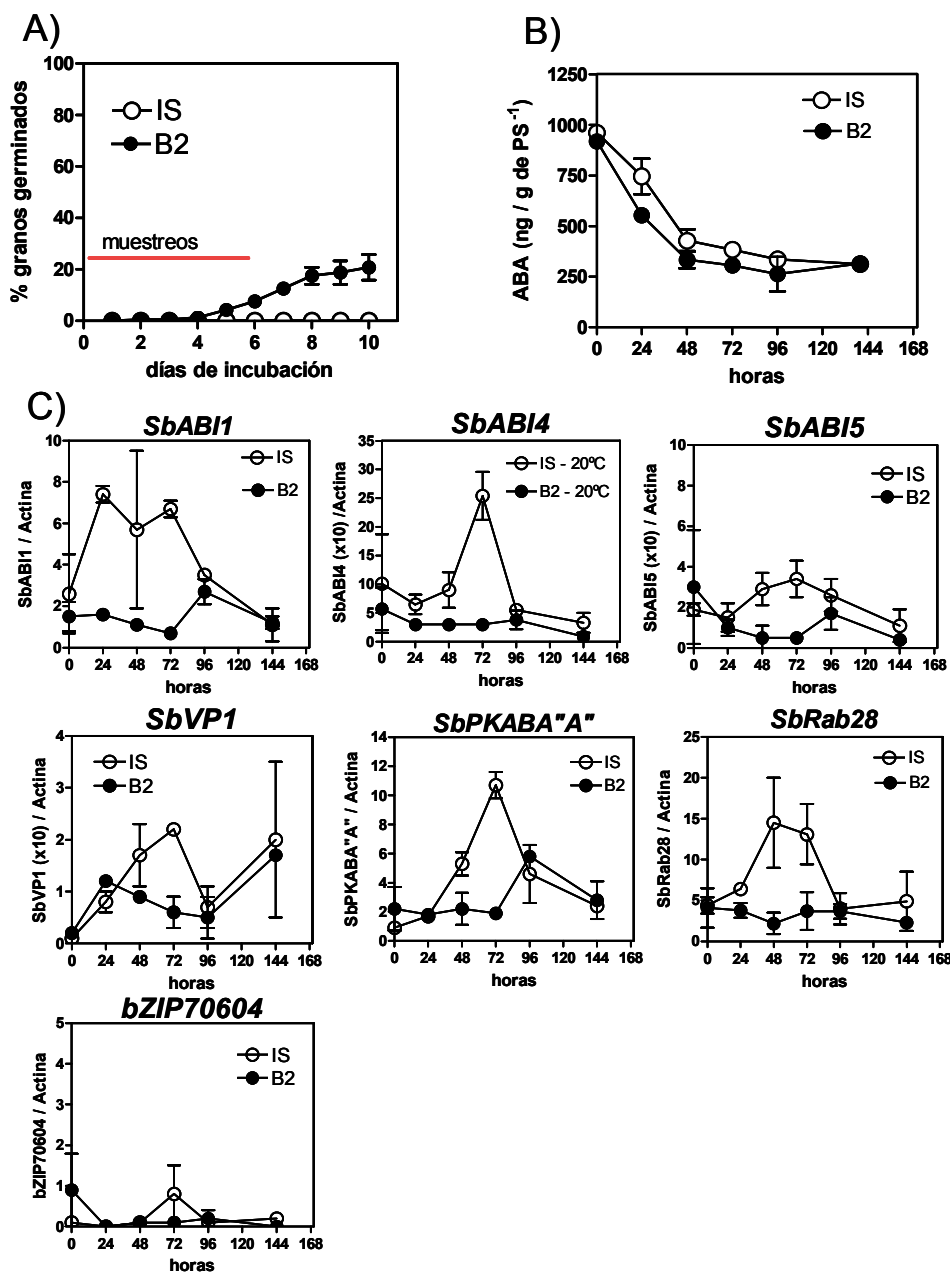


Fig.1.3: **A)** Evolución de la germinación de cariopses de sorgo cosechados a los 30 DPA (campaña 2006) para IS9530 y RedlandB2. **B)** Evolución del contenido de ABA en el embrión durante la incubación de cariopses enteros en agua a 20°C. Se utilizó una técnica de radio- inmuno ensayo (RIA), según se describe en Steinbach et al., 1995). **C)** Expresión relativa a Actina para diferentes genes que codifican para componentes putativos de la señalización del ABA, durante la incubación de cariopses: factores de transcripción (*SbABI4*, *SbABI5*, *SbVP1*), una protein-quinasa (*SbPKABA*) y una fosfatasa tipo PP2C (*SbABI1*). Los datos de las figuras A, B y C se obtuvieron a partir de las mismas muestras cariopses cosechados a los 30 DPA (campaña 2006) e incubados a 20°C.

La expresión de *SbABI5* se indujo durante la incubación de cariopses dormidos

La expresión de *SbABI5* fue similar en ambos genotipos durante las primeras 72h de incubación (Fig 1.2, campaña 2004) y a las 96h se observó una inducción en ambos genotipos, pero el nivel de expresión alcanzado fue significativamente mayor en IS9530 comparado con RedlandB2 (3,7 veces). En la repetición de este experimento con cariopses de 30 DPA durante la campaña 2006 (**Fig.1.3**) la expresión de *SbABI5* en IS9530 aumentó a partir de las 48h de iniciada la incubación y alcanzó un nivel unas cuatro veces mayor comparado con RedlandB2, donde no se observó inducción alguna. En este segundo experimento (30DPA, campaña 2006) la germinación de RedlandB2 fue más lenta que en la campaña 2004 posiblemente como consecuencia de la menor temperatura de incubación (20°C); la germinación de IS9530 también se inhibió aún más (ver curvas de germinación para ambos experimentos, Fig.1.1 y 1.2). A diferencia del experimento anterior, la expresión de *SbABI5* en IS9530 aumentó entre las 48 y 72 h, y luego decreció a valores similares a los de RedlandB2, aunque las semillas no germinaron aún después de 12 días de incubación. Esto sugiere que la participación de ABI5 en el bloqueo de la germinación ocurre en una etapa acotada dentro de la fase II de imbibición, y que luego el mantenimiento del bloqueo se independiza de ABI5. Esto es diferente a lo observado para ABI5 en *Arabidopsis*, cuyo nivel se mantiene elevado aún luego de la emergencia de la radícula, y cuando disminuye se des-reprime el crecimiento post-germinativo (Lopez-Molina *et al.*, 2002).

Estos resultados muestran una asociación positiva entre la transcripción de *SbABI5* (y posiblemente, una mayor actividad de la proteína ABI5) y la expresión de un mayor nivel de dormición en cariopses embebidos. ABI5 es un factor de transcripción del tipo bZIP (basic leucine zipper; ortólogos de ABI5: ABFs, AREBs, TRAB1) que se dimeriza e interactúa físicamente con ABI3/VP1, y a través del pegado en secuencias específicas denominadas ABRE presentes en la región promotora 5' de genes que responden al ABA, activa la transcripción de éstos. En *Arabidopsis* la sobreexpresión de ABI5 no inhibe la germinación pero aumenta la sensibilidad de las semillas al efecto inhibitorio del ABA exógeno y también reduce el crecimiento post-germinativo temprano. Se ha demostrado en *Arabidopsis* que el ABA promueve la transcripción del gen y además aumenta los niveles de la proteína al estabilizarla por fosforilación e impedir su degradación vía AFP-proteasoma (López-Molina *et al.*, 2002). De manera similar a lo observado en otras especies, esta inducción de la transcripción por ABA fue observada también para *SbABI5* en embriones de sorgo incubados en ABA (**Fig.1.4**) con respecto a los embriones incubados en agua.

La expresión de otros tres genes que codifican para factores de transcripción tipo BZIP (homólogos de ABI5) no se asoció con el nivel dormición.

La expresión de *SbBZIP 70604* (cuya secuencia es muy similar a la de *SbABI5*, ver ANEXO) mostró para ambos genotipos un patrón muy similar al de *SbABI5*, durante la incubación de cariopses de 30DPA a 25°C (Fig. 1.2, campaña 2004); sin embargo, esto no se repitió en cariopses de 30DPA en la campaña 2006 (Fig.1.3), donde no se observó una inducción de este gen durante la

incubación y la expresión fue similar entre genotipos. Los otros dos genes homólogos (*SbBZIP* 48312 y 16042) y cuya expresión se evaluó tampoco se indujeron y no mostraron diferencias entre líneas durante la incubación de cariopses de 30DPA (campana 2004) (Fig.1.2). Estos resultados sugieren que los productos de estos dos genes no tienen un rol relevante en la expresión de diferentes niveles de dormición en estas dos líneas.

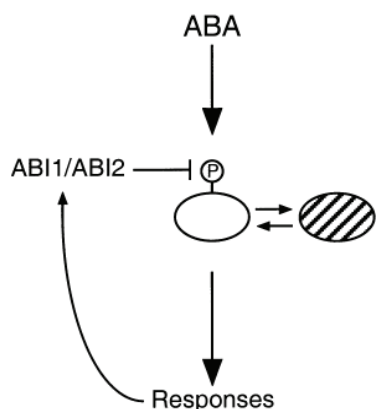
La expresión de *SbVP1* fue transitoriamente mayor en IS9530

De manera coherente con observaciones previas (Carrari *et al.*, 2003) en cariopses maduros de estos mismos genotipos, la expresión de *SbVP1* en cariopses inmaduros (30DPA) alcanzó valores mayores durante la incubación en IS9530 con respecto a RedlandB2. En el experimento de la campana 2004 (Fig.1.2) la expresión de *SbVP1* aumentó durante las primeras 24h de incubación en IS9530 y disminuyó en RedlandB2, aunque los valores absolutos no fueron significativamente diferentes entre genotipos. El contraste observado para la expresión de *SbVP1* fue mayor y significativo en muestras de 30 DPA de la campana 2006 (Fig.1.3); en este caso la expresión de *SbVP1* aumentó significativamente al cabo de las primeras 24 h en ambos genotipos, pero a partir de ese momento disminuyó en RedlandB2 mientras que continuó aumentando en IS9530 hasta las 72 h hasta alcanzar un valor 3,5 veces mayor que en RedlandB2. A las 96h ambos genotipos presentaban valores de expresión similares para *SbVP1*. Este aumento transitorio observado durante los primeros cuatro días de incubación en cariopses dormidos de IS9530 apoya una asociación entre una mayor actividad transcripcional de *SbVP1* durante la fase II de imbibición (y posiblemente una mayor actividad de la proteína) y la expresión de un alto nivel de dormición.

La expresión de *SbABI1* fue mayor durante la incubación en IS9530, y mostró un patrón similar al del *RAB28*

ABI1 de *Arabidopsis* es una fosfatasa del tipo PP2C, que regula negativamente la señalización del ABA en esta y otras especies (Merlot *et al.*, 2001; González-García *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta el rol de regulador negativo de *ABI1* en la señalización del ABA, se planteó la posibilidad de que una mayor expresión de este gen (y mayor actividad de la proteína) en cariopses de RedlandB2 (baja dormición) podría ser la causa de la menor sensibilidad al ABA en este genotipo. La expresión de *SbABI1* durante la incubación (cariopses 30 DPA, inmaduros; Fig. 1.2.C) fue diferente en ambas líneas; mientras que la expresión de *SbABI1* mantuvo un nivel basal en RedlandB2, la expresión de este gen aumentó de manera transitoria a las 72 h (unas 7 veces con respecto al tiempo cero) y luego disminuyó a las 96 h en IS9530. Este patrón de expresión resulta contrario a lo esperado según la hipótesis que postulaba una mayor actividad transcripcional de *ABI1* como una causa de la menor señalización del ABA en cariopses de RedlandB2. La expresión de *SbABI1* en muestras de cariopses de 30DPA de la campana 2006 (Fig. 1.3) también fue mayor en IS9530 comparado con RedlandB2 durante la incubación de los cariopses a 20°C. En ambas campañas, la expresión de *SbABI1* siguió un patrón similar al del *SbRAB28*, y esto pudo observarse para ambos genotipos.

La transcripción de *ABI1* en *Arabidopsis* está regulada positivamente en presencia de ABA, lo cual también se corresponde con una mayor actividad de la proteína en los tejidos tratados con ABA; esto apoya un modelo en el cual ABI1 funciona en un “*feedforward negative regulatory loop*” de la señalización del ABA (simplificado en el esquema mas abajo). En otras palabras, cuando la señalización del ABA está activada, aumenta la actividad de ABI1, que a su vez actúa atenuando la señal del ABA (Merlot *et.al.*, 2001).

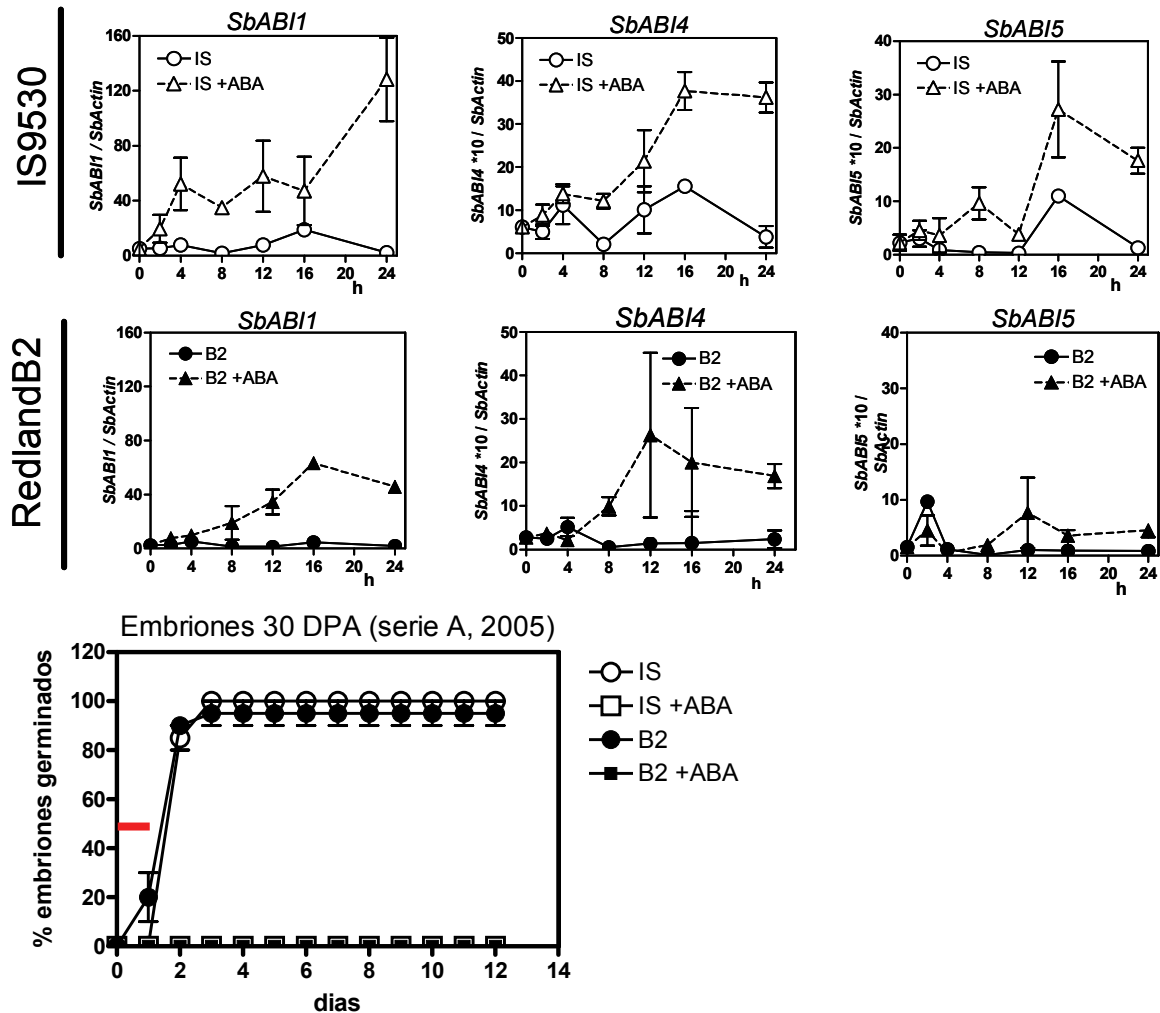


Esquema (tomado de Merlot *et.al.*, 2001) mostrando la regulación negativa de la señal del ABA a través de la inducción de *SbABI1* por ABA. ABI1/ABI2 defosforilan un componente de la señalización del ABA que es activo mientras está fosforilado.

Adicionalmente, la expresión de una fosfatasa PP2C1 (homóloga a ABI1, ABI2 y PP2CA de *Arabidopsis*) en semillas dormidas de *Fagus sylvatica* se correlaciona negativamente con la germinación, y su expresión es promovida por ABA e inhibida por tratamientos que eliminan la dormición. En sorgo, los resultados hasta el momento muestran un comportamiento similar al observado en *Fagus* (una mayor expresión, aunque transitoria, en semillas dormidas). Esto sugiere que la transcripción de *SbABI1* no sería un punto de regulación diferencial entre las líneas estudiadas para la señalización del ABA, y que la mayor expresión de *SbABI1* en cariopses de IS9503 es una consecuencia de la mayor actividad de señalización del ABA en este genotipo.

Esta idea se apoya además en el hecho de que el patrón de expresión de *SbABI1* fue en ambas campañas muy similar al observado para el gen *SbRAB28* (Fig 1.2 y 1.3, y 1.8), cuya expresión responde, entre otros posibles factores, al ABA. De manera similar a lo que se conoce en *Arabidopsis* y en *Fagus*, *SbABI1* también se indujo por ABA. La expresión de este gen se indujo en embriones aislados e incubados en ABA 50uM con respecto al control en agua en ambos genotipos, aunque esta inducción fue más temprana (a partir de las 4 h) en IS9530 comparado con RedlandB2 (Fig 1.4). La expresión de *SbABI1* mantuvo un nivel basal en embriones en agua, donde las restricciones para la germinación han desaparecido (y la señalización del ABA estaría poco activa debido al escape de ABA por difusión al medio de incubación). En conclusión, y sin descartar un rol de ABI1 en el control de la dormición en sorgo granífero, la expresión de niveles de dormición contrastantes en cariopses inmaduros de IS9530 y RedlandB2 no parece ser una consecuencia de la diferente expresión de *SbABI1*.

Fig.1.4: Expresión de *SbABI1*, *SbABI4* y *SbABI5* en embriones aislados (disectados de cariopses cosechados a los 30 DPA; campaña 2004) e incubados en agua destilada ó una solución 50uM ABA a 25°C. La germinación se muestra en la figura inferior, la línea roja indica el período muestreado. Cada dato es el promedio de dos muestras independientes (dos bloques a campo). Donde no se observan barras de error es porque son menores que el símbolo, excepto para IS9530 a las 16h en agua, donde se perdió un duplicado.



La expresión de *SbABI4* fue diferente entre genotipos y mostró interacción con la temperatura de incubación:

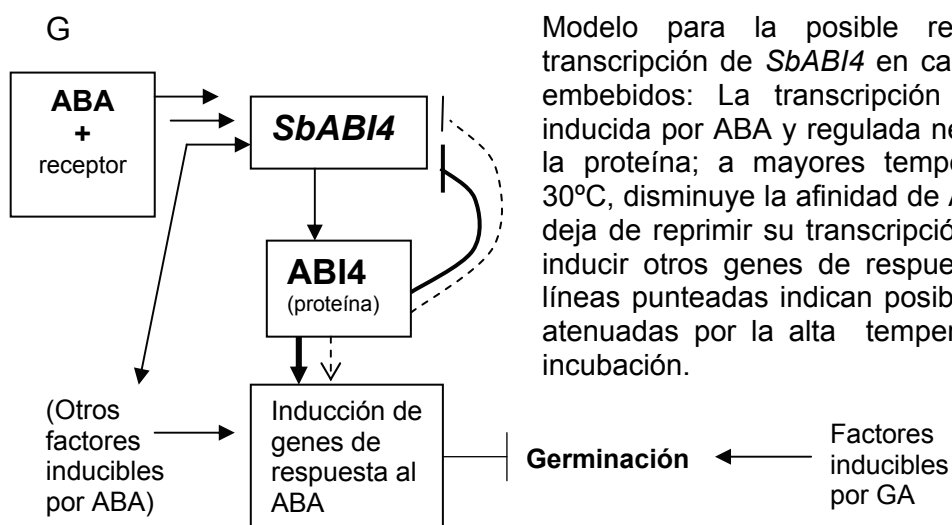
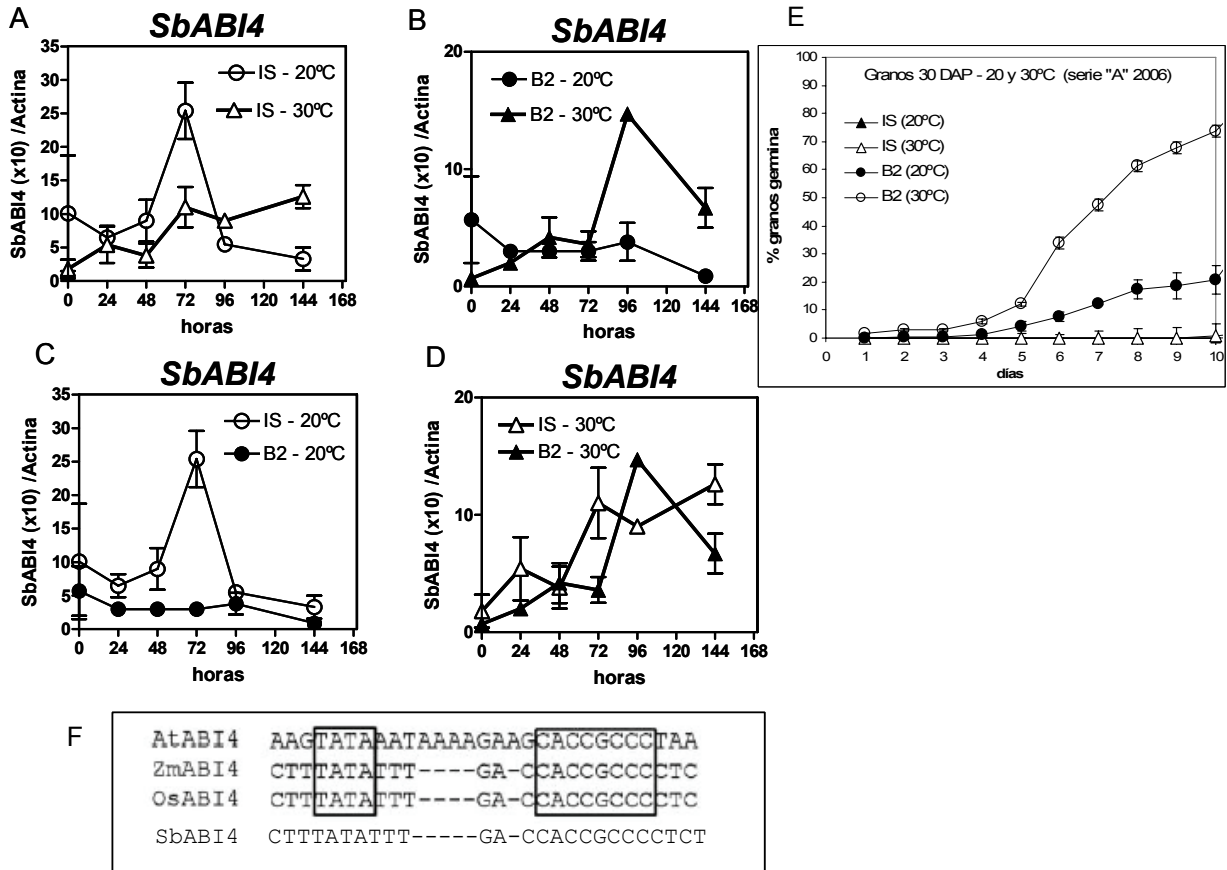
En la Fig.1.2 (campaña 2004) se puede observar que la expresión de *SbABI4* durante la incubación de cariopses inmaduros aumentó hacia las 96h en RedlandB2 y fue mayor que en IS9530 (unas 3 veces) lo cual se contradice con lo esperado para un regulador positivo de la señalización del ABA. En contraste con estos primeros resultados, la expresión de *SbABI4* en muestras de la campaña 2006 (Fig.1.3) aumentó abrupta y transitoriamente a las 72h en cariopses de IS9530, pero hasta ese momento y en tiempos posteriores se mantuvo cercana al valor inicial y sin diferencias significativas entre genotipos. Los resultados obtenidos en ambas campañas resultan contradictorios entre sí, ya que la expresión de *SbABI4* alcanza un nivel mayor en RedlandB2 comparado con IS9530 en el ensayo a 25°C mientras que este resultado se invierte en las

muestras de la campaña 2006, obtenidas durante la incubación a 20°C. Estos experimentos muestran una posible interacción entre la expresión de *SbABI4* en cariopses embebidos con la temperatura de incubación.

ABI4 es un factor de transcripción del tipo APETALA2 que participa positivamente en la señalización del ABA, y es poco lo que se conoce acerca de la regulación de esta proteína y de su gen en otras especies. En *Arabidopsis* se han identificado unos 145 genes que codifican para factores de transcripción que tienen un dominio del tipo AP2 (Xue 2003); esta es la segunda familia más abundante de factores de transcripción en plantas. Existen evidencias en maíz que sugieren que la transcripción de este gen estaría regulada negativamente por la proteína ABI4 (Niu *et.al.*, 2002) mediante la unión de ABI4 a una secuencia específica, CE (coupling element, que contiene la secuencia CACCG), ubicada inmediatamente debajo del TATA box de este gen. Estos autores observaron que esta misma configuración está conservada en *Arabidopsis*. Al analizar la región promotora de *SbABI4* se encontró la misma secuencia regulatoria descrita en maíz y en una posición similar (a 3 nt de distancia en dirección 3' del TATA box) (**Fig. 1.5.F**, y Anexo pág.25), lo cual sugiere que este mecanismo estaría conservado también en sorgo granífero.

Por el momento, se puede plantear como hipótesis que *SbABI4* puede bloquear su propia transcripción a través del pegado al CE adyacente al TATA box, y que la afinidad depende de la temperatura; el experimento donde *SbABI4* mostró una mayor expresión en RedlandB2 fue realizado a 25°C, mientras que la campaña 2006 la temperatura de incubación fue de 20°C, con un retraso en la germinación. A favor de esta hipótesis, se ha identificado en cebada un factor de transcripción tipo APETALA2 (homólogo de DREB1/CBF) HvCBF2 cuya capacidad de unión al ADN depende de la temperatura (Xue *et al.*, 2003). Para avanzar en la exploración de esta hipótesis, se midió la expresión de *SbABI4* en cariopses de 30 DPA durante la incubación a 30°C (este ensayo de incubación fue realizado en paralelo al de 20°C por Guillermina Mendiondo) (**Fig. 1.5.A-D**). Si la afinidad de ABI4 por el CE disminuye a mayor temperatura, se esperaría una mayor expresión en condiciones de alta temperatura para ambos genotipos. En estas condiciones la afinidad de ABI4 no solo sería menor para el CE adyacente a su TATA box, también lo sería para el CE en otros promotores. Durante la incubación a 30°C se profundizó el contraste entre genotipos (RedlandB2 alcanzó el 73% de germinación a los 10 días de incubación a 30°C, y 20% a 20°C, mientras que IS9530 no germinó a ninguna temperatura). De manera similar a lo que se había observado en el experimento a 25°C (campaña 2004, Fig.1.2) en este nuevo ensayo a 30°C desapareció la correspondencia entre la expresión de *SbABI4* y la dormición (Fig.1.5), y la expresión de *SbABI4* aumentó progresivamente durante la incubación en ambos genotipos, y hasta fue transitoriamente mayor en RedlandB2 a las 96 h. Por otro lado, al evaluar el efecto de la temperatura en cada genotipo, se observó que la expresión de *SbABI4* aumentó hasta ser significativamente mayor a 30°C a partir del cuarto día de incubación. Esta correspondencia negativa entre la transcripción de *SbABI4* y la expresión de la dormición podría ser, como se planteó mas arriba, consecuencia de una menor afinidad de ABI4 por el *coupling element* (CE) a 30°C (y se invierte la relación entre la expresión de *SbABI4* y el nivel de actividad de la proteína, aunque su abundancia sea mayor). Esto se postula en el modelo de la Fig.1.5.G.

Fig. 1.5: Efecto de la temperatura de incubación (20 y 30°C) sobre la expresión de *SbABI4* en IS9530 (A) y RedlandB2 (B). (C,D): expresión de *SbABI4* comparada entre genotipos a 20 y 30°C. Las muestras corresponden a cariopses de 30DPA de la campaña 2006. E) Evolución de la germinación de los cariopses enteros incubados en agua a 20 y 30°C. F) Alineamiento del putativo TATA box y sitio de unión de ABI4 para *Arabidopsis*, maíz, arroz (extraído de Niu *et al.*, 2002) y abajo se agregó la secuencia identificada en el promotor de *ABI4* de sorgo.



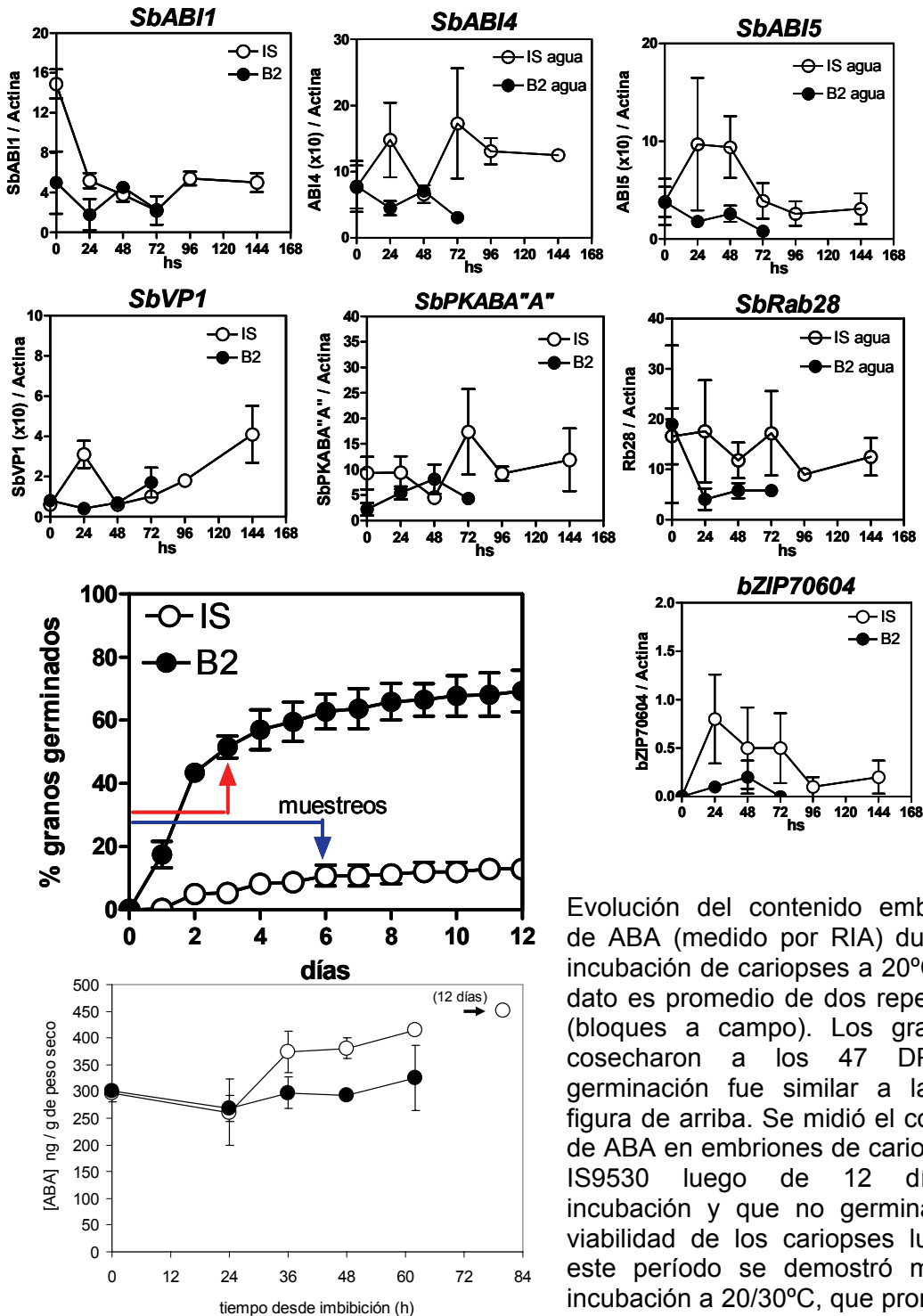
Paralelamente, durante la incubación de cariopses a 20°C, la expresión de *SbABI4* estaría controlada por otros factores regulatorios (posiblemente promovidos por ABA) y, por ej., en RedlandB2, los valores de *SbABI4* se mantienen bajos aunque los niveles de la proteína también sean bajos, mientras que en IS9530, se induce la expresión de *SbABI4* hasta alcanzar un nivel de proteína suficiente como para inhibir su propia transcripción, a partir de las 96h, hasta llevarla al nivel de RedlandB2. A favor de la existencia de otros factores regulatorios e inducibles por ABA y capaces de promover la expresión de *SbABI4*, se observó en embriones aislados e incubados en ABA 50uM la transcripción de *SbABI4* se indujo significativamente al cabo de 8 h de incubación con respecto al control en agua (Fig.1.4).

En resumen, a temperaturas menores y mas favorables para la expresión de la dormición, los factores inducibles por ABA que regulan la transcripción de *SbABI4* tendrían una importancia relativa mayor en el control de su expresión, y la regulación negativa de *SbABI4* por su proteína solamente ocurre cuando los niveles de ABI4 son elevados (como por ejemplo en IS9530 después de 4 días a 20°C), mientras que a temperaturas mayores a 25°C el aumento en la expresión de *SbABI4* podría ser consecuencia de una menor afinidad de la proteína ABI4 por el elemento de acople en el ADN (presente en su propio promotor y en el de otros genes). Se hace evidente la necesidad del uso de otras herramientas para abordar el rol de ABI4 en la regulación de la señalización del ABA en la semilla embebida. Será fundamental en este caso poder cuantificar la proteína mediante anticuerpos específicos, y también su capacidad de unión al ADN, por ejemplo mediante ensayos de movilidad en gel (*gel mobility shift assay*) en diferentes temperaturas. Por el momento se puede postular que la transcripción de *SbABI4* en el embrión durante la germinación de los cariopses está regulada diferencialmente en semillas embebidas de ambos genotipos; esta regulación además puede ser afectada por la temperatura de incubación, y esto se basa en la observación que a mayores temperaturas se pierde la correspondencia positiva entre la expresión de *SbABI4* y la expresión de la dormición. Para determinar si la actividad de ABI4 es diferente entre genotipos se requiere de una aproximación diferente y complementaria al análisis de expresión llevado a cabo en este trabajo.

Expresión de genes de señalización del ABA en cariopses maduros (42 DPA):

La expresión de los genes *SbABI1*, *SbABI5*, *SbABI4*, *SbVP1*, *SbPKABA* y *SbRAB28* tendió a ser mayor en IS9530 comparado con RedlandB2 durante la incubación de cariopses de 42 DPA (**Fig.1.6**). Esto nuevamente muestra una asociación entre la inhibición de la germinación en cariopses de IS9530 y una mayor actividad transcripcional de diversos genes involucrados en la señalización del ABA en contraste con lo observado en RedlandB2.

Fig.1.6: Expresión de genes de sorgo que codifican para los posibles factores de transcripción (ortólogos putativos de ABI4, ABI5, VP1) y otras proteínas involucradas en señalización del ABA (PKABA, una kinasa y ABI1, una fosfatasa tipo PP2C) durante la incubación a 20°C de cariopses de sorgo cosechados a los 42 DPA (campaña 2006). Abajo se muestran las curvas de germinación para este experimento, y la evolución en un experimento similar realizado a los 47 DPA durante la misma campaña (2006).



Evolución del contenido embrionario de ABA (medido por RIA) durante la incubación de cariopses a 20°C. Cada dato es promedio de dos repeticiones (bloques a campo). Los granos se cosecharon a los 47 DPA. La germinación fue similar a la de la figura de arriba. Se midió el contenido de ABA en embriones de cariopses de IS9530 luego de 12 días de incubación y que no germinaron (la viabilidad de los cariopses luego de este período se demostró mediante incubación a 20/30°C, que promovió la germinación de los mismos).

Expresión comparada de genes *ABIs*, *Rab28* y *PKABA* de sorgo en muestras de cariopses inmaduros (30DPA) y maduros (42 DPA) y su correlato con la pérdida de dormición ocurrida en este periodo:

Numerosos ensayos realizados en diferentes años muestran de manera recurrente que la pérdida de la dormición a lo largo del desarrollo está acompañada por una caída en la sensibilidad de los embriones al efecto inhibitorio del ABA, como se ejemplifica en la Fig.1.1.C. Se esperaba, por lo tanto, encontrar menores niveles de expresión para los genes *SbABI3*, *SbABI4*, *SbABI5* y *SbPKABA*, (y, por el contrario, mayor expresión de *SbABI1*) en cariopses que hubieran avanzado en la salida de la dormición como resultado del proceso de maduración. Sin embargo, al comparar los niveles de expresión para *SbABI4*, *SbABI5*, *SbVP1* en cariopses de 30 y 42 DPA no se encontró una disminución significativa en los niveles de expresión de alguno de estos genes que acompañara la pérdida de dormición ocurrida entre ambos momentos del desarrollo (**Fig.1.7**). Por el contrario, la expresión de algunos de estos genes (*SbABI5*, *SbRab28* y *SbPKABA*) fue transitoriamente mayor en cariopses de 42 DPA con respecto a los mismos tiempos de incubación en cariopses de 30 DPA (**Fig.1.7**). El contenido embrionario de ABA (Fig.1.6) en granos maduros de 47 DPA fue significativamente menor comparado con lo observado en granos de 30 DPA (unas tres veces; comparar con la Fig. 1.3.B) y, en contraste con la caída inicial observada en granos inmaduros, el ABA se mantuvo estable en RedlandB2 e incluso aumentó en IS9530, donde el valor estable alcanzado fue un 30% superior al de RedlandB2. Aunque pequeña, esta diferencia entre genotipos resultó significativa. Sin embargo los valores alcanzados en este experimento (entre 300 y 450 ng / g PS) fueron similares a los de 30 DPA (entre 300 y 400 ng/g PS) al cabo de 48 h de incubación, por lo cual el contenido de ABA en general no presenta una correspondencia obvia con la evolución de la germinación en diferentes situaciones de dormición.

Datos de años anteriores muestran que, en términos generales, la pérdida de dormición está acompañada por una disminución en la sensibilidad de los embriones aislados al efecto inhibitorio de ABA; sin embargo, la sensibilidad al ABA, no siempre acompaña exactamente los cambios en el índice de germinación –un estimador del nivel de dormición- durante el desarrollo y post-maduración. Esto sugiere que la sensibilidad al ABA no es la única variable detrás de la pérdida de la dormición en sorgo granífero. Es común encontrar en diferentes años, particularmente en RedlandB2, un patrón bifásico para la evolución del IG durante la salida de la dormición, y el “plateau” ó interfase entre ambas etapas de la curva se encuentra alrededor del momento de MF (Fig.1.1.C y Fig.1 de la introducción). Este patrón bifásico de salida de la dormición podría ser consecuencia de la acción de dos mecanismos fisiológicos diferentes, responsables de la pérdida de la dormición en diferentes etapas. En este contexto, y como se verá en los capítulos siguientes, es posible que la salida de la dormición esté también asociada con cambios en el metabolismo de las GA, y que la importancia relativa de ambos procesos (metabolismo de GA y sensibilidad al ABA) en el control de la germinación vaya cambiando a lo largo del tiempo. Por ej., en una primer etapa, la pérdida precoz de la dormición en RedlandB2 se puede asociar con una caída prematura de la sensibilidad al ABA; la salida de la dormición alrededor de MF podría estar acoplada a un aumento en la capacidad

de síntesis de GA en el grano embebido, incluso en ausencia de cambios importantes en la sensibilidad al ABA; posteriormente (entre MF y madurez de cosecha), el nivel de dormición continuaría decreciendo debido a una reducción adicional de la sensibilidad al ABA. Paralelamente, aunque los niveles de expresión de los genes analizados no fueron menores durante la incubación en cariopses maduros de 42 DPA comparando con cariopses inmaduros de 30DPA, los patrones de expresión fueron muy diferentes en ambos casos (**Fig.1.8**), y es posible que la “efectividad” de la señalización del ABA en el bloqueo de la germinación dependa también de la acción coordinada de los distintos componentes. Además de su rol en el mantenimiento de la dormición en el cariopse embebido, el ABA está involucrado en la adquisición de la tolerancia a la desecación y en la síntesis de compuestos de reserva ocurrida en esta etapa final del desarrollo. Entre los 30 y 42 DPA las semillas alcanzan la madurez fisiológica (MF), y además de la interrupción de la conexión vascular con la planta madre (cesa la acumulación de materia seca) continúa la deshidratación (pasan de tener cerca de un 25-30% a un 12-15% de humedad). La formación del endosperma córneo o vítreo por fuera del endosperma harinoso también ha ocurrido en esta etapa. Por lo tanto es posible que los cambios en los patrones de expresión de los genes ABI entre estos dos momentos del desarrollo esté reflejando también el diferente peso relativo de estos otros procesos mediados por el ABA en cariopses de 42 DPA con respecto a etapas previas del desarrollo.

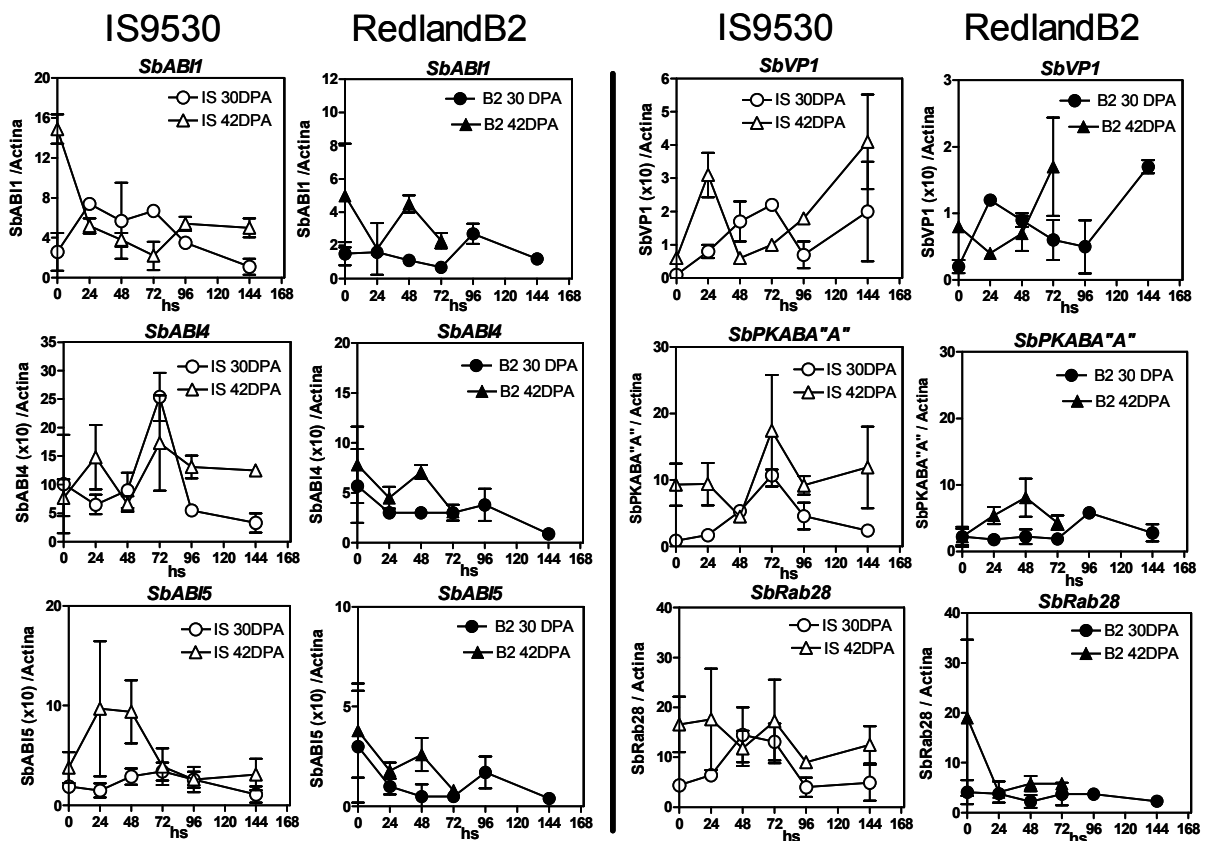


Fig.1.7: Expresión comparada de genes de la señalización del ABA en dos momentos distintos del desarrollo (30 y 42 DPA) para IS9530 y RedlandB2, durante la incubación de cariopses enteros a 20°C. Las extracciones de RNA se hicieron a partir de embriones separados del resto del cariopse. Las comparaciones entre experimentos son posibles ya que se usó siempre la misma curva patrón (y manteniendo las mismas cantidades relativas de moléculas de templado por dilución patrón) para cada gen y para *Actina*.

Temporalidad de la expresión de genes de señalización del ABA:

En la **Fig.1.8** (los gráficos de esta figura se obtuvieron a partir de los mismos datos presentados en las Fig.1.3 y 1.6) se puede observar que los patrones de expresión obtenidos para los genes candidatos analizados fueron muy diferentes entre 30 y 42 DPA para ambos genotipos.

En cariopses inmaduros de IS9530 (30 DPA), donde se inhibió por completo la germinación a 20°C, se observó un aumento transitorio para *SbVP1*, *SbPKABA*, *SbABI4* y *SbABI5*, con un máximo de expresión a las 72 h en IS9530. De estos genes, *SbVP1* y *SbPKABA* mostraron los valores máximos de inducción: *SbPKABA*: x10 y *SbVP1*: x20 veces con respecto al tiempo cero. A los 42 DPA el porcentaje de germinación para IS9530 empezó a aumentar lentamente después de dos días de incubación a 20°C. En este ensayo el grado de inducción fue en general menor y, en contraste con lo observado anteriormente a los 30 DPA, el nivel de inducción para *SbPKABA* y *SbVP1* con respecto al tiempo cero fue de 2 y 5 veces respectivamente.

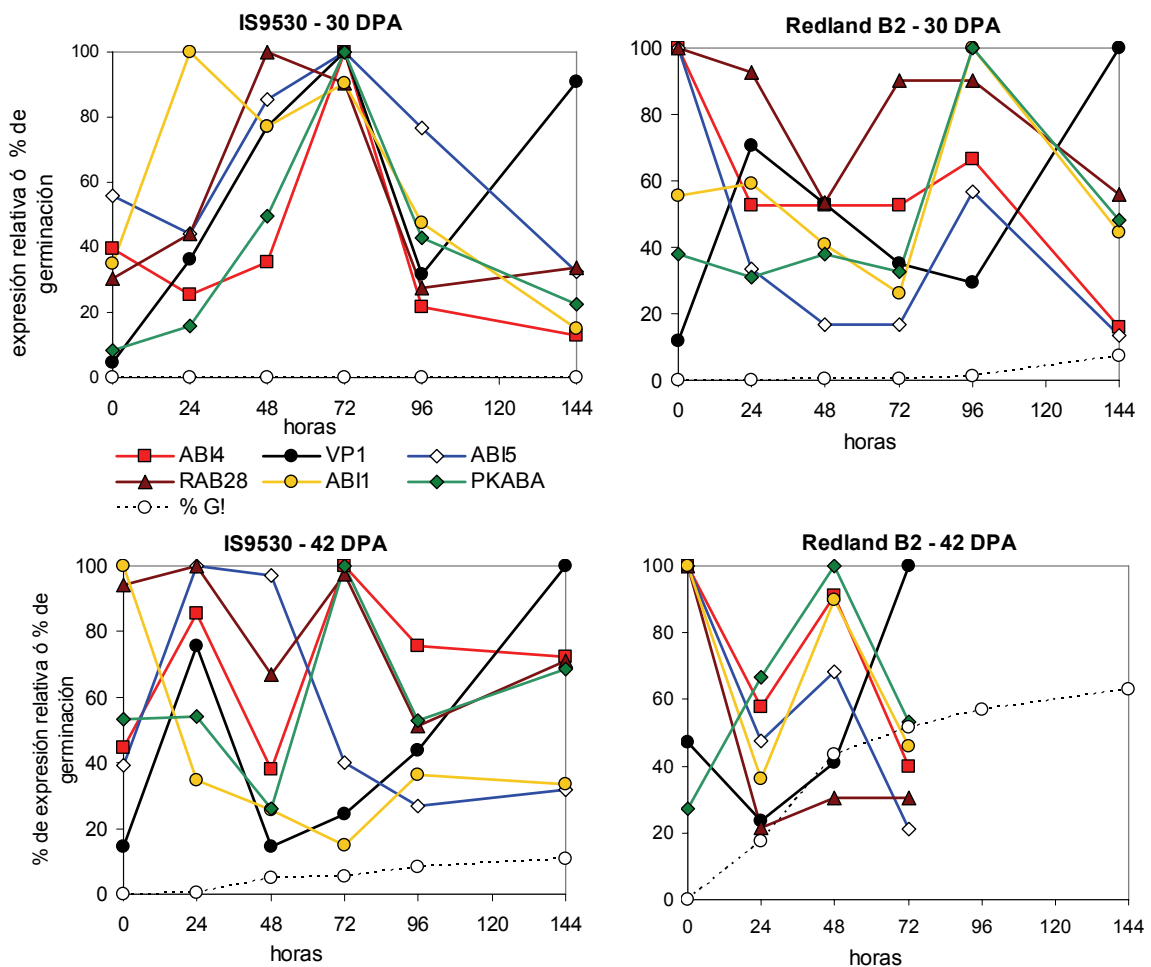
Paralelamente, en cariopses de RedlandB2 la expresión de estos genes implicados en la señalización del ABA mostró una tendencia general a disminuir al cabo de las primeras 24 h de incubación, tanto a 30 DPA como a 42 DPA; como excepciones a este patrón, se observó que *SbVP1* aumentó unas 6 veces durante las primeras 24 h en cariopses de 30 DPA, y en cariopses de 42 DPA, *SbPKABA*, también se indujo durante las primeras 48 h de incubación (x 4).

La inducción de los distintos genes en cariopses dormidos de IS9530 (30 DPA) no ocurrió de manera simultánea para todos ellos. Durante las primeras 24 h se indujeron *SbVP1* y *SbABI1*; luego, entre 24 y 48 h se indujeron *SbABI5*, *SbPKABA* y *SbRAB28*; por último, se indujo *SbABI4* entre 48 y 72 h. Los diferentes genes sí coinciden en la caída de su expresión, que ocurre entre 72 y 96 h. Los niveles de expresión alcanzados posteriormente a las 96 h por los diferentes genes analizados fueron similares a la observada en cariopses de RedlandB2 que sí germinan (ver Fig.1.3); esto sugiere que la temporalidad de la participación de factores de señalización del ABA (y no su nivel de expresión en cualquier momento) es importante para definir si la dormición bloquea la germinación de la semilla o no. En RedlandB2 la expresión de estos genes se mantuvo en un nivel bajo y no mostró un patrón de inducción. La inducción transitoria observada en cariopses dormidos de IS9530 sugiere que la participación en el bloqueo de la germinación de estas proteínas ocurre en una etapa acotada durante la incubación, y que luego ya no es necesaria una elevada actividad transcripcional (y posiblemente, de las proteínas), para sostener el bloqueo de la germinación.

La activación coordinada de diferentes factores de transcripción y de otros componentes de la señalización del ABA como *SbPKABA* y *SbABI1* sugiere que estos componentes están siendo afectados por un factor regulatorio común, el cual estaría actuando “aguas arriba” de estos componentes. Hay evidencias de que estos componentes pueden afectar mutuamente su actividad: no solo se inducen por ABA, sino que además se ha demostrado que PKABA1 aumenta la estabilidad de TaABF (el ortólogo de ABI5 en trigo) por fosforilación y por lo tanto también promueve la transcripción del gen *TABF/ABI5* (Johnson *et al.*, 2002); VP1 también es necesario para la activación de ABI5 (Suzuki *et al.*, 2003), y es posible que estos FT y PKABA1 afecten mutuamente su transcripción de formas aún no

conocidas. La sobreexpresión ectópica de *ABI3* en *Arabidopsis* induce fuertemente la expresión de *ABI5* en tejidos vegetativos donde su expresión normal es baja (Finkelstein y Lynch, 2000). Por el momento es imposible decir si los componentes analizados están siendo co-regulados por un factor común, y/o si la modificación de uno solo de ellos es capaz de reflejarse en los otros componentes por mecanismos de regulación recíproca.

Fig.1.8: Expresión relativa para diferentes genes de señalización del ABA durante la incubación de cariopses a 20°C, para IS9530 y RedlandB2 cosechados en dos momentos del desarrollo (30 y 42 DPA, campaña 2006); la expresión de cada gen se relativizó al valor máximo de expresión obtenido en cada medición y por genotipo. Se muestra también la evolución del porcentaje de germinación en cada caso (círculos blancos).



CONCLUSIONES del Capítulo 1.

Los resultados presentados en este capítulo permiten aceptar la hipótesis i) planteada al inicio de esta tesis, que postulaba una menor expresión de uno o varios componentes de la señalización del ABA en embriones de cariopses de RedlandB2, los cuales exhiben un bajo nivel de dormición, en contraste con IS9530. Esto resultó cierto para los genes *SbABI5*, *SbVP1* y *SbPKABA*, para los cuales se observó una inducción significativa durante la incubación de cariopses inmaduros de IS9530, que exhiben un alto nivel de dormición. La excepción a este patrón fue *SbABI4*, que mostró una interacción con la temperatura de incubación, aunque en condiciones favorables para la expresión de la dormición este gen también se indujo significativamente y de manera coordinada con los otros reguladores positivos analizados. En cambio la expresión de *SbABI1*, un regulador negativo de la señalización del ABA, también se indujo y alcanzó valores mayores en cariopses dormidos de IS9530; aunque esto sugiere que *SbABI1* no estaría entonces involucrado en la baja sensibilidad al ABA de los embriones de RedlandB2, está de acuerdo con un modelo de regulación negativa por retroalimentación positiva de este gen por ABA, descrito para *Arabidopsis* y *Fagus sylvatica*. De manera similar a lo observado para *SbABI1*, la expresión de *SbABI5* también se indujo por ABA, demostrando que la regulación de este factor de transcripción está conservada en sorgo con respecto a otras especies. Esta inducción fue relativamente mayor en IS9530 con respecto a RedlandB2, de acuerdo con la mayor sensibilidad al ABA en IS9530.

Si se asume una relación directa entre el nivel de expresión de un gen y los niveles de la proteína, estos datos sugieren que la expresión de un alto nivel de dormición observado en semillas inmaduras de IS9530 comparando con RedlandB2 estaría mediada, al menos en parte, por una mayor actividad de las proteínas ABI5, ABI4, VP1 y PKABA. Al comparar la expresión de estos genes durante la incubación de semillas inmaduras (30 DPA) y semillas maduras (42 DPA), se pudo notar que los patrones de expresión, y no los niveles absolutos de expresión, constituyen la principal diferencia entre semillas inmaduras y maduras, y esto podría estar asociado con la diferente expresión de la dormición (y sensibilidad al ABA) en estos dos momentos del desarrollo.

De los componentes evaluados, no es posible identificar a partir de nuestros datos un responsable primario de esta mayor activación. Por el momento es imposible decir si los componentes analizados están siendo co-regulados por un factor común, y/o si la modificación de uno solo de ellos es capaz de reflejarse en los otros componentes por mecanismos de regulación recíproca. Paralelamente al análisis de expresión llevado a cabo en este trabajo de tesis, se está llevando adelante la secuenciación de estos genes y parte de la región 5' en ambos genotipos, con el doble propósito de identificar posibles diferencias que afecten un elemento *cis*-regulatorio en el promotor ó la secuencia de la proteína y posiblemente su funcionalidad, e identificar polimorfismos que permitan su uso como marcadores. Las tareas de secuenciación se están llevando a cabo en el INTA de Castelar, bajo la dirección de la Dra. Ruth Heinz y Luis Fernández. Este proyecto apunta a la incorporación de nuevos marcadores moleculares en tres regiones-QTLs identificadas en un mapa de ligamiento iniciado por Diego Lijavetzky y que se basó en una población segregante resultado del cruzamiento RedlandB2xIS9530.

CAPÍTULO 2

“Rol del metabolismo de las giberelinas en la expresión de diferentes niveles de dormición en cariopses embebidos”.

RESUMEN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en relación a los objetivos específicos b) y c) que incluyen mediciones de GA y de expresión de genes del metabolismo de GA. A partir de las mediciones de GA durante la incubación de cariopses inmaduros se propone la existencia de dos posibles fracciones de giberelinas. Una de ellas, extraída a pH muy ácido, mostró altos niveles de GA activas en cariopses inmaduros de ambos genotipos desde el tiempo cero de incubación, y tendieron a mantenerse estables durante el período muestreado. Estas GA podrían estar en el apoplasto del embrión formando parte de complejos con otros compuestos como polifenoles. La otra fracción de GA detectadas luego de la extracción a pH neutro, mostró patrones diferentes para GA1 y GA3 en ambos genotipos y que se asociaron con la respuesta de germinación. Estas GA, a diferencia de la fracción anterior, parecen ser el resultado de la síntesis de novo durante la incubación, además de estar reguladas de manera diferente en ambos genotipos, y podrían estar implicadas principalmente en el crecimiento del embrión. Los genes de síntesis de GA se indujeron durante la incubación de los cariopses en ambos genotipos, aunque no se observó una mayor expresión en cariopses de RedlandB2; por el contrario, dos genes de la síntesis de GA, GA20oxidasa1 y 2, parecen estar regulados negativamente por producto, similar a lo que ocurre en otras especies. Al contrario de lo expresado en la hipótesis iii) la expresión de varios genes de biosíntesis de GA fue mayor en cariopses de IS9530 (que expresan mayor dormición y exhiben menor contenido de GA) comparando con RedlandB2, por lo cual se planteó una posible regulación negativa por GA. En efecto, la expresión de estos genes tendió a disminuir en presencia de GA exógenas. Se identificaron cuatro genes para enzimas GA 2-oxidasa implicadas en la inactivación de GA, y se midieron tres por QPCR. Estos genes mostraron una mayor expresión en cariopses dormidos de IS9530 y esto explicaría los menores niveles de GA1 y GA3 durante la incubación en este genotipo. Por el momento no se detectaron los catabolitos correspondientes que permitan la confirmación de una mayor tasa de inactivación de GA en cariopses dormidos de IS9530.

INTRODUCCIÓN

Una forma indirecta de observar el requerimiento de la síntesis *de novo* de GA para la germinación es mediante la incubación de las semillas en presencia de un inhibidor de la síntesis de GA como Paclobutrazol ó Prohexadiona. Para evaluar además cómo varía este requerimiento durante el desarrollo de las semillas, se cosecharon cariopses periódicamente a partir de los 15 DPA y durante la post-maduración, y se incubaron en agua (control) o en una solución de Paclobutrazol (1 g/L) ó Prohexadiona (100 uM). En la figura 2.1 se muestra el índice de germinación (IG) (calculado según Steinbach *et al.*, 1995) obtenido para cariopses de IS9530 y RedlandB2 cosechados en diferentes momentos durante el desarrollo y postmaduración, e incubados en agua ó una solución de paclobutrazol ó prohexadiona.

En RedlandB2, los inhibidores de síntesis de GA agregados al medio de incubación afectaron significativamente la germinación de cariopses cosechados en el período previo a la MF, lo cual muestra que la síntesis de GA *de novo* es un requerimiento para la germinación en esta etapa; el aumento del IG entre 20

y 35DPA en cariopses inmaduros de RedlandB2 podría estar a la vez asociado con un incremento en esta capacidad de síntesis *de novo* de GA. A los 40DPA (se alcanzó la MF) y posteriormente el efecto de los inhibidores sobre el índice de germinación fue nulo o menor a lo observado previamente. Esto sugiere que la germinación de cariopses maduros de RedlandB2 no depende de manera significativa de la síntesis *de novo* de GA, y una explicación posible es que ya cuentan con un pool de GA activas “almacenadas”. Adicionalmente, el aumento del IG ocurrido después de MF en este genotipo podría depender de una disminución de la sensibilidad del embrión al ABA, y al desaparecer la inhibición de la germinación por ABA lo mismo ocurre con el requerimiento de GA para la promoción de la germinación.

En cambio, en IS9530, la germinación durante una primer etapa de la salida de la dormición (entre 40 y 60 DPA aproximadamente) no parece depender de la síntesis *de novo* de GA, ya que los inhibidores no afectaron el IG aún cuando éste alcanzó valores comparables (ie., IG=20-30) a los de RedlandB2 en la etapa previa a MF, donde se observó un efecto importante de los inhibidores. La síntesis *de novo* de GA, evaluada de esta manera, resultó relevante en una etapa posterior (65 – 85 DPA), durante la post-maduración de los cariopses. Por lo tanto, la participación de la síntesis *de novo* de GA en la promoción de la germinación parece ocurrir en etapas del desarrollo diferentes para ambos genotipos; en RedlandB2, la síntesis *de novo* de GA es necesaria para la promoción de la germinación de los cariopses inmaduros, y coincide con la etapa en que este genotipo sale precozmente de la dormición. En IS9530 solo se distinguió un efecto de los inhibidores varias semanas después de MF, cuando el IG ya era mayor a 30, y en plena etapa de post-maduración. Esto sugiere que a lo largo del desarrollo la regulación de la síntesis de GA *de novo* en el grano embebido y/o su requerimiento para la germinación es diferente en ambos genotipos, y además puede variar durante el desarrollo y post-maduración para cada genotipo. Esto podría depender de cambios en la intensidad de otros procesos como la sensibilidad al ABA, o la existencia de fuentes de GA alternativas a la síntesis de novo, como por ej., la liberación de GA a partir de la hidrólisis de conjugados.

Por lo tanto, no se puede descartar un rol de las GA aún en ausencia de respuesta a los inhibidores de biosíntesis de estas hormonas. Las GA endógenas que promueven la germinación de las semillas durante la imbibición podrían provenir no solamente de la síntesis *de novo*, sino que paralelamente podría existir un “reservorio” de GA bajo la forma de conjugados; mientras están conjugadas, las GA no tendrían actividad, pero éstas podrían ser liberadas (en la forma de GA activas o precursores) mediante la actividad de enzimas específicas. Esto podría ser cierto en cariopses maduros de RedlandB2, donde no se observa efecto de inhibidores de biosíntesis de GA, o en las etapas iniciales de pérdida de la dormición en IS9530. Los resultados presentados en este capítulo exploran algunos de estos aspectos del metabolismo de GA y sus diferencias entre genotipos, a través de análisis de los niveles endógenos de GA y de la expresión de los genes de su metabolismo.

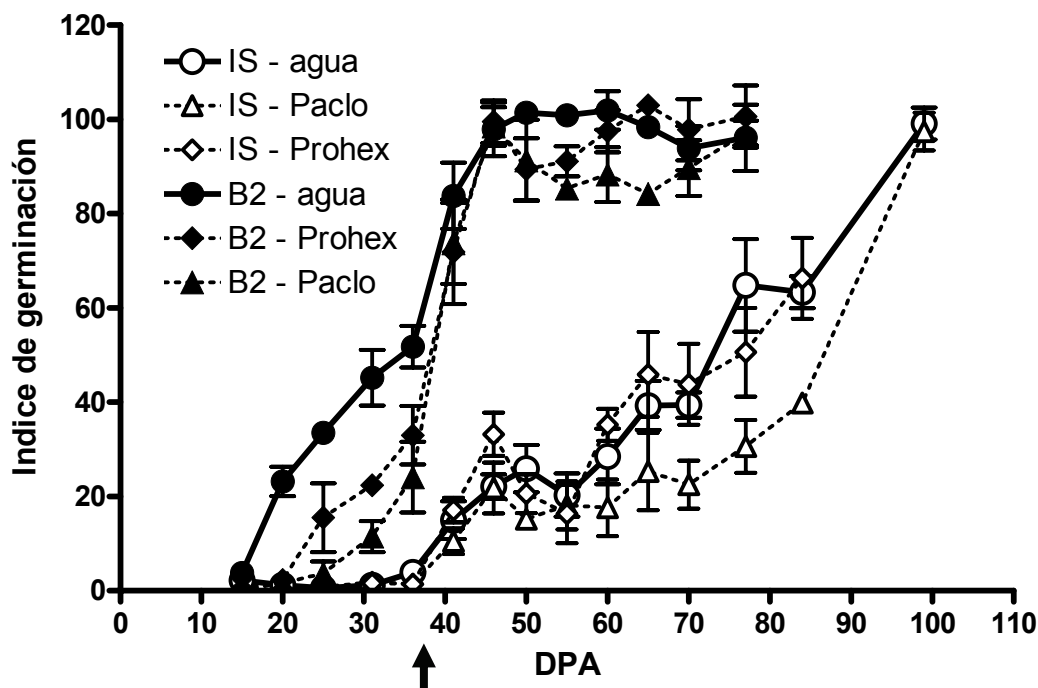


Fig. 2.1: Evolución del índice de germinación durante el desarrollo y post-maduración de los cariopses de dos líneas de sorgo granífero: IS9530 (alta dormición) y RedlandB2 (baja dormición). Los cariopses se cosecharon e incubaron a 25°C en cajas de Petri con 6 ml de agua, Paclobutrazol 100uM ó Prohexadiona 100uM (ambos inhibidores de la biosíntesis de GA). Cada dato es promedio de tres bloques a campo (un pool de semillas de 10 plantas / bloque). La flecha señala el momento aproximado de madurez fisiológica, similar para ambos genotipos. Datos de la campaña 2003.

Capítulo 2. Sección A: Evolución del contenido de giberelinas durante la incubación de las semillas.

Objetivo específico b): Evaluar si existe una síntesis diferencial de GA durante la incubación de cariopses inmaduros (30 DPA) provenientes de dos líneas de sorgo con susceptibilidad contrastante al BPC (IS9530 y RedlandB2, alta y baja dormición respectivamente).

Introducción: Metabolismo de giberelinas en plantas.

La biosíntesis de GA se divide en tres etapas en función de las enzimas involucradas y de su localización subcelular (Hedden y Phillips, 2000). En el ANEXO de esta tesis se puede ver un esquema de la biosíntesis de GA tomado de Hedden y Phillips (2000). La primera fase involucra la producción de *ent*-kaurene a partir del ciclado del geranil-geranil difosfato (GGDP) que es llevado a cabo por enzimas solubles localizadas al menos parcialmente en proplástidos (en tejidos verdes, esto ocurre en los cloroplastos). En las segunda y tercera etapas el *ent*-kaurene es convertido secuencialmente en GA₁₂-aldehído por monooxigenasas dependientes del citocromo CytP450 asociadas a membranas. Finalmente, GA₁₂-aldehído es convertido en GA con actividad biológica (GA₁, GA₄,

GA₃ y GA₇) por dioxigenasas 2-oxoglutarato-dependientes localizadas en el citosol que incluyen a la GA 7-oxidasa, GA20-oxidasa; GA 3β-hidroxilasa, mientras que otra dioxigenasa, la GA 2-oxidasa, es responsable de la conversión de GA activas en inactivas (GA₅₁, GA₂₉, GA₃₄ y GA₈, que son subsecuentemente transformadas en catabolitos por la misma enzima). Entre las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, la GA20-oxidasa es responsable de las sucesivas oxidaciones a nivel del C-20, que resultan en la pérdida de este carbono en forma de CO₂ y por lo tanto en la formación de GAs de 19 carbonos que son las que tienen actividad biológica (Lange, 1998). La oxidación a nivel del C-20 está considerada un sitio clave en la regulación de la producción de giberelinas biológicamente activas (Phillips *et al.*, 1995).

Estudios recientes (Perez-Flores *et al.*, 2003) evaluaron la participación del gen que codifica para una GA 20-oxidasa en el control de la dormición en *Sorghum bicolor*. Los resultados obtenidos mostraron altos niveles de expresión de este gen en embriones de líneas con baja dormición mientras que prácticamente no se detectó expresión en embriones de cariopses con dormición. La expresión del gen precedió la emergencia de la radícula en estos cariopses y esto resulta coherente con mediciones de GAs en otros cariopses de sorgo que muestran que el contenido embrionario de giberelinas activas (GA₄) en cariopses con baja dormición alcanzó una concentración 10 veces superior al de embriones de cariopses dormidos. Estos resultados permiten suponer que la menor dormición de cariopses de líneas susceptibles al BPC se expresa, además, a través de una mayor acumulación de GA promotoras de la germinación y sugieren que esta síntesis diferencial estaría regulada, en parte, a nivel de la expresión del gen que codifica para la GA20-oxidasa. Además, es conocido que la promoción de la germinación por la luz en algunas semillas que requieren de este estímulo está mediada por una síntesis de GA activas; esta promoción de la síntesis de GA por la luz está regulada a nivel de la expresión del gen que codifica para la GA3β-hidroxilasa (la enzima que lleva a cabo el paso final para la producción de GA activas; Tomoyasu *et al.*, 1998). No se sabe, sin embargo, si este gen cumple una función regulatoria similar en la expresión de la dormición de cariopses de sorgo inmaduros. Más aún, cabe la posibilidad, aún no explorada, de que otras enzimas de la biosíntesis de GAs (además de las dos mencionadas) estén también involucradas en esta regulación diferencial de la síntesis de GA entre cariopses con dormición contrastante. La caracterización de la dinámica de biosíntesis de GA (i.e., a través del análisis de la expresión de los genes que codifican para cada una de las enzimas de la biosíntesis y de la cuantificación de los distintos precursores a lo largo de la incubación) permitirá identificar genes responsables de la regulación diferencial de los niveles endógenos de GA en cariopses con diferente nivel de dormición.

Metodología

Se tomaron muestras de embriones para la cuantificación de GA (precursores, GA activas y catabolitos). Las muestras analizadas corresponden al experimento de cariopses cosechados a los 30 DPA e incubados en agua a 25°C (campaña 2004, serie "G"). Se muestrearon los mismos tiempos de incubación que para extracción de ARN. Las muestras se liofilizaron y se enviaron al laboratorio del Dr. Bottini en la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza) para su extracción y cuantificación por CG-MS. El protocolo para la

extracción y purificación de GA se describe en la sección principal de materiales y métodos y es similar al descrito en Gaskin *et al.*, (1995). Cada muestra de embriones liofilizada y molida se dividió en dos partes; cada mitad se extrajo con MeOH 80% pero variando el pH de la fase acuosa: pH=3 y pH=7. Existe unanimidad en la literatura con respecto a la forma de realizar la extracción; aunque no se ha planteado nunca explícitamente la comparación entre ambas formas de extracción, la mayoría de los trabajos publicados declaran haber realizado la extracción a pH neutro. Sin embargo, observaciones preliminares en sorgo nos sugirieron que el pH de la fase acuosa en la extracción con MeOH 80% puede afectar fuertemente los resultados. El propósito de usar un pH neutro (7) fue el de contrastar nuestros resultados en sorgo con los de otros trabajos publicados para otras especies, donde la extracción se hace en MeOH 80% sin acidificar. Algunos trabajos del siglo pasado destacan la interacción entre GA (así como otras hormonas) con otros compuestos propios de los extractos vegetales; por ej., (Nutbeam y Briggs, 1982) reportaron que las GA radioactivas agregadas a semillas de cebada embebidas se asociaron con compuestos pertenecientes a una fracción de alto peso molecular y escasa movilidad en cromatografía en papel, y que incluye polifenoles. La separación de las GA de esta fracción conteniendo polifenoles se logró al bajar el pH durante la extracción. Estos autores concluyen que la existencia de complejos de GA con otros compuestos debería tenerse en cuenta para decidir el método de extracción adecuado, ya que podrían obtenerse resultados muy diferentes si se logra desestabilizar o no estos posibles complejos. Sin embargo, esta posible interacción entre GA y otros compuestos no fue abordada en trabajos posteriores por ninguno de los grupos que analizan hormonas en semillas, y para cada trabajo siempre se usó un solo protocolo para las extracciones de hormonas.

Resultados. Capítulo 2. Sección A.

Los niveles de GA activas (GA₁ y GA₃) extraídas a pH neutro aumentaron durante la incubación y fueron mayores en cariopses de RedlandB2.

A partir de la extracción a pH =7, se detectaron solamente GA₁ y GA₃, ambas GA activas provenientes de la vía hidroxilativa temprana. En esta extracción no se detectaron las otras dos GA activas GA₄ y GA₇, ambas producto de la vía no-hidroxilativa. En la **Fig.2.2** se puede observar que el contenido de GA₁ aumenta desde valores no detectables a las 48 h, hasta 120 ng/g de peso seco a las 72h para embriones provenientes de cariopses de RedlandB2, y luego disminuye a menos de la mitad a las 96h. En IS9530 los valores de GA₁ empiezan a aumentar a recién a las 96h y alcanzan un valor similar al de RedlandB2 para este mismo tiempo de incubación. Paralelamente, los niveles de GA₃ también aumentan durante la incubación en ambos genotipos, aunque este incremento ocurre desde tiempos más tempranos en RedlandB2 y los valores se mantienen siempre por arriba de los valores de IS9530. En conjunto, estos datos muestran que el contenido de GAs activas en el embrión aumenta durante la incubación de los cariopses en la etapa previa al inicio del crecimiento del embrión, y este aumento es mayor en los cariopses de RedlandB2 comparado con IS9530.

Los niveles de GA activas (GA1 y GA3) fueron 100 veces mayores luego de la extracción a pH=3, y no se correlacionan con los patrones de germinación de las semillas.

Las mediciones de contenido de GA activas endógenas luego de la extracción ácida mostraron no solo patrones muy diferentes a los observados luego de la extracción a pH neutro, sino que además los valores obtenidos para GA₁ y GA₃ en las mismas muestras fueron superiores en dos órdenes de magnitud (**Fig.2.2**). Estos valores son muy superiores también a los observados en mediciones previas en cariopses maduros (Pérez-Flores *et al.*, 2003) donde el protocolo de extracción no consideraba la acidificación a pH 3.0 de la fase acuosa (pH aproximado, 5.0). La evolución de las GA activas, GA₁ y GA₃, ambas provenientes de la vía hidroxilativa temprana, mostraron patrones oscilantes, y los valores fueron transitoriamente mayores en IS9530 para GA₃ a las 48 y 72h, mientras que GA₁ fue superior en RedlandB2 a las 24 y 48h de incubación. A diferencia de las mediciones de GA luego de la extracción a pH = 7, no pudo asociarse la evolución de GA₁ y GA₃ luego de la extracción ácida con la respuesta de germinación de las semillas; los valores de GA₁ y GA₃ fueron elevados antes de la imbibición (tiempo cero), y no mostraron un patrón diferente entre ambos genotipos durante la incubación. Estos valores de GA1 y GA3 resultan elevados cuando se los compara con datos de la literatura obtenidos en semillas de *Arabidopsis*, maíz y sorgo. En cariopses de maíz (White *et al.*, 2000b) el contenido de GA₃ no superó el valor de 1 ng/g de peso fresco, y el contenido de GA1 fue de 1 ng/g de PS en *Arabidopsis* (Ogawa *et al.*, 2003). Dewar *et al.* (1998) midieron GA₁ y GA₃ durante la germinación de semillas de sorgo granífero, y los niveles combinados de GA₁ y GA₃ no superaron los 18 ng / g de PS en el embrión. En todos estos trabajos las GA se extrajeron sin acidificar la fase acuosa durante la extracción con MeOH 80%. En la **tabla 2.1** se muestran valores de contenido embrionario de GA₁ y GA₄ obtenidos durante la incubación de cariopses maduros (39 DPA; ensayos realizados durante la campaña 2002) de IS9530 y RedlandB2 luego de la extracción en MeOH:H₂O:AcOH (80:20:1) (pH aproximado: 5.0). Los valores de GA₁ fueron unas 25 veces menores que los presentados en la Fig.2.2., mientras que no se detectó GA₃ en estas muestras (sí se detectó GA₄, y su contenido estuvo cerca de los valores presentados en la Fig.2.3). Otras mediciones previas donde se procesaron cariopses de sorgo enteros maduros (60 DPA) mostraron valores para GA₁₊₃ que oscilaron entre 200 y 700 ng / g de PS, luego de la extracción a pH moderadamente ácido (aproximadamente 5.0) (Benech-Arnold *et al.*, 2003).

Tiempo de incubación (h)	GA ₄ (ng / g PS)		GA ₁ (ng / g PS)		% de germinación	
	RedlandB2	IS9530	RedlandB2	IS9530	RedlandB2	IS9530
0	378 ± 275	181 ± 47	428 ± 182	288 ± 85	0 ± 0	0 ± 0
12	654 ± 64	211 ± 180	410 ± 203	189 ± 12	2 ± 0.5	0 ± 0
24	1092 ± 207	83 ± 39	405 ± 10	133 ± 28	7.1 ± 1.4	1 ± 0.5
92	ND	ND	ND	ND	26.4 ± 1.8	1 ± 0.8

Tabla 2.1: Evolución del contenido embrionario de GA₁ y GA₄ durante la incubación de cariopses enteros en agua (25°C) cosechados a los 39 DPA, para IS9530 y RedlandB2 (campaña 2002). No se detectó GA3. Las muestras se extrajeron en MeOH:H₂O:AcO⁻ 80:20:1 (pH aproximado 5.0). Estos datos fueron publicados en Pérez-Flores et al. (2003).

Estos valores son también unas 100 veces menores a los de la Fig.2.2. Por lo tanto, los valores obtenidos para GA₁ y GA₃ durante este trabajo de tesis y mostrados en la Fig.2.3 muestran un fuerte contraste con otras mediciones previas en esta y otras especies como maíz y *Arabidopsis*. El alto contenido de GA en estos cariopses inmaduros detectado luego de la extracción ácida no parece estar asociado al nivel de dormición de los mismos, ya que estos cariopses presentan aún un nivel de dormición moderado (RedlandB2) ó elevado (IS9530).

Una explicación posible es que estas GA que se extraen a pH muy ácido (cercano a 3.0, y no a pH 5.0 – 7.0) no están disponibles en su totalidad bajo condiciones fisiológicas, ya que estarían formando parte de algún complejo con algún componente celular que funcionaría como una “trampa” de GA activas, secuestrándolas del medio. Es llamativo, en este sentido, también el contraste en las cantidades encontradas para estas GA activas y los otros metabolitos, los cuales se detectaron en concentraciones unas 100 veces menores (por ej., GA₂₀, que es el precursor inmediato de GA₃, tiene valores entre 10 y 100ng/g, mientras que GA₃ oscila entre 5000 y 12000 ng/g de PS). Aunque la vida media de un precursor pueda ser muy corta (y no llega a acumularse en gran cantidad) debido a una alta actividad enzimática que lo utiliza como sustrato, esta gran diferencia de valores sugiere que los altos contenidos de GA₁ y GA₃ no responden a la actividad de biosíntesis durante la incubación; estos compuestos se habrían acumulado previamente a la incubación (los valores al inicio de la incubación son elevados y no cambian significativamente al final del período muestreado) y el aporte de GA sintetizadas *de novo* durante la incubación es cuantitativamente menor. Sin embargo, estas GA *de novo* podrían ser las que se detectan a pH neutro y que tienen un efecto promotor de la germinación ya que están libres en el citoplasma y no forman parte de complejos con otros compuestos.

La formación de estos hipotéticos complejos podría involucrar por ej., polifenoles; estos compuestos se acumulan en abundancia en semillas de esta especie, y suelen interferir además con las extracciones de RNA y reacciones de RT-PCR. Podría plantearse que esta interacción entre GA y polifenoles (o el compuesto que sea) ocurre espontáneamente durante la ruptura de los tejidos durante la extracción, y de esta manera entran en contacto compuestos que *in vivo* estaban en compartimentos separados. Además, esta interacción se vería favorecida a pH neutro, mientras que sería menor a pH 3.0. Si esto fuese así, lo que se esperaría ver a pH neutro es una fracción residual (más o menos proporcional al valor total) de GA que no quedaron atrapadas en estos complejos. Sin embargo, los patrones de GA₁ y GA₃ para ambos genotipos no parecen responder a esta hipótesis, ya que se observa un claro aumento en los niveles de GA₁ y GA₃ a lo largo de la incubación que no guarda relación con los patrones observados a pH 3.0, y que además es coherente con la respuesta germinativa de ambos genotipos. La escasa variabilidad entre duplicados biológicos, expresada por las barras de error, también apoya la idea de que estos valores de GA₁ y GA₃ no son resultado de una reacción inespecífica y espontánea durante la extracción, sino que son el resultado de un proceso biológicamente controlado.

Regulación del metabolismo de GA durante la incubación: niveles de precursores y catabolitos de GA.

En cuanto a otros compuestos del metabolismo de las GA, luego de la extracción en MeOH 80% sin acidificar la fase acuosa (pH 7.0) no se detectó ninguno de los precursores ni de los catabolitos esperados. Sí se detectaron diversos de estos compuestos luego de la extracción ácida (**Fig.2.3**), y los valores obtenidos fueron relativamente bajos comparados con los de GA₃ y GA₁, aunque más parecidos a los niveles citados en la literatura (Ogawa *et al.*, 2003) y dentro del orden de los niveles de GA₁ y GA₃ obtenidos a pH neutro. La relevancia de estos otros metabolitos en la respuesta germinativa de estas semillas no está clara, aunque algunos de ellos mostraron patrones que cambiaron significativamente durante la incubación (por lo que no parecen estar en un “compartimento estanco”, como parece ocurrir con GA₁ y GA₃). Por ejemplo, GA₂₀ aumentó hacia el final de la incubación en RedlandB2; por otro lado, el nivel de GA₁₇, (un catabolito inactivo producto de oxidaciones sucesivas por la GA₂₀oxidasa), cayó abruptamente durante las primeras 24h en IS9530. Los metabolitos de la vía no-hidroxilativa (que produce GA₄ y GA₇) fueron detectados solamente luego de la extracción ácida. No se detectó GA₇ en las muestras analizadas, sí GA₄, aunque los niveles entre genotipos no fueron diferentes durante las primeras 72h de incubación, y a las 96h fueron mayores en IS9530, lo cual no se corresponde con la respuesta germinativa. No se detectaron otros catabolitos (como por ejemplo, GA₈, 29 y 34) esperados como resultado de la inactivación de GA activas por enzimas GA 2-oxidadas.

Nutbeam y Briggs (1982) reportaron la formación de complejos entre GA endógenas y posibles compuestos fenólicos en semillas de cebada embebidas, y mostraron la formación de complejos similares *in vitro* al combinar GA₃ y una mezcla de compuestos fenólicos. Esta asociación se revirtió en medio ácido, aunque los autores no especifican el pH. Estudios previos mostraron que el contenido de compuestos fenólicos no varía durante la germinación de semillas de cebada, por lo cual el contenido de fenoles durante la incubación no parece ser una vía de regulación de los niveles de GA en esta especie. Adicionalmente, el agregado de una mezcla de compuestos fenólicos (ácidos ferúlico, p-cumárico y vainílico) inhibió la promoción de la germinación por GA₃ exógeno en semillas dormidas de sorgo, con mayor eficiencia que cada uno de estos compuestos individualmente (Rasmussen and Einhelling, 1979, en Nutbeam y Briggs, 1982). El ácido tánico mostró ser uno de los inhibidores más potentes de la respuesta a GA₃ (Corcoran y Geissman, 1972, en Nutbeam y Briggs, 1982). Estos autores concluyen que la formación de complejos entre GA y compuestos fenólicos, y posibles proteínas, podrían cumplir un papel relevante en la regulación de los niveles de GA, y la estabilidad de estos complejos depende del método de extracción utilizado; esto podría afectar las conclusiones con respecto a los niveles de GA disponibles en condiciones fisiológicas. Los resultados presentados en la Fig.2.2 muestran que la variación del pH durante la extracción en MeOH 80% afecta significativamente los valores de GA obtenidos, no solo cuantitativamente, sino que los patrones obtenidos a pH ácido ó neutro son diferentes entre sí, y solo a pH neutro muestran una asociación con la germinación. La solubilidad de las GA en agua es baja, y por eso se usa MeOH

como solvente durante la extracción en la gran mayoría de los protocolos publicados. Adicionalmente, la solubilidad de las GA en un solvente poco polar como el MeOH podría aumentar cuando están en su forma protonada (lo que se favorece a pH ácido), pero los protocolos citados en la bibliografía y comúnmente usados para la extracción de GA a partir de muestras vegetales no incluyen la acidificación de la fracción acuosa del solvente de extracción MeOH 80% (Ogawa, 2003; Yamauchi, 2004; Dewar *et al.*, 1998).

Una forma posible de poner a prueba la existencia de dos fracciones de GA como las descritas, sería incubando semillas en agua (control) ó en presencia de inhibidores de la síntesis de GA (por ej., paclobutrazol y prohexadiona), y medir el contenido de GA luego de la extracción a pH ácido y neutro. La inhibición de la síntesis *de novo* de GA no debería afectar de manera significativa los niveles de GA obtenidos a pH ácido (*), mientras que sí afectaría los valores de GA luego de la extracción a pH neutro, ya que, según la hipótesis, en estas condiciones se extraen solamente las GA libres, producto de la síntesis *de novo*.

(*) a pH 3.0 se extraerían todas las GA, y esto incluye las que estarían “acomplejadas” más las que estarían libres en el citoplasma (y que se extraen también a pH neutro). Sin embargo, estas últimas constituyen una fracción muy pequeña de las GA totales (comparar los niveles de GA₁ y GA₃ en ambos pH, Fig.2.2).

Fig. 2.2: Niveles de diferentes giberelinas de la vía hidroxilativa temprana (precursores: GA₁₉ y GA₂₀, GA activas: GA₃ y GA₁, catabolitos inactivos: GA₁₇) en el embrión durante la incubación en agua a 25°C de cariopses de sorgo inmaduros (30 DPA) (campaña 2004), para dos líneas: IS9530 y RedlandB2. Extracción en MeOH 80%, fracción acuosa a pH ácido (3.0) ó a pH=7 (a pH neutro solamente se detectaron GA₁ y GA₃; los demás compuestos solo se detectaron después de la extracción a pH 3.0). Se indica en cada paso la enzima involucrada. No se detectaron los catabolitos GA₂₉ y GA₈. A la derecha se muestran las curvas de germinación de los cariopses.

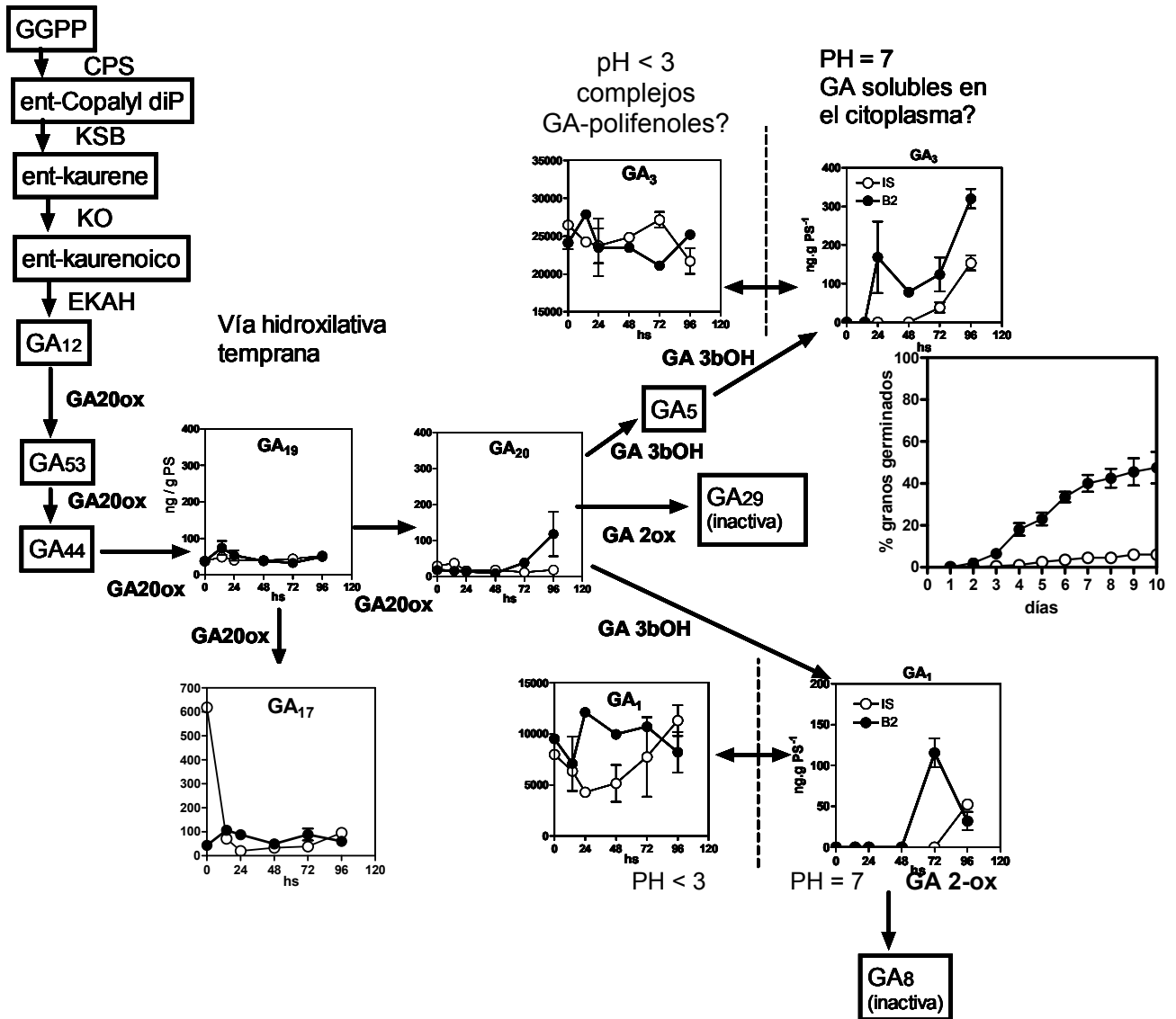
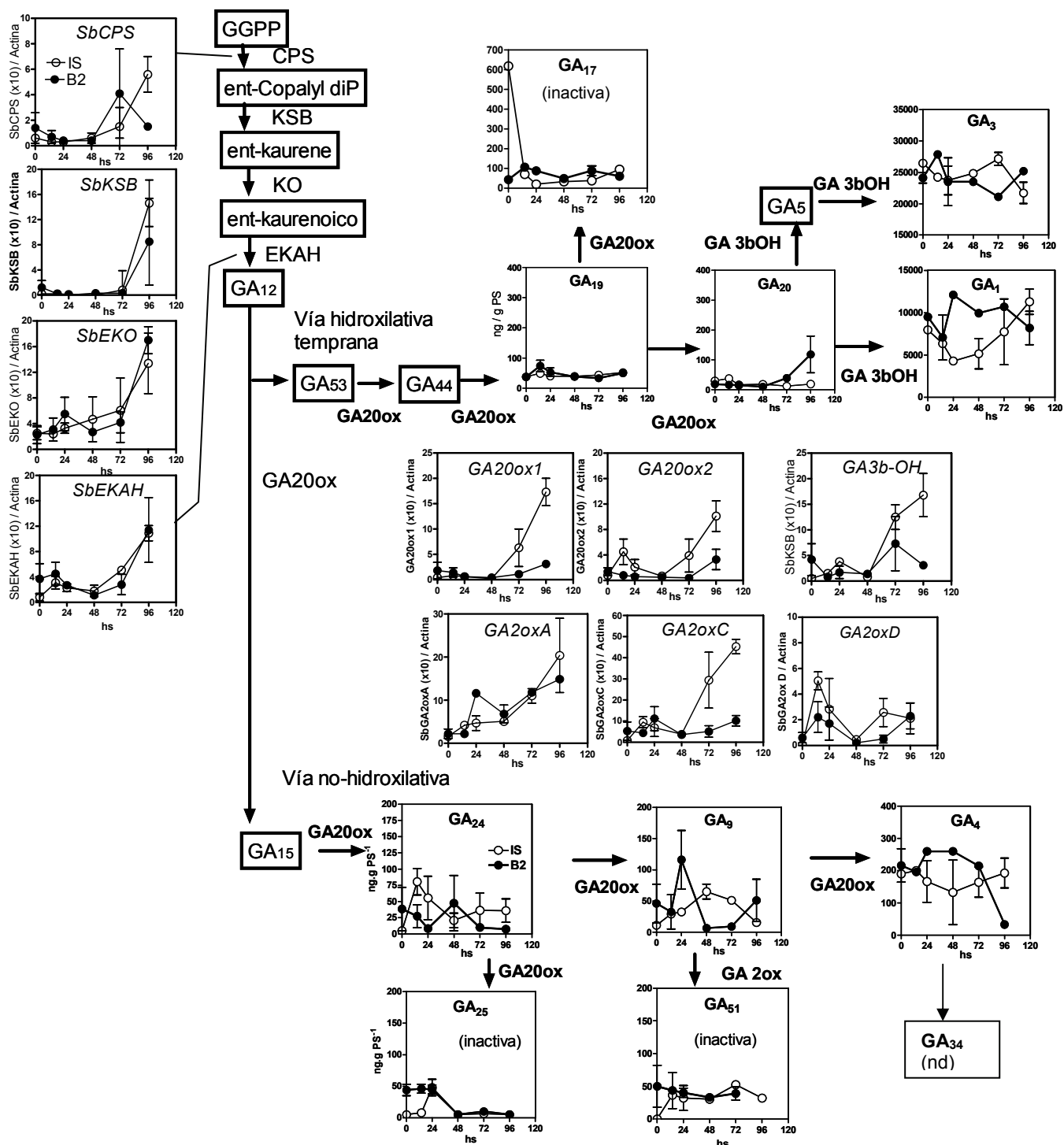


Fig. 2.3: Evolución de los niveles embrionarios de GA (en ng / g de peso seco) y de expresión (relativa a actina) de genes del metabolismo de GA, durante la incubación de cariopses de sorgo a 25°C (camaña 2004) para dos líneas: IS9530 (círculos blancos) y RedlandB2 (círculos negros). La extracción de GA se hizo en MeOH 80%, fracción acuosa a pH ácido (3.0) ó a pH neutro (7.0). A pH neutro solamente se detectaron GA₁ y GA₃; los demás compuestos solo se detectaron después de la extracción ácida. No se detectaron los catabolitos GA₂₉ y GA₈. Al cabo de diferentes tiempos de incubación de los cariopses enteros se disectaron embriones para la posterior extracción de hormonas y RNA.



Capítulo 2. Sección B: Expresión de los genes de metabolismo de GA en semillas embebidas de IS9530 y RedlandB2.

En la sección anterior se mostraron los resultados de las mediciones de GA y se planteó una hipótesis para explicar las diferencias encontradas según la extracción a pH ácido o neutro. En esta sección se integran a estos resultados los datos de expresión de genes del metabolismo de las GA, obtenidos para las muestras del mismo experimento donde se midieron las hormonas. Estos resultados están asociados con el objetivo específico c) que consiste en “Identificar genes que codifican para enzimas del metabolismo de giberelinas cuya expresión se corresponda con un rol regulatorio de los diferentes niveles de GA activas durante la incubación de semillas de sorgo con alta y baja dormición.”

Resultados. Capítulo 2. B.

Se analizó la expresión de genes (luego de identificar las secuencias de los ortólogos para sorgo granífero) que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de GAs durante la incubación de cariopses en agua. Se midió la expresión de estos genes en cariopses cosechados en dos momentos del desarrollo: cariopses inmaduros (30 DPA) y cariopses maduros (42 DPA). A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para los genes del metabolismo de GA (agrupados según la etapa en la que participan) para los cariopses inmaduros y maduros:

i) Genes de la etapa temprana de la biosíntesis de GA en cariopses inmaduros (30DPA): Se midió la expresión de cada uno de los genes que codifican para las enzimas Copalil sintetasa, Kaurene sintetasa B, ent-kaurene oxidasa y ent-kaurenoico hidroxilasa. A partir de la búsqueda de secuencias ortólogas en PlantGDB se identificó una secuencia única para cada gen; en otras especies como arroz y *Arabidopsis* estos genes cuentan con una copia única (Sakamoto *et al.*, 2004). El análisis de expresión para cada uno de ellos durante la incubación de los cariopses de 30 DPA no mostró una expresión diferencial entre genotipos (**Fig.2.3**); su expresión tendió a aumentar de manera similar hacia las 96h, aunque las curvas de germinación comenzaron a divergir a partir de este momento. La producción diferencial de GA observada luego de la extracción a pH=7 (**Fig.2.2**) durante la incubación en estas mismas muestras no se asoció con la expresión de estos genes (**Fig. 2.3**). La medición de estos genes en muestras de un nuevo experimento con cariopses de 30DPA, incubados a 20°C (campana 2006) reveló un patrón diferente al anterior; en este caso la expresión de *SbCPS*, *SbKSB*, *SbEKO* y *SbEKAH* tendió a aumentar desde tiempos más tempranos en IS9530, y fue transitoriamente mayor que en RedlandB2, donde estos genes no se indujeron. La mayor expresión de estos genes en IS9530 coincidió temporalmente (24 - 72 h) con una mayor expresión en los genes de la etapa siguiente, que se describe a continuación.

ii) Genes de la etapa tardía de la biosíntesis de GA (dioxigenasas solubles): Se midió la expresión de dos genes que codifican para GA 20-oxidasas, denominados *SbGA20-ox1* y *SbGA20-ox2*; la primera fue clonada y secuenciada

parcialmente por Pérez-Flores *et al.* (2003) y la segunda se identificó en la base de datos de PlantGDB durante esta tesis. También se midió la expresión de un gen que codifica para una putativa GA-3b-hidroxilasa (se identificó una sola secuencia para este gen en sorgo, denominado *SbGA-3b-OH*).

La expresión de ambos genes *SbGA20-ox1* y *SbGA20-ox2* aumentó a partir de las 72h de incubación en cariopses de 30 DPA (**Fig. 2.3**), y este aumento fue mayor en IS9530; esto se contradice con resultados previos que mostraban una asociación positiva entre la expresión de este gen y la germinación para estos genotipos (Pérez-Flores *et al.*, 2003) en cariopses maduros. Esta mayor expresión en cariopses dormidos se confirmó en muestras de la campaña 2006 (**Fig. 2.4**). La expresión de *SbGA20ox1* y *SbGA20ox2* también fue mayor en la línea IS9530 (alta dormición) en cariopses de 42 DPA. La ocurrencia de mayores niveles de expresión de *SbGA20ox1* y *SbGA20ox2* durante la incubación de cariopses de IS9530, donde los niveles de GA1 y GA3 (**Fig.2.2**) fueron comparativamente menores a los de RedlandB2, sugiere que estos genes estarían regulados negativamente por producto (i.e., GA activas). Por lo tanto, y al contrario de lo observado en trabajos anteriores, la expresión de *SbGA20-ox1* y *SbGA20-ox2* en cariopses embebidos no está asociada con la generación de los diferentes niveles de GA observados durante la incubación de cariopses inmaduros de IS9530 y RedlandB2; por el contrario, la diferente expresión de estos genes podría ser consecuencia de los niveles endógenos de GA. De manera similar a lo observado para *SbGA20-ox1* y *SbGA20-ox2* en cariopses de 30DPA, la expresión de *SbGA-3b-OH* también aumentó más en cariopses dormidos de IS9530 con respecto a RedlandB2 (Fig. 2.5), y esto sugiere que este gen también estaría siendo regulado negativamente por producto.

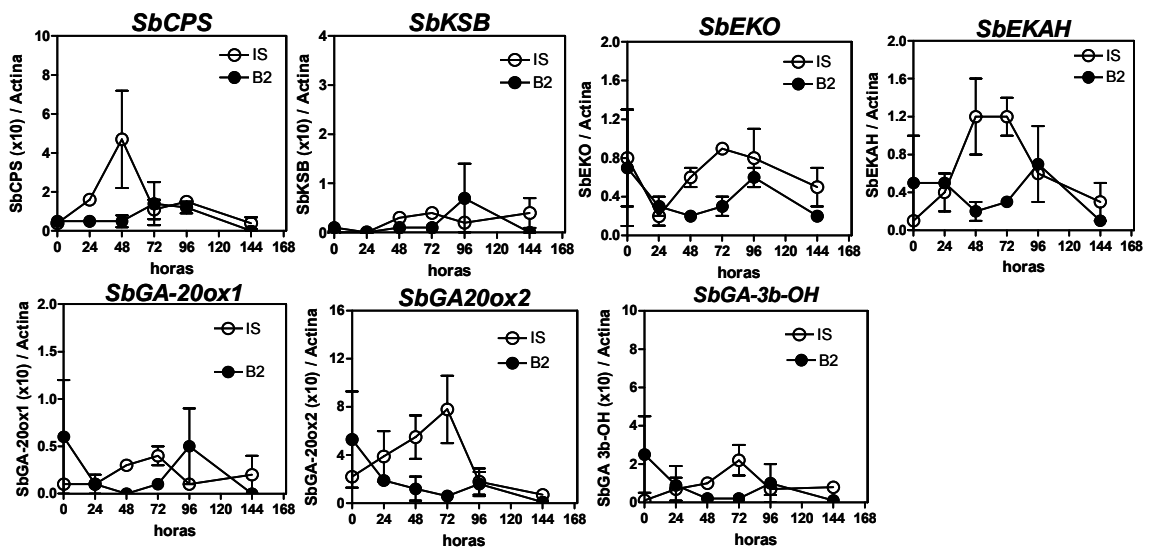
iii) Genes de la inactivación de GA (GA 2-oxidasas): Se identificaron cuatro genes que codifican para putativas GA2-oxidasas en sorgo y se denominaron *SbGA2oxA*, *SbGA2oxB*, *SbGA2oxC* y *SbGA2oxD*. Las secuencias traducidas a proteína y alineadas con proteínas ortólogas se pueden ver en el ANEXO. Se analizó la expresión de tres de ellos durante la incubación de cariopses enteros.

La expresión de *SbGA2oxC* aumentó a las 72h (**Fig.2.3**) en cariopses de IS9530 y fue unas cuatro veces mayor al nivel observado en RedlandB2, donde la expresión se mantuvo aproximadamente constante. La mayor expresión de *SbGA2-oxC* observada en cariopses embebidos de IS9530 relativa a RedlandB2 sugiere que la transcripción de este gen podría ser un punto de control en la regulación de los niveles de GA activas en cariopses con diferente nivel de dormición. La expresión de los otros dos genes (*SbGA2-oxA* y *SbGA2-oxD*) no mostró diferencias significativas en este experimento (Fig.2.3); sin embargo, en un segundo experimento con cariopses inmaduros (campaña 2006, incubación a 20°C) (**Fig.2.4.B**), se observó un marcado aumento en la expresión de *SbGA2-oxA* en IS9530 con un máximo a las 72 h, mientras que en RedlandB2, aunque se vio una inducción significativa con respecto al tiempo cero, los valores de expresión se mantuvieron siempre por debajo de los observados en IS9530. La expresión de *SbGA2-oxD* también se indujo y alcanzó niveles mayores en cariopses de IS9530, mientras que se mantuvo en un nivel basal en cariopses de RedlandB2.

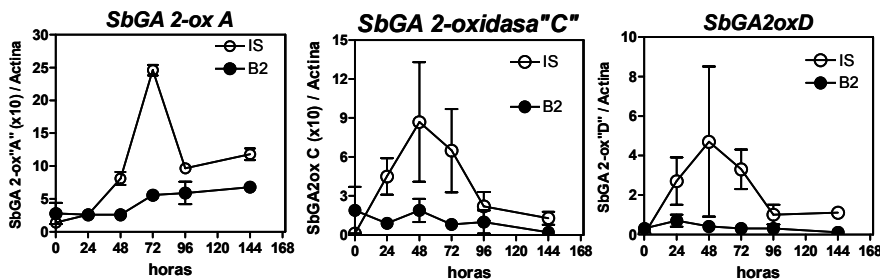
Los datos de expresión obtenidos para estos genes que codifican para enzimas de inactivación de GA putativas sugieren que los niveles endógenos de

GA durante la incubación de cariopses dormidos de IS9530 estarían regulados negativamente como consecuencia de una mayor actividad de estas enzimas. Por otro lado, en cariopses de RedlandB2 (que pierden precozmente la dormición), la inducción de estos genes durante la incubación no ocurre, o es menor que en IS9530, y esto permitiría alcanzar mayores niveles de GA activas que promueven la germinación. La confirmación de esta hipótesis mediante la cuantificación de los catabolitos resultantes de la actividad de estas enzimas no se pudo lograr hasta el momento, ya que aunque se incluyeron los estándares correspondientes (GA8, GA29, catabolitos de GA1 y GA20 respectivamente) pero no se pudieron detectar estos compuestos en las muestras analizadas.

A. Genes de biosíntesis de GA



B. Genes de inactivación de GA



C. Germinación

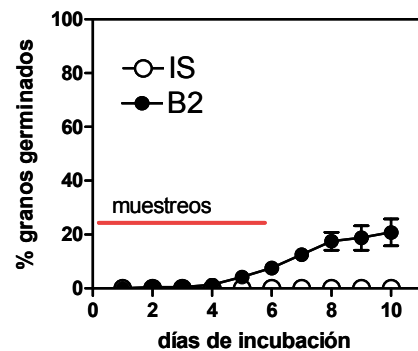
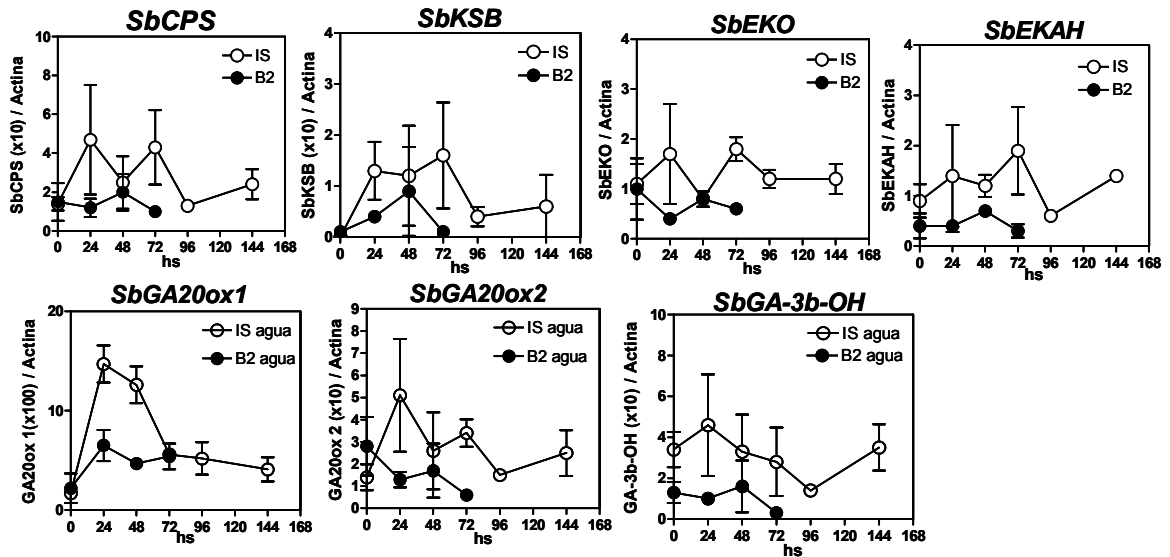


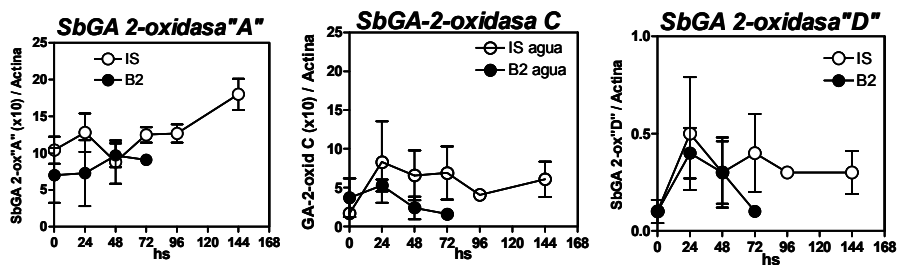
Fig.2.4: Expresión de genes de biosíntesis de GA (A) y catabolismo de GAs (B) en el embrión durante la incubación de cariopses de sorgo de **30 DPA** en agua a 20°C (serie "A" campaña 2006). En la parte (C) se muestra la evolución de la germinación. La línea horizontal destaca el período muestreado para extracción de RNA y posterior análisis de expresión de genes.

Fig.2.5: Expresión de genes de biosíntesis de GA (A) e inactivación de GA (B) en el embrión durante la incubación de cariopses de sorgo de **42 DPA** en agua a 20°C. En la parte (C) se muestra la evolución de la germinación. La línea horizontal destaca el período muestreado para extracción de RNA y posterior análisis de expresión de genes. Las muestras corresponden a la serie "P" (campaña 2006).

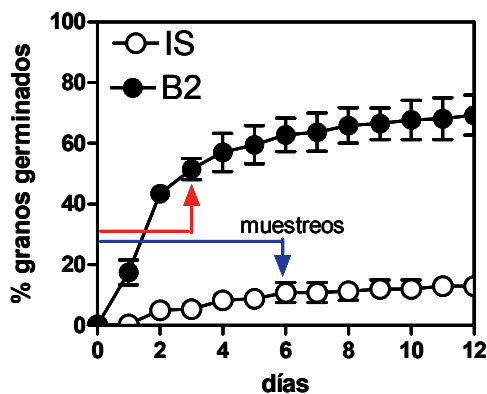
A. Genes de biosíntesis de GA



B. Genes de inactivación de GA



C. Porcentaje de germinación.



Expresión comparada de genes del metabolismo de GA en cariopses inmaduros (30DPA) y maduros (42 DPA), y su correlato con la pérdida de dormición ocurrida en este período:

Los patrones de expresión de los genes de metabolismo de GA en cariopses maduros de 42 DPA (**Fig.2.5**) que han perdido parcialmente la dormición, mostraron una tendencia similar a la observada en cariopses inmaduros: la expresión de los genes de biosíntesis de GA tendió a ser mayor en IS9530 comparando con RedlandB2. Esta diferencia solamente fue significativa para *SbGA20ox1* a las 24 y 48h, y *SbGA20ox2* a las 72h. También la expresión de dos de los genes de inactivación de GA, *SbGA2-oxA* y *SbGA2-oxC*, tendió a ser mayor en IS9530, aunque el contraste fue menor que el observado a 30DPA, y las diferencias no fueron significativas. Estos datos obtenidos en cariopses maduros de 42 DPA muestran nuevamente una correspondencia negativa entre la expresión de genes de síntesis de GA y la respuesta de germinación en ambos genotipos, la cual en cambio se explicaría por una mayor tasa de inactivación de GA inferida a partir de la expresión de los genes que codifican para GA2oxidasas.

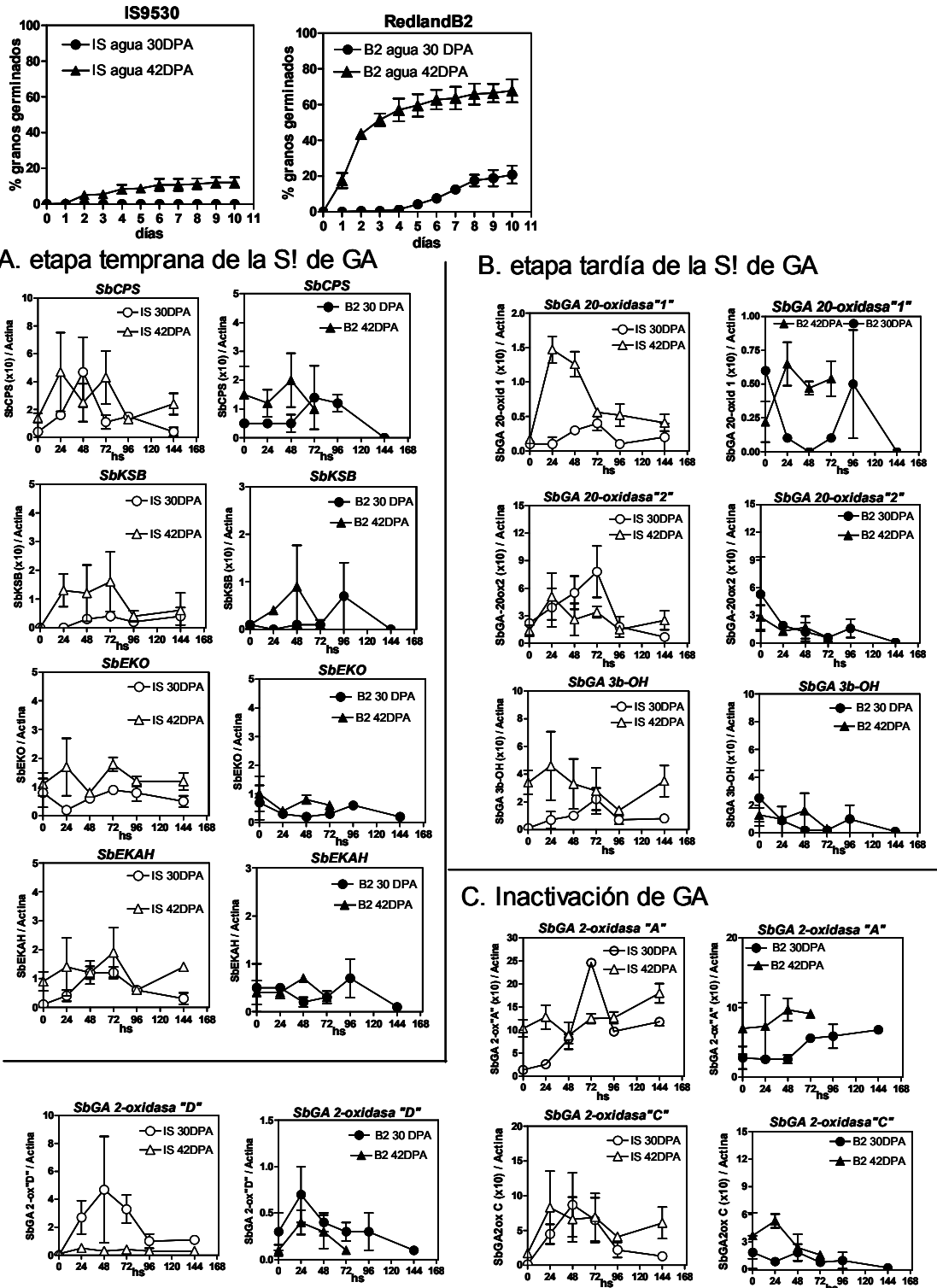
Al comparar los valores de expresión para estos genes en cariopses embebidos cosechados a los 30 DPA (antes de MF) y a los 42 DPA (después de MF), se puede destacar lo siguiente (**Fig.2.6**):

- Los valores de expresión de los genes de la etapa temprana de biosíntesis de GA (*SbCPS*, *SbKSB*, *SbEKO* y *SbEKAH*) durante la incubación tendieron a ser mayores en cariopses maduros (42 DPA) con respecto a los mismos tiempos de incubación en cariopses de 30 DPA, aunque estas diferencias no fueron significativas.
- La expresión de *SbGA20ox1* alcanzó valores significativamente mayores en cariopses de 42DPA con respecto a los observados en cariopses de 30 DPA; *SbGA20ox2* no mostró diferencias significativas entre 30 y 42 DPA, y finalmente, la expresión de *SbGA-3b-OH* fue mayor en cariopses de 42DPA pero solamente en IS9530.

Estos resultados sugieren fuertemente que la pérdida de dormición ocurrida entre los 30 y 42 DPA estaría asociada con una mayor actividad de biosíntesis de GA durante la incubación. Son necesarias, sin embargo, mediciones de contenido de GA activas en estas muestras de cariopses maduros para confirmar esta observación (las muestras se analizarán en el laboratorio durante el 2008). Entre los genes involucrados en la biosíntesis de GA, *SbGA20ox1* mostró el mayor contraste entre 30 y 42 DPA (**Fig.2.6**). La ocurrencia de mayores niveles de GA como resultado de esta mayor actividad transcripcional deberá confirmarse a través de mediciones de los niveles endógenos de GA en muestras de cariopses maduros 40-42 DPA.

En cuanto al proceso de inactivación de GA mediado por las GA 2-oxidasas A, C y D, se observaron algunas diferencias que apoyan una posible participación en la diferente dormición expresada a los 30 y 42 DPA (**Fig.2.6**). La expresión de *SbGA2oxA* se indujo cerca de 17 veces a las 72 h de incubación en cariopses inmaduros de IS9530 (30 DPA), mientras que esta inducción fue de dos veces en cariopses maduros de este genotipo (42 DPA). Sin embargo, excepto a las 72 h donde se observó el máximo de inducción, los

Fig. 2.6: Comparación de la expresión de genes del metabolismo de GA en cariopses inmaduros (30DPA) vs cariopses maduros (42 DPA), para IS9530 y RedlandB2. **A)** genes de la etapa temprana (mono-oxigenasas dependientes del CyP450) **B)** genes de la etapa final de la síntesis (dioxigenasas solubles) y **C)** genes de la inactivación de GA (también dioxigenasas solubles). Los datos son los mismos presentados en las Fig. 2.4 y 2.5.



valores absolutos de expresión para este gen tendieron a ser mayores en muestras de 42 DPA. Otro gen homólogo, *SbGA2oxD*, mostró una mayor expresión durante la incubación de cariopses inmaduros con respecto a 42 DPA, y esto podría estar asociado con una mayor actividad de catabolismo de GA en granos maduros. Finalmente, el otro gen homólogo evaluado, *SbGA2oxC*, mostró un patrón similar y valores absolutos también semejantes en IS9530 a los 30 y 42 DPA. En RedlandB2, la expresión de *SbGA2oxC* fue transitoriamente mayor a las 24 h en cariopses de 42 DPA, por lo cual la actividad transcripcional de este gen no se asoció con la pérdida de dormición entre 30 y 42 DPA en este genotipo.

Capítulo 2. Sección C: Regulación de los genes de metabolismo de GA.

Los resultados de la sección precedente, donde se muestra una relación inversa entre los niveles de GA y la expresión de algunos de los genes de biosíntesis de GA, sugieren que estos genes podrían estar regulados negativamente por producto. La existencia de un mecanismo de regulación negativa debería observarse también como una menor expresión del gen frente a una alta concentración de GA agregadas en forma exógena al medio de incubación o, alternativamente, como un aumento en la expresión del gen en presencia de un inhibidor de biosíntesis de GA como el Paclobutrazol.

Los experimentos que se muestran en esta sección apuntan a caracterizar la regulación de los genes de metabolismo de GA por producto (GA activas): evaluar una posible regulación negativa (inhibición por producto) mediante el análisis de expresión de genes en embriones durante la incubación de cariopses con niveles alterados de GA (mediante el agregado de GA ó la inhibición de la síntesis de GA con paclobutrazol).

Introducción: Antecedentes de regulación negativa de los genes del metabolismo de GA.

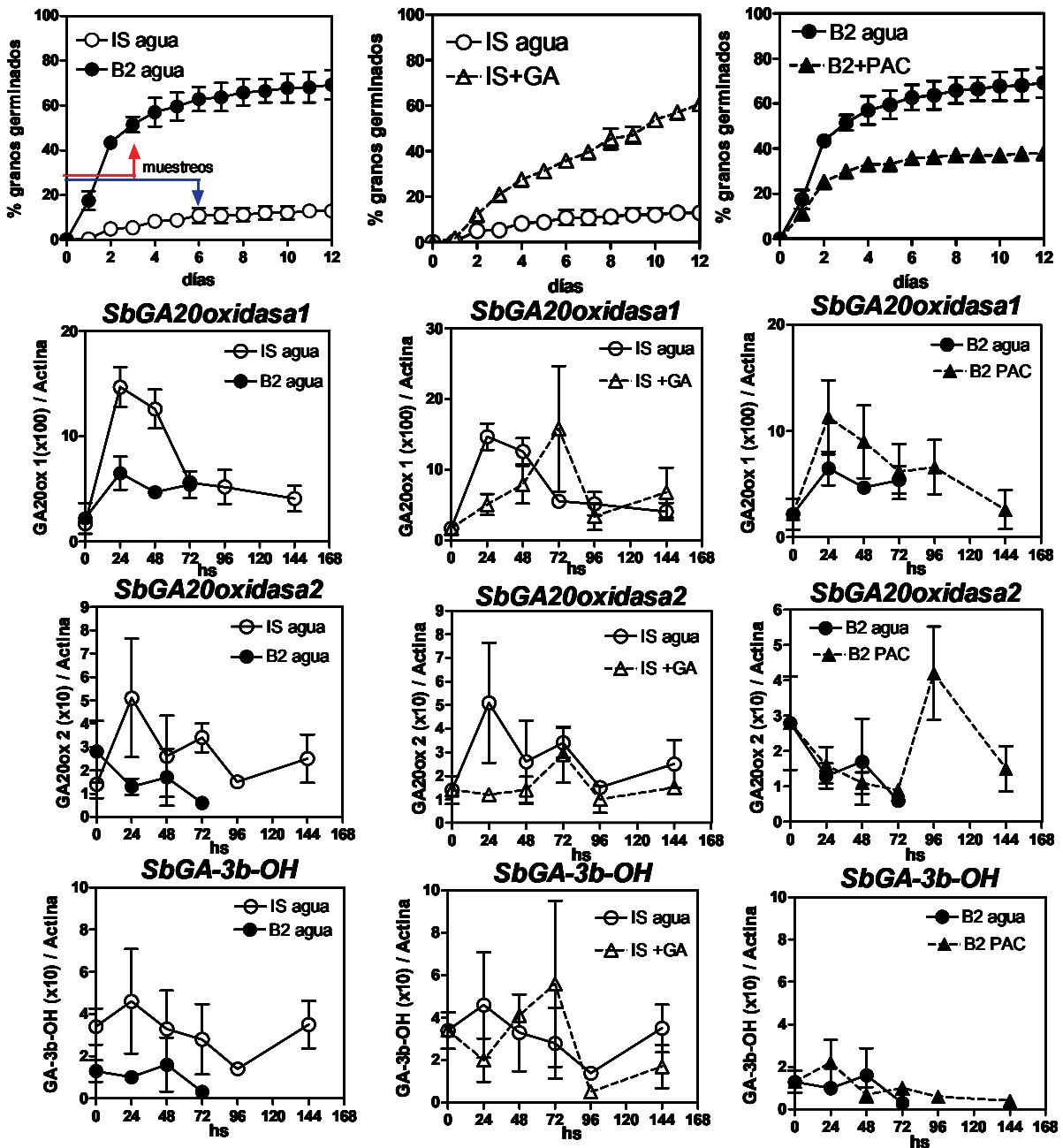
La homeostasis de las GA es un proceso clave para los múltiples procesos en los cuales estas hormonas participan, y el control negativo (por producto) de los genes de metabolismo de GA parece ser un mecanismo importante para esta homeostasis. Este mecanismo además podría formar parte de un mecanismo más amplio que abarca la acción de otras hormonas (Hedden y Phillips, 2000). Existen numerosos ejemplos de plantas mutantes con niveles endógenos reducidos de GA y que contienen niveles elevados de transcritos de GA20-oxidasas y GA-3b-hidroxilasas. Alternativamente, el tratamiento de estas plantas con GA exógenas, disminuye la expresión de estos genes. Alteraciones en los niveles de expresión de estos genes también se han observado en plantas mutantes afectadas en la señalización de las GA (Hedden y Phillips, 2000). Paralelamente, en plantas GA-deficientes de *Arabidopsis ga1-2* se ha observado una expresión aumentada para genes de GA-2-oxidasas (que inactivan GA) cuando estas plantas son tratadas con GA exógenas, indicando la existencia de un mecanismo de retro- alimentación positiva para estos genes involucrados en la inactivación de GA activas (Hedden y Phillips, 2000). Estos mecanismos de retroalimentación negativa y positiva que contribuyen a la homeostasis de las GA se han observado para los genes que codifican para las enzimas que catalizan las últimas etapas del metabolismo de

GA, las dioxigenasas solubles GA20-oxidasas y GA-3b-hidroxilasas, y las GA-2-oxidasas. Sin embargo, se han encontrado genes homólogos dentro de una misma especie que están regulados por mecanismos de retroalimentación y otros que no (por ej., durante la germinación de semillas de *GA3ox1* está regulado negativamente por GA, y *GA3ox2* no). Las enzimas involucradas en las etapas anteriores de la biosíntesis de GA no parecen estar sujetas a estos mecanismos de retroalimentación en *Arabidopsis*.

Resultados. Capítulo 2. Sección C.

Al observar en la sección previa una mayor expresión para los genes de biosíntesis de GA en cariopses dormidos de IS9530 comparando con RedlandB2 (que tiene menor dormición y mayores niveles de GA activas) se planteó una posible regulación negativa de estos genes por GA. Para evaluar esta posibilidad se alteraron los niveles de GA durante la incubación de las semillas; esto se hizo mediante el agregado de GA ó de paclobutrazol (un inhibidor de la biosíntesis de GA) al medio de incubación de las semillas. En la **Fig.2.8** se puede observar que el agregado de 100uM GA_{3+7} al medio de incubación promovió la germinación de IS9530 con respecto al control en agua, y disminuyó de manera transitoria la expresión de *SbGA20ox1* y un *SbGA20ox2* a las 24h, mientras que no afectó la expresión de *SbGA-3b-OH*. Paralelamente, las semillas de RedlandB2 se incubaron en agua ó una solución de paclobutrazol. En este caso se inhibió parcialmente la germinación en RedlandB2 (el porcentaje de germinación se redujo un 40% a las 48h con respecto al porcentaje del control en agua), pero no se observó una promoción significativa de la expresión de los genes *GA20ox1* y *GA20ox2* durante las primeras 48h en respuesta al menor contenido de GA. Sin embargo, el efecto del paclobutrazol sobre la germinación se hizo evidente desde las 24 h y en adelante, lo cual permite suponer que los niveles de GA fueron diferentes desde temprano con respecto al control en agua; los valores de expresión de *SbGA20ox1* a las 24 y 48h fueron mayores en presencia de paclobutrazol, y aunque este efecto no fue significativo, apoyan un efecto de la reducción del nivel de GA sobre la promoción de la expresión de este gen. El aumento observado posteriormente para la expresión de *SbGA20ox2* (a las 96h) en cariopses incubados en Paclobutrazol podría deberse a una caída en el contenido de GA por debajo de un valor umbral. El paclobutrazol inhibe la actividad de enzimas monooxigenasas dependientes del citocromo P450, como la ent-kaurene oxidasa, con lo cual bloquea una etapa temprana de la síntesis de GA. Sin embargo, la síntesis de GA activas puede ocurrir a partir de precursores existentes al inicio de la incubación, ya que las dioxigenasas solubles (GA20oxidasas y GA-3b-hidroxilasas) continúan activas, y esto podría ser suficiente para demorar la caída del contenido de GA por debajo de un umbral como para afectar la expresión de los genes de biosíntesis de GA en cariopses de RedlandB2. Además se podrían identificar dos subpoblaciones de semillas en estas muestras de RedlandB2, unas que requieren una mayor síntesis de GA (sensibles al paclobutrazol) y las que no necesitan de un aporte de GA (posiblemente debido a que tienen una baja sensibilidad al ABA) y germinan aún en presencia de paclobutrazol.

Fig. 2.8: Expresión de genes del metabolismo de GA durante la incubación de cariopses maduros en agua (control) ó una solución 100uM GA3 (IS9530) ó Paclobutrazol (1g/L) (RedlandB2). En la parte superior se muestran las curvas de germinación para cada tratamiento. Todas las incubaciones se hicieron a 20°C, con cariopses cosechados a los 42 DPA.



CONCLUSIONES del Capítulo 2.

Los resultados presentados en este capítulo confirman la síntesis *de novo* de GA en cariopses inmaduros de sorgo embebidos, y además muestran que esta producción de GA durante los primeros cuatro días de incubación es diferente según el nivel de dormición expresado, con lo cual se puede aceptar la primera parte de la hipótesis ii), que planteaba que “*Los cariopses con baja dormición (i.e., RedlandB2) alcanzan mayores niveles de GA activas en el embrión durante la fase II de imbibición, en comparación con embriones de cariopses con alta dormición (i.e., IS9530), en los cuales los niveles de GA se mantienen bajos y la germinación no se completa*”. El contenido embrionario de dos giberelinas activas (GA₁ y GA₃) durante la incubación de cariopses de sorgo, aumentó desde más temprano y hasta alcanzar valores significativamente mayores en RedlandB2 (consistente con el menor nivel de dormición que expresa este genotipo), en contraste con los menores niveles de estos compuestos detectados en cariopses de IS9530 (que expresan un mayor nivel de dormición). Las mediciones fueron realizadas en embriones de cariopses no germinados, durante la fase dos de imbibición.

El pH durante el proceso de extracción de las GA afectó fuertemente los resultados obtenidos, y a partir de la interpretación fisiológica de estos datos, se propone la existencia de dos fracciones de GA; una de ellas correspondería a GA que están acomplejadas con otros compuestos (posiblemente polifenoles, aunque se han reportado proteínas capaces de unirse a GA; Keith y Rappaport, 1987) y que se acumularon durante el desarrollo, mientras que otra fracción se nutre de la síntesis *de novo* a partir de la imbibición, y éstas GA estarían libres en el citoplasma. La primera fracción, extraída a pH ácido, mostró mayores niveles de GA₁ y GA₃ en cariopses inmaduros de ambos genotipos desde el tiempo cero de incubación, y tendieron a mantenerse estables durante el período muestreado. Estas GA podrían estar en el apoplasto del embrión formando parte de complejos con otros compuestos, reversibles a pH muy ácido (<3). Una hipótesis es que estas GA tendrían un rol en la hidrólisis de las reservas del endosperma luego de difundir hacia las células de la aleurona y activar los genes de alfa amilasa. Paralelamente, las GA detectadas luego de la extracción a pH neutro, aumentaron durante la incubación en la etapa previa a la germinación y se asociaron positivamente con la respuesta de germinación de ambos genotipos. Estas GA, que serían producto de la síntesis *de novo* durante la incubación, podrían estar implicadas principalmente en el crecimiento del embrión. Aunque estas evidencias pueden considerarse como preliminares, es la primera vez que se postula la existencia de dos fracciones de GA en semillas, y un rol diferente para cada fracción. Esto destaca no solo la importancia del método de extracción usado sobre los resultados obtenidos, sino que además nos obliga a pensar en otras instancias de regulación (donde intervienen variables de compartimentalización, y bioquímicas), diferentes a la de regulación transcripcional. Por ej., el pH del apoplasto disminuye por debajo de cinco durante la expansión celular en células vegetales, y esto está asociado con la actividad de expansinas e hidrolasas que actúan relajando la pared celular (Buchanan *et al.*, 2000). En estas condiciones de pH ácido, podría favorecerse la liberación de GA a partir de posibles complejos en la pared celular, y estas GA liberadas en el apoplasto pueden difundir a lo largo de la capa de aleurona y así activar la hidrólisis del endosperma. De esta manera pueden encontrarse en la

semilla grandes cantidades de GA suficientes para una rápida hidrólisis de las reservas una vez iniciada la germinación. En ausencia de dormición, las semillas de sorgo granífero germinan en un lapso de tiempo menor a 24 h, y el crecimiento post-germinativo es muy rápido, pudiendo expandirse la radícula hasta 2 cm entre el 2do y 3er día a partir de la imbibición.

Los patrones de expresión de los diferentes genes del metabolismo de las GA se corresponden en mayor medida con la fracción detectada a pH neutro, y sugieren que la regulación de la acumulación diferencial de GA activas en estos genotipos estaría regulada a nivel de la inactivación de GA, ya que se observó una fuerte inducción de los genes que codifican para enzimas que inactivan GA durante la incubación de cariopses de IS9530, mientras que esta inducción fue menor en RedlandB2. Sin embargo, no se detectaron los catabolitos esperados como resultado de la actividad de estas enzimas, y esto podría deberse a que se perdieron durante el proceso de purificación, y/o que su metabolismo ocurre muy rápidamente, y no llegan a acumularse en cantidades por encima del umbral de detección de la técnica utilizada.

La hipótesis iii) abordada en este capítulo (y que estaba sujeta a la aceptación de la hipótesis ii), planteaba que *“La menor producción de GA durante la incubación en cariopses dormidos está regulada a nivel transcripcional, a través de la inhibición de la expresión de genes que codifican para enzimas clave en la biosíntesis de GA (i.e. GA 20-oxidasa, GA 3 β -hidroxilasa y/u otras), o de la mayor expresión de genes que codifican para enzimas que inactivan GA, como las GA-2 oxidasas”*. Los resultados presentados en la sección B de este capítulo muestran que la expresión de los genes de biosíntesis de GA es diferente entre genotipos, pero esta diferencia fue contraria a la esperada; los genes que codifican para enzimas de la etapa tardía de la biosíntesis de GA (GA20-oxidasa y GA-3 β -hidroxilasa), mostraron un comportamiento opuesto con el patrón de germinación y de acumulación de GA en estos genotipos, apoyando un modelo de regulación negativa por producto para estos genes. Esto fue confirmado para los dos genes *SbGA20ox1* y *SbGA20ox2* en ensayos donde se manipularon los niveles de GA, pero no para la GA-3 β -OH. Estos resultados se contradicen con otros reportados previamente para cariopses maduros, que mostraban una mayor expresión de *SbGA20ox1* en cariopses de RedlandB2 (Pérez-Flores *et al.*, 2003); los experimentos cuyos resultados se muestran en esta tesis son coherentes con una regulación negativa de este gen y de su homólogo *SbGA20ox2*, observada también en otras especies, incluyendo *Arabidopsis*. Una mayor expresión para estos genes fue nuevamente observada en experimentos independientes realizados por otro miembro de nuestro grupo de trabajo (Guillermina Mendiondo, comunicación personal).

Por otro lado, la hipótesis iii) también hace referencia a una posible participación de genes del catabolismo de GA; los datos de expresión de genes que codifican para enzimas GA-2 oxidasas, coinciden con lo planteado por la misma. Estos genes de inactivación de GA se expresaron de manera contrastante entre genotipos, y parecen cumplir un papel clave en la regulación de los niveles endógenos de GA durante la incubación de las semillas, ya que sus patrones de expresión se asociaron con los niveles de GA activas y con el diferente nivel de dormición expresado entre genotipos. Adicionalmente, se compararon cariopses con diferente nivel de dormición como resultado del

diferente grado de desarrollo y avance del proceso de salida de la dormición. Los datos presentados muestran también diferencias en la regulación transcripcional de los genes del metabolismo de GA en cariopses embebidos con distinto tiempo de desarrollo (30 y 42 DPA) y que expresan un nivel de dormición diferente. Aunque no se pudo analizar el contenido de GA en muestras de cariopses maduros, se pudo observar en estos cariopses una mayor expresión de *SbGA20ox1* (síntesis de GA) y, a la vez, una menor inducción de *SbGA2oxA* (inactivación de GA) comparando con cariopses inmaduros del mismo genotipo. Esto sugiere que la salida de la dormición ocurrida entre 30 y 42DPA podría estar asociada con una mayor acumulación de GA a partir de la imbibición de los cariopses, y esto sería resultado de una mayor actividad de síntesis y una menor tasa de inactivación. Se espera confirmar estos resultados a partir de la medición de las muestras correspondientes a este mismo experimento con cariopses maduros.

CAPÍTULO 3

“Expresión de *SbGAMYB*, un factor de transcripción que regula la respuesta a GA en cereales, en cariopses de sorgo con distinto nivel de dormición. Evidencias de splicing alternativo.”

Resumen

*GAMYB es un factor de transcripción que interviene directamente en la inducción de genes en respuesta a las GA durante la germinación, como los genes de Alfa-amilasas y expansinas, y ha sido ampliamente estudiado en semillas de cereales como arroz, trigo y cebada. El ortólogo de sorgo para GAMYB se incluyó entre los genes candidatos como un indicador a nivel molecular para la diferente actividad de las GA esperada durante la incubación en semillas dormidas de IS9530 y RedlandB2. La transcripción de este gen en trigo además está regulada negativamente por ABA a través de PKABA, con lo cual se esperaba una mayor expresión de este gen en semillas de RedlandB2 (baja dormición) comparado con IS9530 (alta dormición). Sin embargo, la expresión de *SbGAMYB* fue mayor en cariopses dormidos de IS9530 comparando con RedlandB2, y su expresión no fue promovida por GA, sino inhibida. Estas diferencias con la literatura podrían explicarse por la presencia de al menos cinco transcriptos originados por un proceso de splicing alternativo para *SbGAMYB*. Aunque no se midieron los diferentes transcriptos individualmente, se diseñaron primers para PCR que detectaron aquellos transcriptos que exhiben la región 3' del gen completa; la proporción de estos transcriptos con respecto a transcriptos que tienen el segundo exón +/- la región 3', cambiaron en respuesta a GA y ABA en cariopses y embriones aislados, aunque se observaron resultados contradictorios, probablemente como consecuencia de estar midiendo simultáneamente más de una forma de transcripto. Estos resultados muestran que la expresión de *SbGAMYB* en semillas embebidas de sorgo está afectada por un mecanismo de splicing alternativo, y sugieren que este mecanismo estaría modulado por las hormonas ABA y GA. En base a estas observaciones y trabajos de otros autores con transcriptos modificados de *GAMYB* se hipotetiza que las diferentes formas de transcripto tendrían funciones diferentes y hasta antagónicas, y podrían cumplir un rol en la señalización de las GA durante la expresión de la dormición.*

Introducción

*GAMYB es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de genes que responden a GA durante la germinación, a través de la unión a una secuencia específica conocida como “GARE” (GA-response element), presente en la región promotora de estos genes (Gubler et al., 1995). Gómez-Cadenas et al. (2001) demostraron mediante ensayos de expresión transitoria en aleuronas de cebada que la expresión constitutiva de *HvGAMYB* imita el efecto de la aplicación de GA, y es suficiente para activar el promotor del gen que codifica para la enzima Alfa-amilasa y otros genes inducibles por GA. Estos autores también mostraron que la inducción de la expresión de *HvGAMYB* se inhibe en respuesta al ABA, y esta inhibición está mediada por la proteína-quinasa PKABA1. Por lo tanto, la expresión de *HvGAMYB* está regulada antagónicamente por GA y por ABA: se induce en respuesta a GA, y el ABA, a través de PKABA1, bloquea esta inducción. Este gen no solo resulta clave en el control de la expresión de genes de respuesta a GA, sino que además conforma un punto de interacción entre las vías de señalización de ambas hormonas. Debido a estas evidencias sobre la regulación de *GAMYB* en semillas de otras especies es que se propuso la medición de este gen en sorgo como un indicador a nivel molecular de la diferente*

acción de las GA, tal como se planteó en la segunda parte de la hipótesis ii) y cuya primera parte fue abordada en el capítulo anterior.

A partir de la secuencia proteica conocida de GAMYB en cebada y arroz se identificaron para sorgo granífero dos secuencias que, aunque no se superpusieron, presentaron muy alta identidad con dos partes diferentes de la proteína (ver Fig.A-13, pág.16 y pág. 21 del Anexo). Una de estas secuencias es un PUT contig (resultado del empalme de varios ESTs) y la otra es un GSScontig que además incluye ESTs. La primera abarca el Exón 1 del gen, y la segunda secuencia abarca los Exones 2 y 3, y parte de la región 3' no codificante. Aunque estas dos secuencias no se superponen, podrían formar parte del mismo gen y abarcar la proteína completa. No se encontraron en la base de datos de PlantGDB otras secuencias parciales que tuvieran una identidad aceptable con GAMYB, lo cual sugiere que habría un único gen para GAMYB en sorgo. Aunque en *Arabidopsis* se encontraron tres genes homólogos (AtMYB33, AtMYB101 y AtMYB65; Gocal *et al.*, 2001) en especies de cereales (arroz, cebada) se ha encontrado un solo homólogo para GAMYB.

RESULTADOS

La expresión de SbGAMYB no se correlaciona con la germinación ni con los niveles de giberelinas

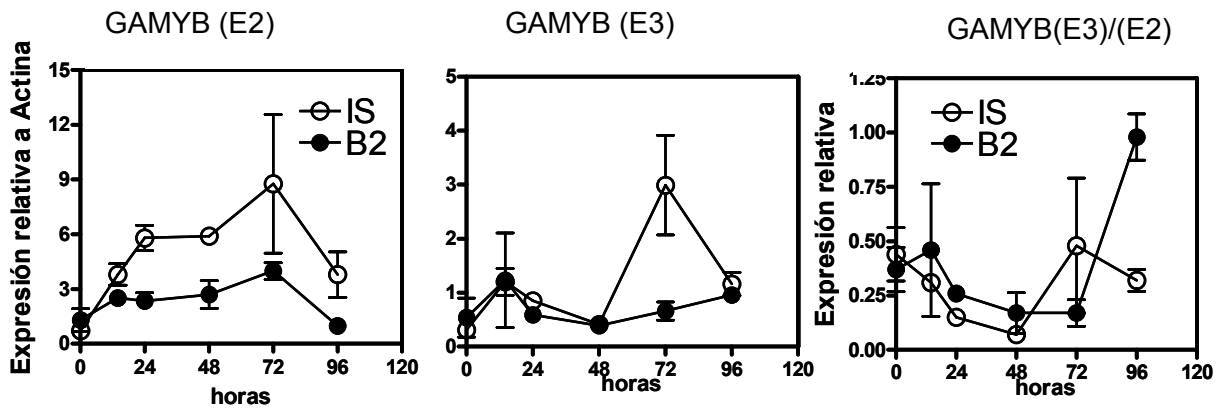
La hipótesis ii) postulaba que *“Los cariopses con baja dormición (i.e., RedlandB2) alcanzan mayores niveles de GA activas en el embrión durante la fase II de imbibición, en comparación con embriones de cariopses con alta dormición (i.e., IS9530), en los cuales los niveles de GA se mantienen bajos y la germinación no se completa. Esta diferente acción de las GA se reflejará también en una diferente expresión del gen que codifica para GAMYB, un factor de transcripción inducible por GA y necesario para la producción de alfa-amilasas durante la germinación”*.

La primera parte esta hipótesis se puso a prueba y se aceptó a partir de los resultados presentados en la sección A del capítulo anterior. La cuantificación de *SbGAMYB* se planteó inicialmente como un indicador a nivel molecular de la acción de las GA en nuestro sistema de estudio. Sin embargo, al cuantificar la expresión de *SbGAMYB* en el embrión durante la incubación de cariopses de 30 DPA, al contrario de lo esperado, se observó una fuerte inducción de su expresión en IS9530 (alta dormición), y alcanzó niveles significativamente mayores en este genotipo con respecto a RedlandB2 (**Fig.3.1.A y B**, izquierda). Como se vio en el capítulo 2, la acumulación de GA₁ y GA₃ (dos especies de GA activas) en muestras del mismo experimento fue menor en IS9530 en comparación con RedlandB2. La expresión de *SbGAMYB* fue nuevamente mayor en IS9530 con respecto a RedlandB2 en muestras de cariopses inmaduros (30DPA) de la campaña 2006 (Fig.3.1.B, izquierda). Para evaluar el efecto de las GA sobre la expresión de *SbGAMYB*, se manipuló el contenido de GA durante la incubación de cariopses de ambos genotipos mediante el agregado de una solución de GA4+7 ó de paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de GA). El agregado de GA4+7 100uM al medio de incubación promovió la germinación de IS9530, mientras que el agregado de paclobutrazol (1 g/L) inhibió parcialmente la germinación de RedlandB2. La expresión de *SbGAMYB* fue inhibida en respuesta a las GA en IS9530, hasta valores similares a los observados en RedlandB2. Esto

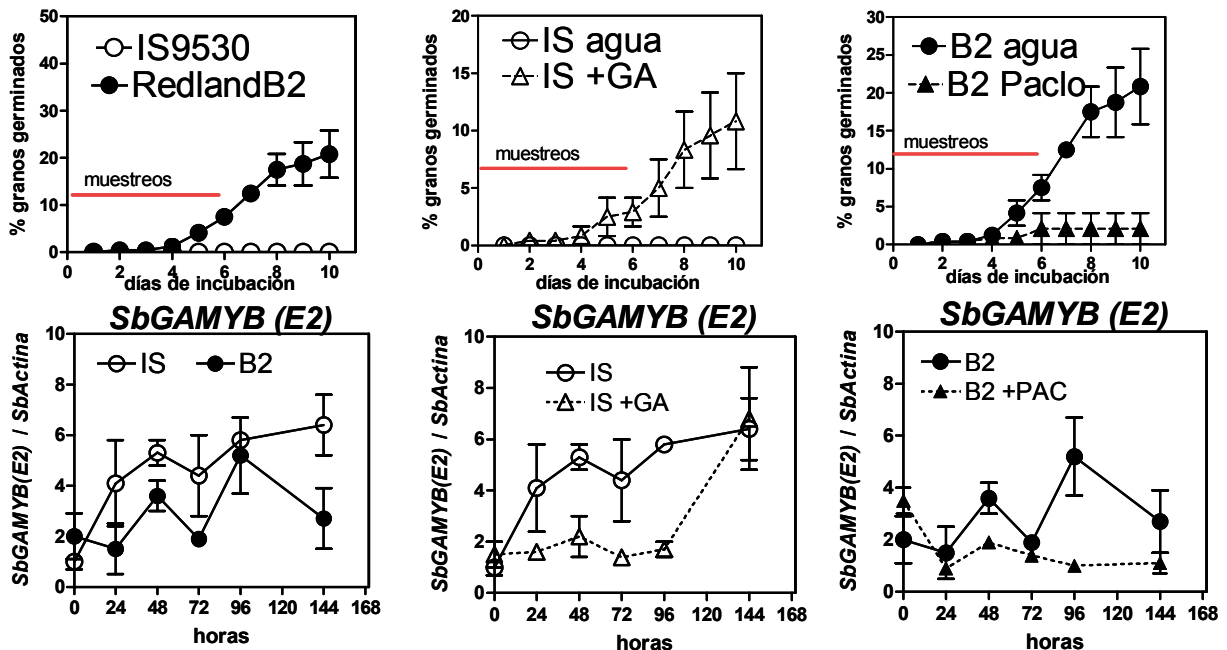
muestra nuevamente una respuesta contraria a la conocida para este gen en otras especies. Paralelamente, la expresión de *SbGAMYB* disminuyó significativamente a las 96 h en respuesta al paclobutrazol en RedlandB2, y esto se contradice con la respuesta de IS9530.

Fig.3.1: A) Expresión de *SbGAMYB* durante la incubación de cariopses inmaduros (30DPA, campaña 2004) a 25°C. Los primers para PCR *GAMYB*(E2) se ubicaron en el exón 2 y los primers *GAMYB*(E3) en la región 3' no codificante del transcrito. *GAMYB*(E3)/(E2) muestra la relación entre ambas mediciones (campaña 2004). **B)** Expresión de *SbGAMYB* con los primers (E2) durante la incubación de cariopses inmaduros (30DPA) a 20°C en agua (IS9530 y RedlandB2), ó una solución 100uM GA3+4 (IS9530) ó paclobutrazol (RedlandB2) (campaña 2006).

A. Expresión de *GAMYB* con primers ubicados en el exón2 (E2) o la región 3' no codificante del mRNA (E3).



B. Efecto de las GA sobre la expresión de *GAMYB*(E2).



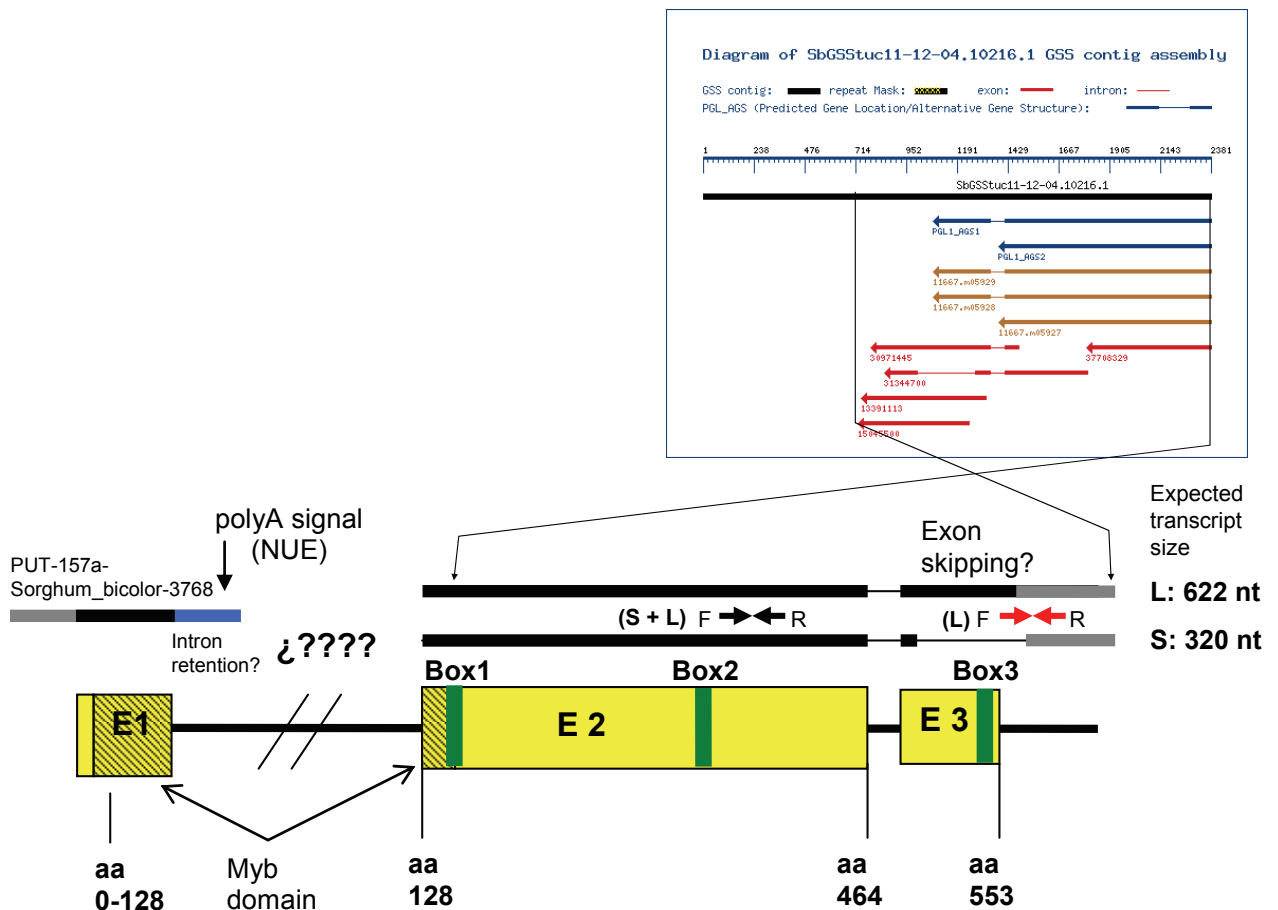
Existen transcriptos de distinto largo para *SbGAMYB*: splicing alternativo?

Durante el análisis de las secuencias identificadas en la base de datos de PlantGDB correspondientes al putativo *SbGAMYB* en sorgo, se observó la presencia de ESTs (*expressed sequence tags*) alineados con diferentes sectores de un GSS-contig que abarca gran parte del gen, incluida la región terminal. Algunos de estos ESTs abarcan los exones 2 y 3 completos deducidos a partir de la traducción del GSS-contig y del alineamiento con las secuencias de *GAMYB* en otras especies. Sin embargo, también se observó un EST que abarca el 2do exón, pero carece de la porción terminal del exón 3 y cubre parte de la región 3' no codificante (Fig.3.2). Se contempló la posibilidad de que hubiese dos especies de transcripto como consecuencia de un mecanismo de splicing alternativo, por lo cual se diseñó un nuevo par de *primers*. Los *primers* originales (a partir de ahora denominados E2) están ubicados en el exón 2, y pueden amplificar ambas especies de transcripto (ya que su sitio de pegado es común a los dos transcriptos). Los *primers* nuevos (ahora denominados E3) se ubicaron en la región 3' del gen, uno de ellos (el Fw) sobre la región 3' no codificante a 76 bases del final del exón 3, y el *primer* Forward de este par se ubicó en la porción que estaría ausente en el transcripto más corto. De esta manera, se esperaba amplificar con estos *primers* solamente el transcripto más largo (denominado "L", y que codificaría para la proteína completa). El uso combinado de los *primers* distales de este par (El *Forward* de los *primers* originales E2, y el *Reverse* del par E3) debería resultar en la obtención de dos productos de PCR de distinto tamaño: uno más largo, de $694-72= 622$ nt (denominado "L") y otro más corto, de $694-72-302= 320$ nt ("S", *short*). El gen tiene un intrón de 72 nt, ausente en los ESTs, lo cual sugiere que es eliminado en ambos transcriptos; en el transcripto más corto, "S", se eliminó además un sector de 302 nt del 3er y último exón.

Al usar de manera combinada los *primers* distales de ambos pares se amplificaron hasta seis productos de distinto tamaño. Al correr estos productos en un gel de agarosa (Fig. 3.3.A), se observaron 5 bandas, de las cuales la segunda (señalada como "B") tiene un tamaño cercano al esperado para el transcripto "L", y la banda señalada como "C" podría corresponder al transcripto más corto, "C". Aparecen además otras 3 bandas (denominadas A, D y E) cuyo tamaño varía entre 700 y 150 nt aproximadamente. Al reamplificar estos productos de PCR (con el objetivo de purificar y secuenciar los fragmentos) se detectó una sexta banda de menor tamaño (Fig.3.3.B). La presencia de varias especies de mRNA para *SbGAMYB* sugiere que este gen está sujeto a un mecanismo de splicing alternativo. El tamaño del producto "A" coincide con el esperado (694 nt) para un transcripto en el cual se ha retenido el intrón de 72 nt, ubicado entre los exones 2 y 3. Los productos de menor tamaño (D, E y F), serían casos de eliminación parcial o total de exones. La secuenciación de la banda B demostró que esta secuencia es idéntica a la esperada para la amplificación del transcripto "L" (donde se eliminó el intrón de 72 nt).

Aunque no se puede inferir aún cuál es la relevancia fisiológica de estos diferentes transcriptos, teniendo en cuenta las secuencias de las proteínas generadas a partir de la traducción teórica de los transcriptos "L" y "S" (representados por los ESTs encontrados), es posible hipotetizar que la actividad de *GAMYB* estaría regulada por la presencia de al menos dos formas de la

Fig. 3.2: Estructura del gen *SbGAMYB*: en el recuadro superior se muestran esquemáticamente las secuencias del GSS contig *SbGSStuc11-12-04.10216.1* e EST's alineados, y proteínas homólogas (esquema extraído de PlantGDB). Más abajo, posible estructura del *SbGAMYB*, basada en las secuencias del esquema anterior y el alineamiento con *GAMYB* de otras especies. Se indican posibles intrones (línea negra) y exones (bloques amarillos), y dos transcritos posibles por splicing alternativo a partir de alineamientos de ESTs con secuencias de genómico (GSS). El segmento azul se transcribe (aparece en el mRNA) pero no es codificante. Las flechas opuestas muestran la ubicación aproximada de los *primers* para PCR: el par ubicado en el exón 2 (negro), no discrimina entre transcritos; el par ubicado en la región 3' del mRNA (rojo) solamente amplifica los transcritos que incluyen el exón 3 completo; el transcripto más largo, denominado (L) sería amplificado por este par de primers, mientras que el transcripto que carece del extremo terminal del exón 3, no. El tamaño esperado de los fragmentos obtenidos por PCR con los *primers* distales de ambos pares (*Forward* de los *primers* originales "E2", y *Reverse* del par "E3") es de $694-72= 622$ nt (fragmento "L") y otro más corto "S" de $694-72-302 = 320$ nt (el gen tiene un intrón de 72 nt, que es eliminado en ambos transcritos; en este transcripto más corto, "S", se eliminó un sector de 302 nt del exón 3).



proteína, una completa y otra truncada; esta última carecería del extremo C-terminal. A partir del análisis de la secuencia traducida del EST mas corto, se puede ver que esta forma “truncada” de la proteína carece de un dominio de transactivación (BOX3, que está altamente conservado entre ortólogos de GAMYB). Gómez-Cadenas *et al.* (2001) demostraron que una versión artificial “truncada” de GAMYB (al reemplazar el codón Asn-159 por un codón STOP) no solo no es funcional para la inducción de *Alfa-amilasa* en ensayos de expresión transiente en aleuronas de cebada sino que además bloquea la inducción de alfa-amilasa por GA cuando se expresan simultáneamente la proteína truncada y la forma endógena de GAMYB. La versión truncada usada por estos autores en sus experimentos conservaba el dominio R2R3 (MYB) de unión al ADN pero carecía de los dominios de transactivación (Box2 y Box3). Paralelamente, Washio (2003) demostró que GAMYB de arroz interactúa físicamente con una proteína DOF en la inducción de la transcripción de genes que responden a GA a través de la unión a los elementos “GARE” y “pyrimidine box” respectivamente, y que se hallan contiguos en los promotores de estos genes; la interacción entre estas dos proteínas solo ocurre cuando GAMYB está completa, y deleciones de la región C-t inhiben esta interacción en ensayos de doble híbrido.

Esto sugiere que en sorgo granífero la regulación de la actividad de GAMYB podría estar dada por la proporción en que se encuentran diferentes especies de transcripto. El transcripto “L” (correspondiente a la banda “B” en la Fig.3.3) codifica para la proteína “completa”, e intervendría positivamente en la transactivación de genes promovida por GA a través de la unión a la secuencia específica “GARE” y la interacción con otros factores, mientras que una forma incompleta que carece de la región terminal podría tener una función antagónica; una forma más corta que conserva el dominio de unión al ADN ubicado en el extremo N-t podría competir con la forma “normal” por el sitio de unión “GARE”, pero sin producir la transactivación del gen. Adicionalmente, la variante de transcripto de mayor tamaño, correspondiente a la banda “A” (Fig.3.3) y que estaría originada por la retención de un intrón, podría tener un rol fisiológico relevante. La presencia, tamaño y posición de este intrón dentro del gen *GAMYB* son un rasgo conservado en *Arabidopsis* y cebada, y esto también se extiende al gen *GAMYB* de sorgo.

Como se describiera más arriba, los niveles de expresión de *SbGAMYB* usando el par de *primers* E2 (que amplifica los transcriptos “L” y “S”) se indujo durante la incubación y alcanzó valores significativamente mayores en IS9530 (**Fig.3.1.A** izquierda) comparando con RedlandB2; sin embargo, la expresión fue similar entre genotipos cuando se usaron los *primers* E3 (que amplifican el transcripto “L” pero no el “S”) (**Fig.3.1.A** centro). Los patrones de expresión obtenidos con ambos pares de primers fueron diferentes, y esto se refleja al graficar la relación entre ambas mediciones (**Fig.3.1.A** derecha). Esto sugiere que las cantidades relativas de los distintos transcriptos de *GAMYB* están reguladas de manera diferente en IS9530 y RedlandB2.

A partir de estos resultados se planteó la posibilidad de que las proporciones entre ambas formas de transcriptos de *GAMYB* se vieran afectadas por variaciones en los niveles de ABA ó de GA. Para poner a prueba esta hipótesis se evaluó la expresión de *SbGAMYB* con ambos pares de *primers*, E3 y E2, en embriones aislados e incubados en agua ó 50uM ABA; además de comparar cada patrón relativo a la expresión de *SbActina*, se calculó la expresión

de *SbGAMYB* con los *primers* GAMYB(E3) relativa a la expresión con GAMYB(E2). En la **Fig.3.4.A** se puede observar que el ABA indujo significativamente la expresión de los transcritos detectados con ambos pares de *primers* de manera similar y en ambos genotipos. Aunque la incubación en ABA inhibió por completo la germinación de los embriones de IS9530, la proporción entre ambas formas de transcripto fue ligeramente mayor durante las primeras 12h de incubación en ABA en embriones de IS9530, pero este efecto del ABA no se detectó en RedlandB2. En la **Fig.3.4.B** se muestran los productos de PCR obtenidos con los *primers* distales GAMYB(E2)Fw-(E3)Rev, usando como templado cDNA de embriones incubados en agua ó ABA, para IS9530 ó RedlandB2 (se hizo un pool con muestras incubadas entre 2 y 16h). No se detectó ningún producto para las muestras de embriones en agua (después de 40 ciclos de PCR), y solamente dos productos en las muestras de ambos genotipos incubados en ABA. La ausencia de producto en las muestras de embriones en agua se debería a la ausencia de transcritos que contengan simultáneamente el exón 2 y la región 3' no codificante del gen. Esto apoya la existencia de transcritos diferentes que son amplificados por un mismo par de primers, y que la presencia de distintas formas de transcripto está influenciada por el ABA. En este caso el ABA promovió las formas más largas detectadas por estos primers, coherentes con las bandas "A" y "B" de la Fig.3.3.

Cambios en la proporción de transcritos de SbGAMYB en respuesta a cambios en los niveles de GA:

Para evaluar un posible efecto de las GA sobre la expresión y los niveles relativos de los diferentes transcritos de *SbGAMYB* detectados por los *primers* GAMYB(E3) y GAMYB(E2), se midió su expresión en embriones extraídos a diferentes tiempos durante la incubación de cariopses maduros de 42 DPA (**Fig.3.5**). Los niveles de cada transcripto, así como la proporción relativa entre transcritos (E3 / E2), no fueron significativamente diferentes entre ambos genotipos durante las primeras 48 h de incubación en agua, aunque al cabo de ese tiempo la diferencia en germinación fue de casi 40%. Por otro lado, el agregado de GA resultó en una inducción significativa de la expresión de *SbGAMYB* medida con los *primers* GAMYB(E2) a las 48 h (Fig. 3.5) pero no alteró la expresión de los transcritos más largos detectados por el par GAMYB(E3), y esto se reflejó en una caída transitoria de la proporción de transcritos largos "L" con respecto al total "L+S" a las 48h causada por las GA. Por el contrario, la reducción del contenido de GA mediante el agregado de Paclobutrazol al medio de incubación de cariopses RedlandB2 redujo la germinación (Fig.3.5) pero promovió la expresión de *SbGAMYB* (E2) a partir de las 24h, y también la expresión de *SbGAMYB* (E3); la relación entre *SbGAMYB* (L) y (L+S) fue menor a las 48h en cariopses incubados en Paclobutrazol (donde se espera una reducción en los niveles de GA). Esto resulta contradictorio con lo observado en IS9530, donde el agregado de GA también generó una caída en la expresión *SbGAMYB* (L) relativa a (L+S). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de cambios en la expresión de GAMYB en respuesta variaciones en el contenido de GA, aunque no es posible a partir de estos resultados explicar la participación de los diferentes transcritos en las respuestas a GA; el principal problema para arribar a una explicación a partir de estos datos consiste en que los *primers* usados en este trabajo fueron diseñados teniendo en cuenta dos posibles

Fig. 3.4: A) Expresión de *SbGAMYB* con cada par de primers, (E2) y (E3), durante la incubación de embriones aislados en agua ó ABA50uM. **B)** Productos de PCR obtenidos en un pool de muestras de embriones incubados en agua ó ABA, para IS9530 y RedlandB2. Se usaron los primers distales, (E2)Fw y (E3)Rev. Se sembraron 25uL de producto de PCR (40 ciclos) por calle.

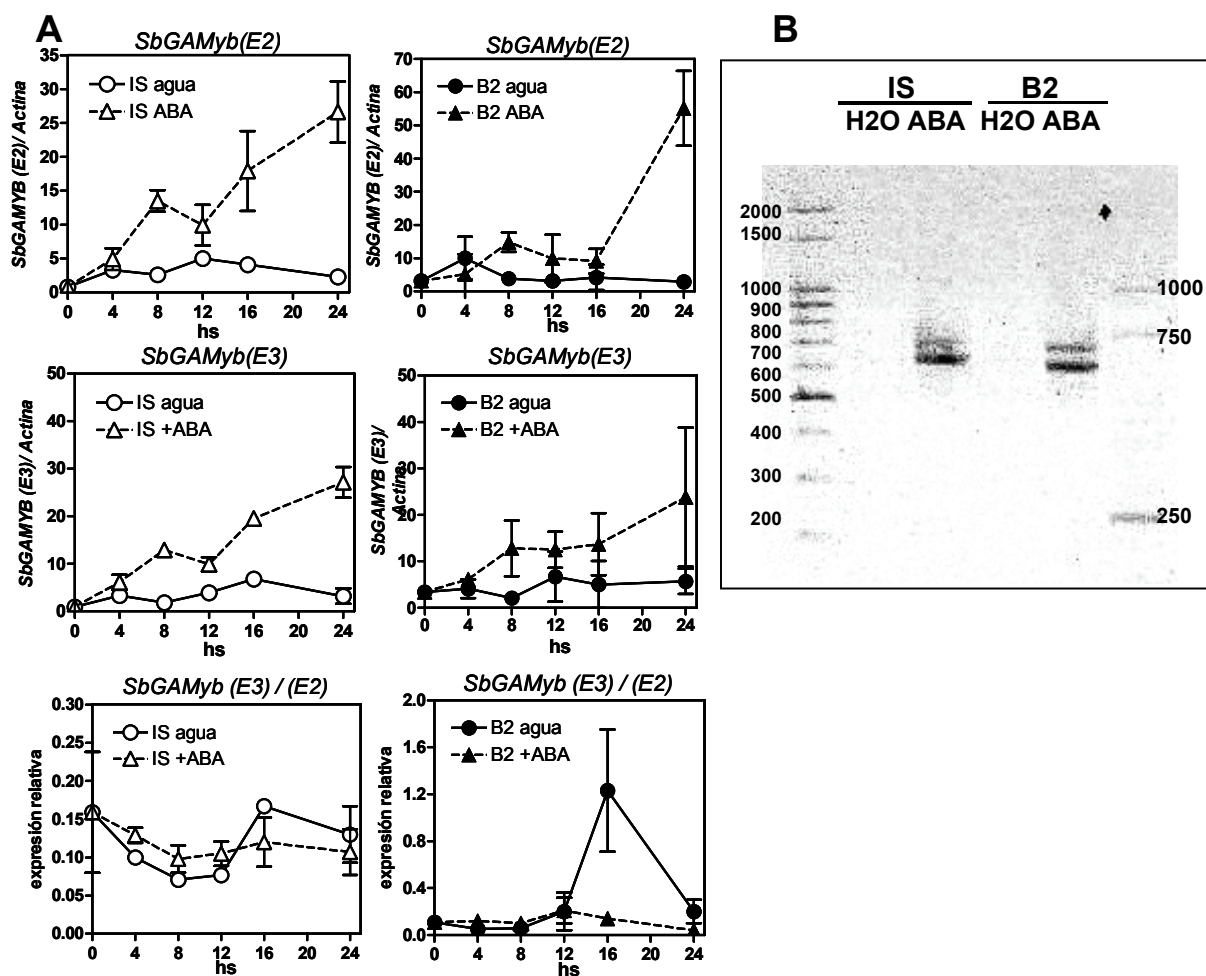
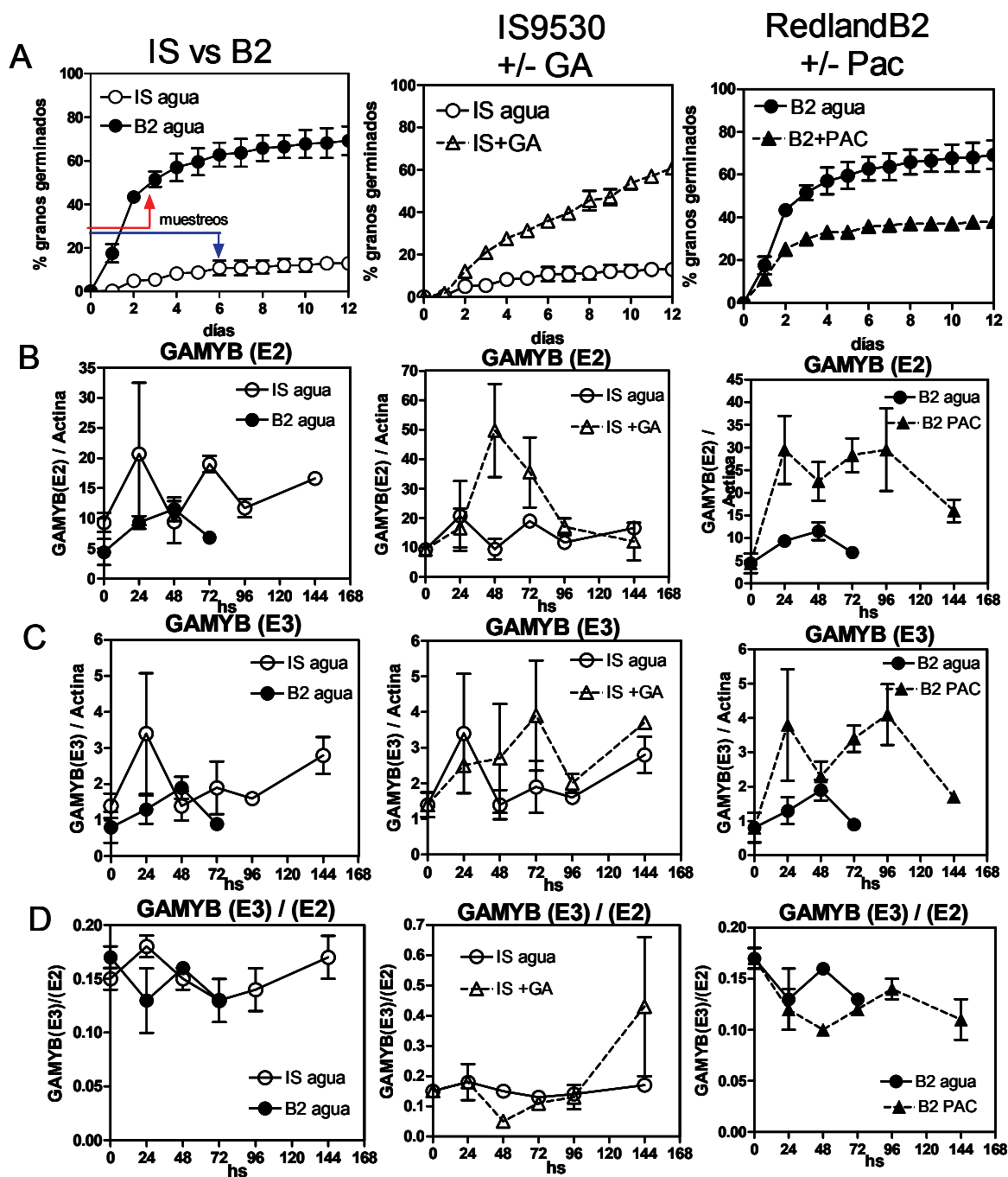


Fig.3.5: Expresión de *SbGAMYB* usando *primers*: **B)** *GAMYB*(E2), que amplifican ambos transcritos “L” y “S” (y otros posibles) que incluyen el exón 2 **C)** *GAMYB*(E3), que amplifican solamente transcritos que incluyen el exón 3 y región 3’ no codificante adyacente (no amplifican el transcrito “S”). Se incubaron cariopses enteros (cosechados a los 42 DPA) en agua ó en presencia de GA₁₊₃ 100uM (para IS9530) ó Paclobutrazol 100uM (para RedlandB2) a 20°C. Las figuras de la parte **A)** muestran las curvas de germinación. **D)** cantidades relativas de transcritos detectados con los *primers* *GAMYB*(E3) y (E2).



Estructura del gen *SbGAMYB* y comparación con genes ortólogos

La secuencia traducida de los ESTs identificados para *GAMYB* de sorgo muestra una muy alta identidad (>90%) con las proteínas *GAMYB* de arroz y cebada (ver alineamiento en el ANEXO). La comparación de la estructura genómica de *GAMYB* en *Arabidopsis*, cebada y arroz mostró que está altamente conservada. *HvGAMYB* tiene un primer intrón en la región 5' no codificante, y *AtMYB33* de *Arabidopsis* tiene dos intrones en esta misma región. Un intrón en esta región también se identificó en un GSScontig de maíz con alta identidad para *GAMYB* (ZmGSSstuc11-12-04.8062.1., datos no mostrados). Esto último no se pudo confirmar en sorgo ya que no se encontró una secuencia de genómico que abarque esta parte del gen. Se encontró sin embargo, un EST contig alineado con la primer parte de la proteína *GAMYB*, que abarcaría el exón 1 de la proteína y de manera similar a los demás genes ortólogos *GAMYB*, este primer exón codifica para los primeros 128 aa que incluyen parte del dominio R2R3 de unión al ADN, el cual se continúa en el exón 2. El intrón entre los exones 1 y 2, de tamaño variable (>900nt en cebada y maíz, menor en *Arabidopsis*) está presente en todos los homólogos de *GAMYB* conocidos, así como también está conservado un segundo intrón de unos 70 nt en la región codificante ubicado cerca del extremo terminal del gen; este último intrón corto está presente en el gen ortólogo de sorgo, pero lamentablemente no se encontró una secuencia de genómico que abarque el intrón largo entre los exones 1 y 2.

El PUT contig (resultado del empalme de varios ESTs) encontrado en PlantGDB que tiene alta identidad con el primer exón de los genes ortólogos, (codifica para los primeros 128 aa de la proteína), presenta además dos regiones no codificantes, una 5' y otra 3' (ver ANEXO). La porción 3' no codificante estaría ubicada entre los exones 1 y 2, y podría corresponder a un intrón que es retenido en el mRNA. Normalmente los intrones se eliminan durante el procesamiento del RNA y no están presentes en el mRNA. Sin embargo, aquellos mRNA que retienen algún intrón en general están restringidos al núcleo, debido a la formación de complejos de pre-splicing (*pre-splicesome complexes*) que dirigen el transcripto inmaduro hacia su procesamiento por la vía del splicing. Algunos mRNA pueden escapar a la formación de estos complejos y migrar directamente al citoplasma, como sucede con algunas isoformas de proteínas que requieren de la retención de un intrón. La ocurrencia de una u otra posibilidad depende de la presencia de secuencias específicas dentro del intrón que actúan como señales para la retención del intrón y transporte del mRNA (Dirksen *et al.*, 1995). Otros autores (Loke *et al.*, 2005) realizaron un estudio en *Arabidopsis* e identificaron tres clases de secuencias conocidas como PolyA, involucradas en la señalización de sitios de clivaje del transcripto. Una de estas secuencias conocida como NUE (*near upstream element*) se encontró en la región 3' no codificante del PUT contig que abarca la primera parte del gen (Fig.3.2). Este sitio de clivaje podría estar asociado con la retención de todo ó parte del primer intrón. Esto sugiere que la primer parte del gen *GAMYB* de sorgo podría estar afectada por un mecanismo de *splicing* alternativo, con lo cual el número de variantes de transcriptos podría ser mayor a las observadas para la parte terminal del gen. Se diseñaron *primers* ubicados en la región 5' no codificante del gen según el PUT contig con alta identidad con el exón 1. Con estos primers no se obtuvo ningún producto. Tampoco se obtuvieron productos parciales al combinar el *primer* Fw situado en el

extremo 5' no codificante del gen y cada uno de los *primers* Rev de los pares (E2) y (E3).

Como se mencionó anteriormente, no se encontró una secuencia (GSS ó EST) de sorgo que abarque simultáneamente los dos primeros exones de *GAMYB*; cuando se buscó una secuencia equivalente para maíz en PlantGDB, tampoco hubo resultados. En *HvGAMYB* de cebada, el dominio MYB también se encuentra repartido entre los dos primeros exones, separados por un intrón de 914 nt, aunque sí se ha secuenciado un RNAm que codifica para la proteína completa. Por el momento no hay evidencias que apoyen la existencia de un mecanismo de splicing alternativo para *GAMYB* en especies como arroz, cebada y trigo, por lo cual este mecanismo podría estar restringido al sorgo, y tal vez a otras especies que no han sido evaluadas aún. Por ej., muy recientemente se describió la existencia de transcritos alternativos (por retención de un intrón) para el ortólogo de *ABI5* en arroz (Zou *et al.*, 2007). Estos autores mostraron que ambas formas de proteína pueden formar dímeros y heterodímeros, y son funcionales (revierten el fenotipo de *abi5* de *Arabidopsis*), aunque varían en su capacidad de interacción con ABI3 y de unión al ADN, y podrían estar implicadas en la regulación de diferentes genes *in vivo*.

Secuenciación de los transcritos amplificados con los primers Fw en el exón 2 y Rev en la región 3' no codificante:

Con el fin de conocer la secuencia de los fragmentos amplificados y así poder identificar los diferentes eventos de splicing que les dieron origen, se procedió a la purificación de cada fragmento amplificado con los primers distales *SbGAMYB*(E2)Fw y (E3)Rev para su secuenciación. Hasta el momento se logró secuenciar con éxito únicamente el fragmento "B", de 622 nt. La secuencia obtenida para este fragmento resultó idéntica a la secuencia predicha para el transcripto denominado "L" (ver Fig.3.2). En este transcripto se eliminó el intrón ubicado entre los Exones 2 y 3, y su producto daría lugar a la forma "normal" de la proteína. La secuenciación de los otros fragmentos permitirá confirmar el origen de los transcritos.

CONCLUSIONES del Capítulo 3.

Los resultados presentados en este capítulo apoyan la existencia de mRNA alternativos para un mismo gen *SbGAMYB*, y las cantidades relativas de diferentes transcritos no solo variaron entre IS9530 y RedlandB2, sino que además cambiaron en respuesta a manipulaciones de los niveles de ABA y GA (Fig.3.1.A). Por ej., usando los *primers* distales combinados (E2)Fw-(E3)Rev, se obtuvieron resultados muy diferentes según el material usado como templado: en muestras de cariopses enteros se observaron hasta seis productos (“A” - “F”) (Fig.3.3), mientras que en embriones aislados e incubados en ABA se observaron solamente los dos productos de mayor tamaño, y no se detectó ningún producto en embriones aislados e incubados en agua (Fig.3.4.B). Esto sugiere la existencia de varias especies de mRNA para *SbGAMYB*, y aunque aún no conocemos sus funciones, la contribución de las diferentes especies de mRNA está regulada hormonalmente durante la incubación. Sin embargo, las mediciones realizadas con los *primers* GAMYB(E3) y (E2) en este trabajo posiblemente estén encubriendo proporciones variables de más de dos transcritos diferentes; por ej., el par GAMYB(E3) no discriminaría el transcrito “A” más largo (por retención de intrón) del “B”; el par GAMYB(E2) no distingue entre “A” y “B” tampoco, pero además detectaría otros transcritos más cortos.

Para llevar a cabo un estudio más detallado de los diferentes transcritos y de su implicancia en la respuesta a las GA será necesario conocer la secuencia completa de los diferentes transcritos. Esto permitirá diseñar *primers* específicos para cada uno de ellos y evaluar su expresión bajo diferentes tratamientos que afectan la germinación, y además predecir la estructura de las proteínas derivadas de cada transcrito y sus posibles funciones según los dominios que conservan. El efecto (positivo, nulo ó negativo) del producto de cada transcrito en la expresión del promotor del gen *Alfa-amilasa* podría estudiarse mediante ensayos de expresión transitoria con cada uno de ellos y un gen reportero fusionado al promotor de Alfa-amilasa.

CAPÍTULO 4

“Interacción entre la acción del ácido abscísico y el metabolismo de las giberelinas en cariopses embebidos”.

Resumen

*En este capítulo se presentan los resultados en relación al objetivo específico e), que planteaba “evaluar posibles puntos de interacción entre la vía de acción del ABA y la vía metabólica de las GA”. Esto se hizo mediante la cuantificación de GA y el análisis de expresión de genes de metabolismo de GA durante la incubación de embriones en presencia o ausencia de ABA exógeno. Los resultados muestran que GA₁, GA₄ y GA₃ aumentan transitoriamente durante la incubación de embriones en agua, y que el ABA inhibe este aumento y la germinación. Paralelamente, mediciones de expresión de genes del metabolismo de GA sugieren que el bloqueo del aumento de los niveles de GA por el ABA está mediado por una mayor tasa de inactivación, y no por una inhibición de la síntesis de GA; esta afirmación se basa en que el ABA promovió fuertemente la expresión de dos genes *SbGA 2-oxidasaA* y *C*; el ABA también se asoció con una mayor expresión de dos genes de biosíntesis *SbGA20oxidasa1* y *2*, (posiblemente regulados negativamente por GA) y no pareció afectar la expresión de *GA-3b-hidroxilasa*. El análisis de elementos *cis*-regulatorios dentro de la región promotora del gen *SbGA 2-oxidasaC* mostró la presencia de elementos asociados con la regulación por ABA, presentes en otros genes que se inducen por ABA en semillas. Esto sugiere que este gen del metabolismo de las GA podría estar regulado por factores de transcripción implicados en la señalización del ABA, como *ABI5* y *VP1*, entre otros. Paralelamente, alteraciones en los niveles de GA durante la incubación de cariopses enteros, modularon la expresión de *ABI5*, *ABI4* y *Rab28*, mostrando que las vías de acción de ambas hormonas ABA y GA pueden afectarse mutuamente.*

INTRODUCCIÓN

En el primer capítulo de esta tesis se mostró que la expresión de varios genes clave involucrados en la señalización del ABA fue significativamente mayor durante la incubación de cariopses dormidos de IS9530 con respecto a RedlandB2, que pierde precozmente la dormición. Los resultados del segundo capítulo mostraron que los niveles de giberelinas activas son también diferentes entre genotipos, y se observaron mayores niveles de GA₁ y GA₃ durante la incubación de cariopses de RedlandB2. Estos dos factores contribuyen a favorecer un balance ABA/GA elevado que bloquea la germinación en cariopses dormidos de IS9530, mientras que en RedlandB2 este balance es menor y coherente con la expresión de un menor nivel de dormición.

Los efectos antagónicos de las hormonas ABA y GA sobre la germinación se conocen desde hace bastante tiempo, aunque los posibles puntos de interacción entre las vías de acción de ambas hormonas comenzaron a describirse muy recientemente. Los puntos de interacción posibles para los actores involucrados en el balance hormonal ABA/GA en el control de la germinación podrían darse en varios niveles diferentes. Estudios con microarreglos mostraron que numerosos genes regulados antagónicamente por ABA y GA contienen en su región promotora secuencias *cis*-regulatorias denominadas ABRE (“ABA response element”, reconocidas por *ABI5* y otros factores bZIP homólogos) y secuencias regulatorias específicas para factores de transcripción regulados por GA (Yamaguchi y Kamiya, 2002; Ogawa *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2004). Mediante el uso de microarreglos en *Arabidopsis*, Yazaki

et al. (2004) mostraron que ambas hormonas actúan de manera opuesta en la activación/represión de un gran conjunto de genes; al analizar los promotores de estos genes se encontraron secuencias específicas “ABRE” y “GARE” asociadas con el pegado de factores de transcripción propios de la vía de cada una de ambas hormonas. Sin embargo, no todos los genes que responden a estas dos hormonas presentan elementos regulatorios para ambas.

Otro punto de interacción conocido entre las vías de señalización de ambas hormonas es el que constituye el factor de transcripción GAMYB, responsable de la activación del gen de la alfa-amilasa y otros genes durante la germinación. La transcripción de GAMYB, como se describió en la introducción del tercer capítulo, puede ser regulada negativamente por la proteína-quinasa PKABA1 en cebada, que es un componente de la señalización del ABA. Gómez-Cadenas *et al.* (2001) mostraron que el ABA, a través de PKABA1, puede inhibir la inducción de *GAMYB* por GA; de esta manera el ABA interfiere en la inducción de la transcripción de genes alfa-amilasa y otros genes de hidrolasas y proteasas que responden a GA. Estos genes son regulados negativamente por ABA a través de la reducción de los niveles de GAMYB.

Menos concretas son las evidencias de una posible interacción entre el ABA y el metabolismo de las GA. Por ej., Curaba *et al.* (2004) observaron que en semillas de plantas de *Arabidopsis* mutantes *fus3* y *lec2* se sobreexpresa un gen de biosíntesis de GA (que codifica para una GA-3b-hidroxilasa), *GA3ox2*, y que este gen contiene en su promotor secuencias *cis*-regulatorias que son reconocidas por FUS3 (FUSCA3). FUS3 y LEC2 (LEAFY COTYLEDON2) son factores de transcripción y ambos están implicados en la organogénesis y el desarrollo temprano de la semilla en *Arabidopsis*. Aunque estos factores de transcripción no están regulados directamente por ABA, intervienen y son necesarios en procesos regulados por ABA como el desarrollo del embrión y la acumulación de sustancias de reserva durante el desarrollo temprano; los dobles mutantes *fus3-aba* (ABA deficientes) son vivíparos, mientras que los mutantes simples no lo son. Aunque no se ha demostrado una participación de *fus3* y *lec2* en la imposición y expresión de la dormición en *Arabidopsis*, es difícil separar la acción de estos genes y la señalización del ABA durante el desarrollo de la semilla. Es posible que estos FT constituyan un punto de interacción entre la acción del ABA y el metabolismo de las GA durante el desarrollo de la semilla. Posteriormente, durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*, el contenido de ABA disminuye rápidamente en las primeras horas de incubación; unas horas más tarde comienza a aumentar el contenido de GA, y esto está regulado a nivel transcripcional (Ogawa *et al.*, 2003). Sin embargo, por el momento no se ha postulado ni puesto a prueba una posible regulación de los genes del metabolismo de GA por ABA en este contexto.

Según mediciones preliminares de GA endógenas durante la incubación de embriones de sorgo en presencia de ABA, los niveles endógenos de GA podrían estar regulados negativamente por acción del ABA. Mediciones previas (Pérez-Flores *et al.*, 2003) mostraron que el ABA inhibe la expresión del gen *SbGA20oxidasas*, lo cual sugería que el ABA estaría bloqueando la síntesis de GA a través de la inhibición de este gen. Sin embargo, los resultados de esta tesis apoyan una regulación negativa de este gen por GA (y que contradice resultados previos de Pérez-Flores *et al.*, 2003) lo cual pone en duda que este gen sea un sitio regulado negativamente por ABA. En este capítulo se evalúa el posible

bloqueo de la síntesis de GA por el ABA a través de mediciones del contenido de GA activas y de la expresión de genes del metabolismo de GA durante la incubación de embriones de ambos genotipos en agua ó en ABA.

METODOLOGÍA:

Para poner a prueba la hipótesis iv) planteada al inicio de esta tesis y que postulaba una posible interferencia del ABA con la producción de GA durante la incubación de las semillas (**sección A** de este capítulo), se incubaron embriones aislados en agua ó en una solución 50uM ABA; esta concentración inhibe la germinación de los embriones de ambos genotipos mientras los cariopses exhiben un nivel de dormición apreciable, pero a medida que salen de la dormición este efecto desaparece, y esto ocurre desde más temprano en RedlandB2. Para este experimento se usaron cariopses cosechados a los 35 DPA, y los embriones fueron altamente sensibles al ABA (en ambos genotipos la germinación fue 0% al cabo de 12 días) mientras que la germinación en agua fue del 100% a las 24h. Para poner a prueba la hipótesis v) se realizó un experimento similar, y se evaluaron cambios la expresión de genes del metabolismo de GA en respuesta al ABA. Luego de aceptar las dos hipótesis (iv y v), en la **sección B** de este capítulo se analizó la región promotora del gen *SbGA2oxidasaC*, a través del uso de herramientas bioinformáticas. Finalmente, en la **sección C** de este capítulo, se evalúa una posible reciprocidad en la interacción entre el ABA y las GA, a través de la manipulación de los niveles de GA y observando posibles efectos sobre la expresión de algunos de los genes candidatos implicados en la señalización del ABA.

RESULTADOS. Capítulo 4. Sección A.

Evolución del contenido de GA y su regulación por ABA en embriones aislados

Se aislaron e incubaron embriones de cariopses de 35 DPA en agua o en una solución 50 uM ABA, y se analizó la evolución de las GA activas GA₁, GA₃ y GA₄. En la **Fig. 4.1** se muestra la evolución del contenido embrionario de GA para embriones de RedlandB2 e IS9530 en agua ó en 50uM ABA (no se pudieron analizar las muestras de IS9530 en ABA). Durante la incubación en agua los niveles de GA₁, GA₃ y GA₄ aumentaron transitoriamente en embriones de RedlandB2; este aumento no se observó en embriones de IS9530. Los embriones de ambos genotipos germinaron rápidamente en estas condiciones, y alcanzaron el 100% a las 24h de iniciada la imbibición (datos no mostrados). Estos resultados muestran que los embriones de RedlandB2 tendrían una mayor capacidad para producir GA que los de IS9530 (ya sea por mayor síntesis, o menor inactivación); esta diferente producción de GA en el embrión aislado, aunque no afectó la germinación en estas condiciones (donde se ha eliminado la restricción impuesta por las cubiertas, y el ABA difunde rápidamente al medio), podría estar asociada con la diferente producción de GA observada en cariopses enteros.

El agregado de ABA al medio de incubación inhibió significativamente la producción de GA en embriones de RedlandB2; esto muestra que el ABA afecta rápidamente el metabolismo de las GA durante la incubación de embriones aislados, y sugiere fuertemente que el ABA endógeno tendría un efecto similar

en cariopses enteros. El efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación parece estar mediado, al menos en parte, por el bloqueo de los niveles endógenos de GA. Este efecto del ABA podría estar mediado por la inhibición del proceso de síntesis de GA, o alternativamente, por la promoción de la degradación de GA activas. Para evaluar ambas posibilidades, se analizó la expresión de algunos de los genes del metabolismo de GA durante la incubación de embriones aislados en agua ó ABA.

Regulación de la expresión de genes del metabolismo de GA por ABA durante la incubación de embriones aislados:

Se aislaron e incubaron embriones de cariopses de 30 DPA en agua o en una solución 50 μ M ABA, y se analizó la expresión de diferentes genes que participan en el metabolismo de las GA (**Fig.4.2**): *SbGA20ox1* y 2, *SbGA-3b-OH*, implicados en la síntesis de GA, y también dos genes de inactivación de GA, *SbGA2oxA* y *SbGA2oxC*. La expresión de los genes *SbGA20ox1* y *SbGA20ox2* disminuyó durante las primeras horas de incubación en los embriones aislados e incubados en agua, y esto fue similar para los dos genotipos (**Fig.4.2**, izquierda). Este patrón fue diferente en presencia de 50 μ M ABA; la expresión de ambos genes se indujo a partir de las 2h en embriones de IS9530; en RedlandB2, solamente se observó una promoción significativa por ABA para *SbGA20ox2*, y a partir de las 8h. Paralelamente, la expresión de *SbGA-3b-OH* mostró un patrón diferente al de *SbGA20-ox1* y 2; la de expresión de este gen aumentó durante las primeras 2h de incubación y luego se mantuvo oscilando sin una tendencia clara, y no se observó un efecto significativo del ABA sobre su expresión en ninguno de los dos genotipos.

Teniendo en cuenta que el agregado de GA durante la incubación redujo transitoriamente la expresión de *GA20ox1* y 2 en cariopses embebidos de IS9530 (Fig.2.8), y que el ABA redujo los niveles de GA endógenas en embriones aislados (Fig. 4.1), la mayor expresión de estos genes en presencia de ABA apoya un modelo de regulación negativa por GA. Adicionalmente, la rápida caída en la expresión de estos genes en embriones aislados e incubados en agua coincide temporalmente con la observación de altos niveles de GA en condiciones similares (Fig.4.1).

Por lo tanto, la disminución de los niveles endógenos de GA observada en embriones incubados en ABA (Fig. 4.1) no parece estar mediada por un bloqueo a nivel transcripcional de ninguno de estos genes de síntesis de GA. En RedlandB2 pudo observarse una promoción de la expresión de *SbGA20ox2* recién horas más tarde que en IS9530 y esto podría estar asociado con un descenso en los niveles de GA para ese momento.

En cuanto a la posible regulación de los genes de inactivación de GA por ABA, se observó que el ABA promovió la expresión de los genes *SbGA2oxA* y *SbGA2oxC* (no se midió *SbGA2oxD*). Ambos genes mostraron un patrón diferente entre ellos pero similar entre genotipos. Aunque la inducción de *SbGA2oxC* parece haber comenzado antes en IS9530 (Fig.4.2.B), la mayor inducción se observó en ambos genotipos hacia las 12 h de incubación, y los niveles alcanzados en IS9530 duplicaron aproximadamente los de RedlandB2. Estos resultados sugieren que los menores niveles de GA endógenas en embriones incubados en ABA podrían deberse a la inducción por ABA de la transcripción de *SbGA-2oxC* y *SbGA2oxA*. Esto resultaría en una mayor tasa de

inactivación de GA en respuesta a la señalización del ABA. Este resultado deberá confirmarse mediante la detección de los catabolitos que resultan de la actividad de estas enzimas. Por otro lado, a partir de la promoción por ABA de la expresión de los genes de inactivación de GA, se puede hipotetizar que estos genes podrían estar regulados por factores de transcripción involucrados en la señalización del ABA, como los ABI abordados en este trabajo.

Fig. 4.1. Niveles de tres giberelinas activas (GA₁, GA₃ y GA₄) en embriones de sorgo aislados e incubados en agua (RedlandB2, IS9530) destilada ó una solución 50uM ABA (RedlandB2). Las muestras no tienen duplicados biológicos excepto donde se muestran barras de error. Los datos corresponden a los experimentos de la campaña 2003.

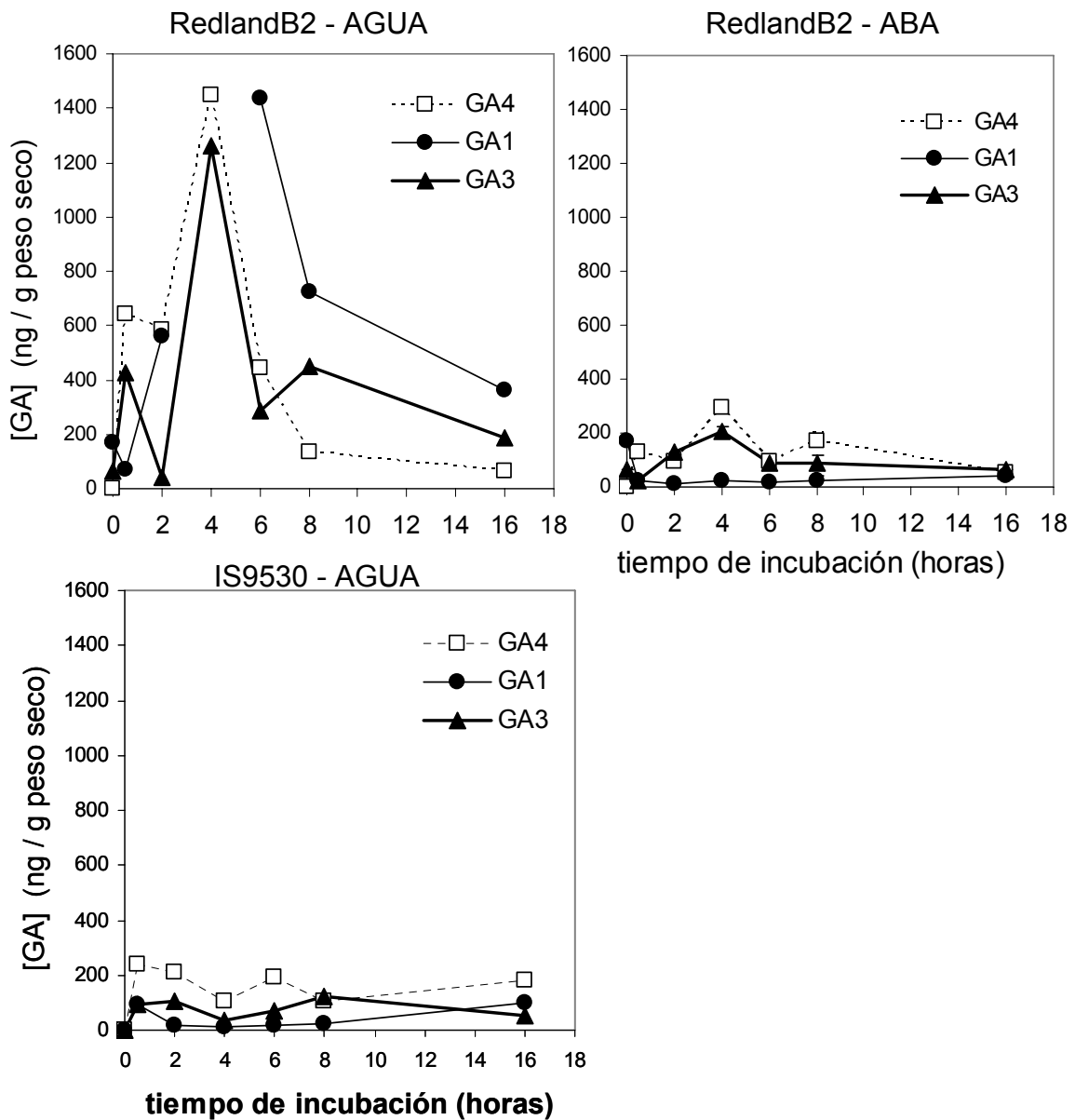
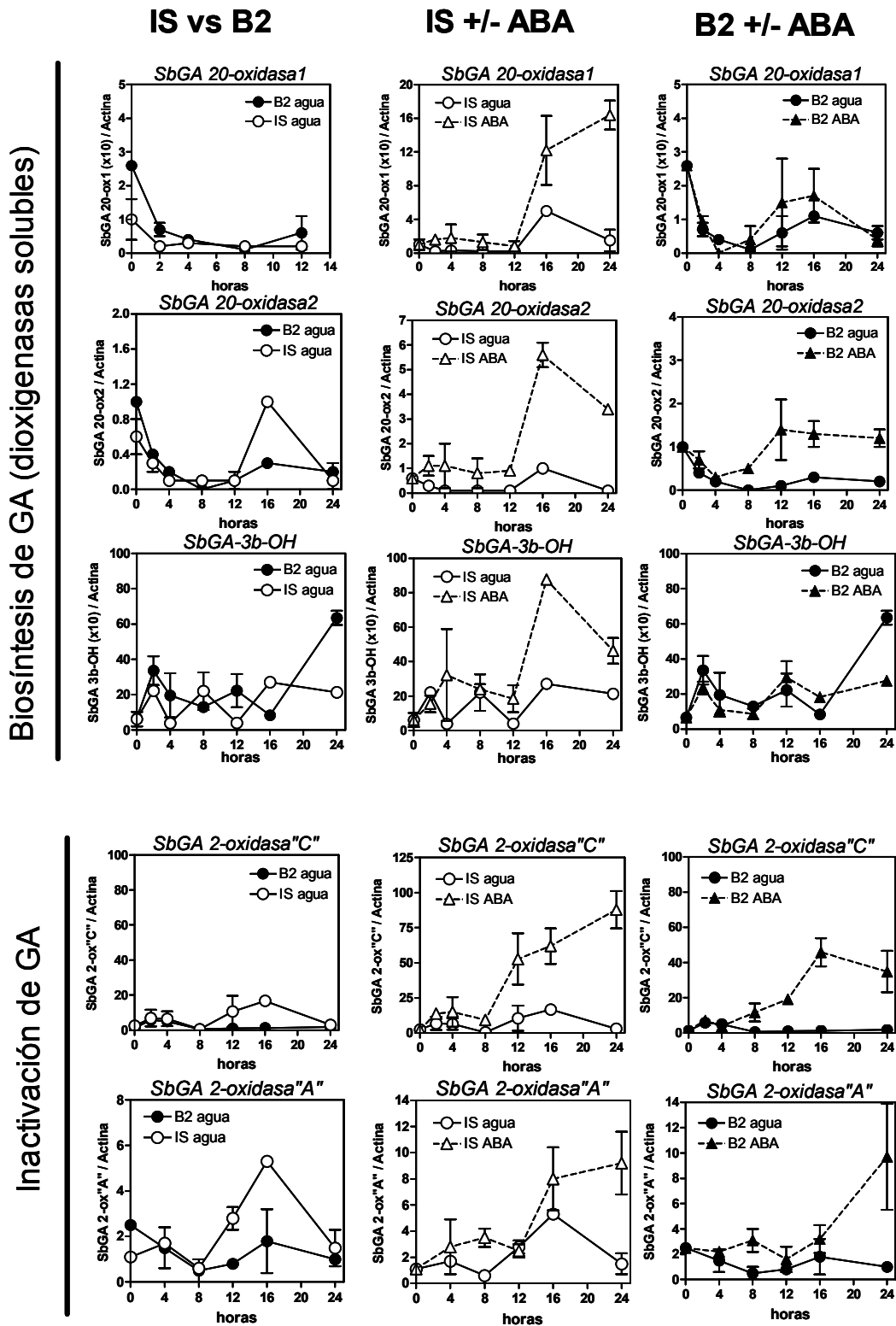


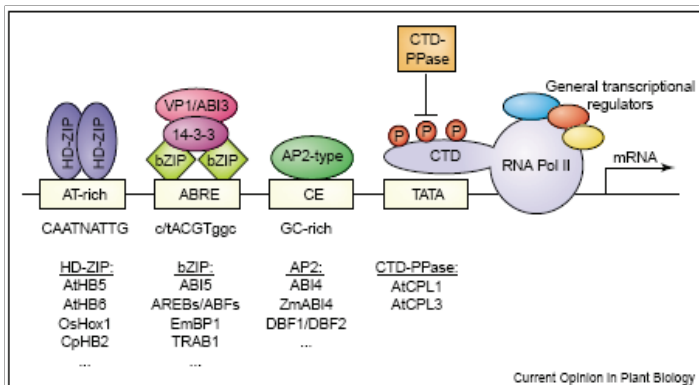
Fig. 4.2: Expresión de genes del metabolismo de GA en embriones de sorgo aislados e incubados en agua (control) ó 50uM ABA (25°C). Los embriones provienen de cariopses cosechados a los 30 DPA, de IS9530 y RedlandB2.



RESULTADOS. Capítulo 4. Sección B.

Análisis (in silico) de la región promotora del gen *SbGA2oxidasaC*.

Los resultados presentados en las secciones anteriores apoyan una posible regulación del metabolismo de GA por ABA a través de la promoción de transcripción de al menos dos genes que codifican para enzimas GA2oxidasas que inactivan GA. La promoción por ABA de la expresión de estos genes de inactivación de GA sugirió la hipótesis de que estos genes podrían estar regulados por factores de transcripción involucrados en la señalización del ABA, como los ABI abordados en este trabajo. Se han identificado diversas secuencias *cis*-regulatorias que son reconocidas por estos factores de transcripción y están presentes en los promotores de genes regulados por ABA; estos elementos *cis* están altamente conservados entre especies. En el esquema de abajo, extraído de Himmelbach *et al.* (2003) se muestran los principales elementos *cis* que componen un complejo de respuesta al ABA (ABRC, *ABA-response complex*), aunque la presencia simultánea de todos estos elementos no es siempre necesaria (por ej., dos elementos ABRE pueden ser suficientes, y el elemento "AT-rich" no es indispensable en muchos promotores regulados por ABA). La existencia de bases de datos con secuencias *cis*-regulatorias en plantas, como PLACE en la *Rice database* (Japón) accesibles por internet permite evaluar la presencia de elementos regulatorios en una secuencia de ADN a través del uso de programas de comparación de secuencias.



Principales elementos *cis*-regulatorios y factores de transcripción (FTs) en la regulación de la expresión génica por ABA. El complejo transcripcional consiste de la RNapolimerasa II (RNA Pol II) asociada con reguladores generales de la transcripción, incluyendo la proteína de unión al TATA-box. La maquinaria transcripcional está controlada por la unión de FTs a los elementos *cis* en el promotor. El *ABA-regulatory element* (ABRE) es el sitio de unión preferido por FTs diméricos bZIP

(basic leucine zipper), como ABI5; estos FTs se asocian con otros FTs como ABI3 y proteínas 14-3-3. El elemento de acople (CE) es reconocido por FTs del tipo apetala-2 (AP2), como ABI4, y promueve la transcripción regulada por ABA.

(Extraído de Himmelbach *et al.*, 2003, Relay and control of abscisic acid signaling. *Current opinion in plant biology*, 6:470-479).

Hasta el presente y tras numerosos trabajos en diferentes especies se han caracterizado cuatro clases principales de secuencias *cis*-regulatorias que son necesarias ó suficientes para que un gen sea inducible por ABA: los elementos G-box, también llamados ABRE (ABA response element); los elementos de acople ó CE; los elementos RY/Sph; y las secuencias reconocidas por factores de transcripción de la clase MYC y MYB (Busk and Pagès, 1998; Finkelstein, 2002; Rock, 2000). La caracterización de estos elementos involucrados en la inducción por ABA se hizo en gran medida usando promotores de genes que codifican para proteínas LEA o que se inducen en respuesta a la deshidratación (como HVA21, HVA22 de cebada, RD29a/b, de *Arabidopsis* entre otros) y a través de sustituciones de bases y deleciones, y observando su efecto en la inducción por ABA de un gen reportero (Shen *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2006).

Para la identificación de estos y otros elementos regulatorios en la región 5' del gen se usaron dos programas disponibles en internet por dos servidores, PLACE (Rice DataBase, Japón; Higo *et al.*, 1999) y CARE (Cis Acting Regulatory Elements, USA; Lescot *et al.*, 2002), aunque solo se presentan los resultados obtenidos con PLACE, por ser más completos. Ambos programas cuentan con una base de datos actualizada de secuencias regulatorias obtenidas por un curador de cada sitio y extraídas a partir de trabajos publicados. Estos programas localizan secuencias individuales a lo largo de una secuencia de ADN candidata.

Sin embargo, estos programas no evalúan de ninguna manera la composición del conjunto de secuencias identificadas ni su posición relativa dentro del hipotético promotor, ni la funcionalidad del promotor. Por ej., los elementos que se han identificado a partir de numerosos trabajos implicados en la regulación por ABA, parecen actuar cooperativamente si satisfacen un determinado orden relativo, para formar lo que se ha denominado "ABRC" (*ABA response promoter complex*). Los "ABRC" que se han descrito contienen un núcleo ACGT (también llamado G-box) más un elemento de acople, "CE" (*coupling element*), y se ha demostrado que estos dos elementos son necesarios y suficientes para la inducción de la transcripción de un gen por ABA en cereales. Shen *et al.* (2004) mostraron que variables como la posición relativa con respecto al TATA box, la orientación (hebra del ADN) y la distancia entre estos elementos pueden afectar de manera diferente la funcionalidad de dos ABRCs que se encuentran en el promotor de dos genes de cebada inducibles por ABA, *HVA21* y *HVA22*. Alternativamente, dos copias de un elemento ACGT son igualmente funcionales para la inducción de un gen por ABA.

Análisis de la región promotora del gen SbGA2oxidasaC: identificación de elementos cis-regulatorios implicados en la señalización del ABA.

La secuencia correspondiente al gen denominado *SbGA2oxC* identificada en PlantGDB (SbGSStuc11-12-04.48717.1) contiene una región 5' no codificante que abarca una región de 557nt antes del sitio de inicio de la traducción (según alineamiento con la proteína GA2ox3 de arroz, ver ANEXO). Esta región no codificante abarcaría una parte significativa del promotor del gen, aunque no se puede descartar la existencia de otros factores regulatorios fuera de esta región.

Al analizar en el sitio PLACE esta secuencia de 557 bases, se encontraron numerosos elementos *cis* (**Fig.4.3** y **Tabla 4.1**) involucrados en la regulación por factores tan diversos como luz, ABA / estrés abiótico (deshidratación, etiolación), hormonas (auxinas y etileno), entre otros (se puede ver la lista completa de

elementos y sus posiciones en el ANEXO). De los elementos identificados en la regulación por ABA, están presentes los principales: dos elementos "ABRE"; un elemento de acople "CE"; dos elementos "RY/Sph"; un elemento "MYB" y tres elementos "MYC".

La posición relativa de los elementos encontrados con respecto al TATA box y entre sí, parece satisfacer los requerimientos para la inducción por ABA de otros promotores analizados (Himmelbach *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004). La configuración 5'-(RY)-(DRE)-(CE1)-(ABRE)-(TATAbox)-3' sugiere que este gen estaría regulado, entre otros, por factores de transcripción vinculados con la señalización del ABA, ya que elementos encontrados son similares a los que reconocen ABI5, ABI3/VP1, ABI4, y sus homólogos. Muchos genes que se inducen en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico tienen en su promotor el elemento "DRE" (*dehydration responsive element*) así como elementos ABRE (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005.), y ambos elementos se encontraron en el promotor de *SbGA2oxC*. La presencia de un elemento "GAdown" (encontrado en el promotor de numerosos genes inhibidos en respuesta a GA; Ogawa *et al.*, 2003) superpuesto a la secuencia "ABRE", podría ser un sitio por el cual compiten dos factores con efecto opuesto, por ej., un factor bZIP (como ABI5 o similar) que induce la expresión en respuesta al ABA, y otro factor de transcripción inducible por GA capaz de bloquear el acceso del factor bZIP al "ABRE", y así inhibir la inducción del gen. Se ha demostrado en *Brassica napus* y *Arabidopsis* que el elemento "RYrepeat" (equivalente a Sph) hace que la inducción de la expresión por ABA mediada por el "ABRE" (Ezcurra *et al.*, 1999) ocurra específicamente en la semilla, y ambos elementos se encuentran en el promotor de genes que se expresan típicamente en semillas y son regulados por ABA. El dominio B3 de ABI3/VP1 se une a este elemento "RY"; a su vez ABI5 se une al elemento "ABRE" próximo al "RY", y se ha demostrado que ambas proteínas, ABI5 y VP1, interactúan físicamente a través de dominios específicos durante la regulación de la transcripción (Nakamura *et al.*, 2001). Estos dos elementos, "ABRE" y "RY" se localizan próximamente en el promotor de *SbGA2oxC*, y esto podría funcionar como un complejo de respuesta al ABA (ABRC); adicionalmente, entre estos dos elementos se encontró un elemento de acople idéntico al "CE1" de cebada; este elemento también podría conformar un ABRC con el "ABRE" adyacente. Los otros elementos encontrados, "MYB" y "MYC", están asociados con la inducción de la transcripción en respuesta a la deshidratación y a la baja temperatura mediada por ABA, aunque se desconoce aún el rol de estos factores de transcripción en la regulación de la expresión génica en semillas y durante la germinación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este gen podría expresarse también en tejidos vegetativos y posiblemente esté implicado en la regulación de las GA en relación a otros procesos biológicos diferentes a la germinación. Por ej., es llamativa la presencia de numerosos elementos asociados con la regulación por luz / fitocromo (ver lista completa en ANEXO); en estas semillas la germinación no es afectada por la luz, lo cual sugiere que la regulación de este gen por este factor ocurre en otra etapa del desarrollo de la planta. La presencia simultánea de estos elementos y su disposición en la región promotora del gen *SbGA2oxC* apoyan una posible regulación de este gen por ABA, y la presencia de un elemento "RY" sugiere que esta regulación por ABA sería específica para la semilla. Los factores de transcripción que reconocen estos

elementos podrían ser los candidatos analizados (SbABI5, SbVP1, SbABI4) u otros factores homólogos.

Fig.4.3: Región 5' no codificante del gen *SbGA2oxC*; se analizó una secuencia que abarca las primeras 557 bases del GSScontig (SbGSStuc11-12-04.48717.1 Length=976pb), río arriba del inicio de un EST alineado con las últimas 419 bases del GSS y que codifica para los aa 1 a 96 de la proteína homóloga de arroz.

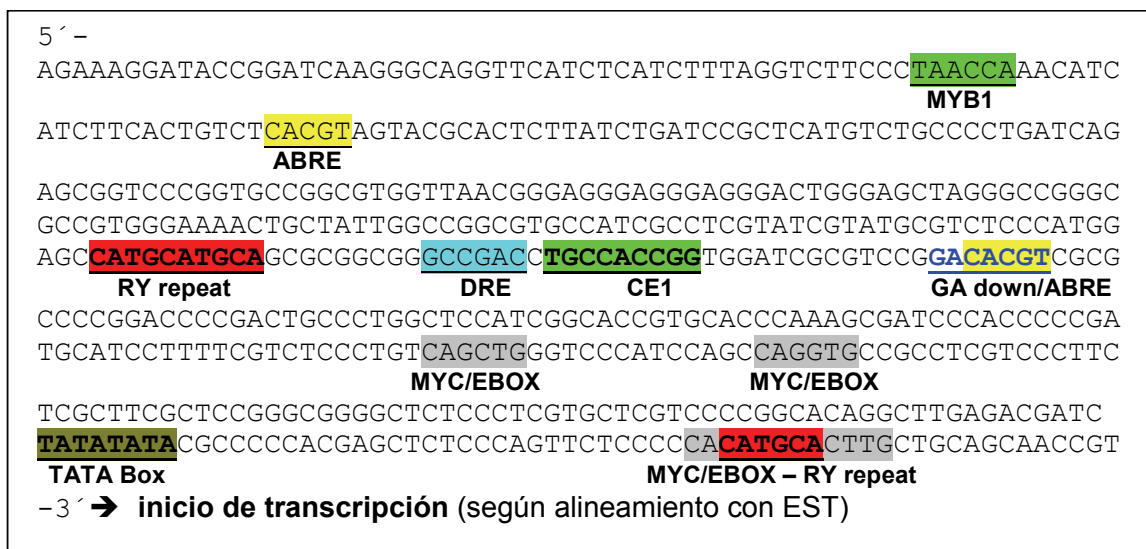


Tabla 4.1: Información disponible en PLACE (Rice Database) para los elementos identificados en el promotor de *SbGA2oxC*, mostrados en la Fig.4.4, y que tienen relación con la regulación por ABA y estrés abiótico.

Nombre	# PLACE	Referencias	Secuencia
ABRECE1HVA22	S000014	PubMed: 7734964	TGCCACCGG
CE1(coupling element 1) of barley HVA22 gene; possible binding site for nuclear bZIP protein; ABA responsive complex consists of a G-box, namely ABRE3 (GCCACGTACA), and CE1.			
ABRELATERD1	S000414	PubMed: 16463099	ACGTG
ABRE-like sequence (from -199 to -195) required for etiolation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration) in <i>Arabidopsis</i> ;			
MYCCONSUSAT / EBOXBNNAPA	S000407 / S000144	PubMed: 12509522 15834008 17015446 8818291	CANNTG
MYC recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in <i>Arabidopsis</i> ; Binding site of ATMYC2 N=A/T/G/C; MYC recognition sequence in CBF3 promoter; Binding site of ICE1 (inducer of CBF expression 1) that regulates the transcription of CBF/DREB1 genes in the cold in <i>Arabidopsis</i> .			
DRECRTCOREAT/ CBFHV	S000418 / S000497	PubMed: 16113229 12609047	RCCGAC
Core motif of DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) cis-acting element found in many genes in <i>Arabidopsis</i> and rice; R=G/A;			
GADOWNAT	S000438	PubMed: 12837949 ; 16463099	ACGTGTC
Sequence present in 24 genes in the GA-down regulated d1 cluster (106 genes) found in <i>Arabidopsis</i> seed germination; This motif is similar to ABRE (Busk and Pages 1998);			
MYB1AT	S000408	PubMed: 12509522 ;	WAACCA
MYB recognition site found in the Promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in <i>Arabidopsis</i> ; W=A/T;			
RYREPEATBNNAPA	S000264	PubMed: 10480393 ; 11029704 ;	CATGCA
"RY repeat" found in RY/G box (the complex containing the two RYrepeats and the G-box) of napA gene in Brassica napus (B.n.); Found between -78 and -50; Required for seed specific expression; a tetramer of the composite RY/G complex mediated only ABA-independent transactivation by ABI3.			

RESULTADOS. Capítulo 4. Sección C.

Efecto de las GA sobre la expresión de genes de la señalización del ABA:

Cambios en los niveles de GA podrían afectar procesos controlados antagónicamente por ABA no solamente a través de los elementos *cis*-regulatorios en la región promotora de los genes afectados, sino también a través de cambios en la señalización de componentes de la señalización del ABA. Para evaluar esta posibilidad, se midió la expresión de algunos de los genes candidatos involucrados la señalización del ABA durante la incubación de cariopses en agua ó en presencia de GA ó paclobutrazol.

Los resultados de la **Fig.4.4** muestran que cambios en los niveles de GA durante la incubación de cariopses enteros afectaron la expresión de los tres genes analizados, *SbABI5*, *SbABI4* y *SbRab28*. La presencia de 100uM GA3+4 en el medio de incubación de cariopses de IS9530 disminuyó transitoriamente la expresión de *SbABI4* (a las 24 y 96h); también se observó un efecto similar, aunque no fue significativo, para *SbABI5*. La expresión de *SbRab28* no respondió de manera significativa a las GA en este genotipo, aunque también se observó una tendencia a la inhibición de su expresión en IS9530, y este resultado se repitió en un experimento similar con cariopses inmaduros (**Fig.4.5**). Paralelamente, la disminución de las GA endógenas por agregado de paclobutrazol durante la incubación de cariopses de RedlandB2 (**Fig.4.4**, derecha), resultó en una leve promoción de la expresión de estos genes, particularmente de *SbABI5* a las 24h y posteriormente a las 72h y en adelante. La expresión de *SbABI4* y *SbRab28* también fue ligeramente mayor a las 72h al inhibir la síntesis de GA (Fig.4.4). En conjunto estos resultados muestran que cambios en los niveles de GA durante la incubación de cariopses de sorgo son capaces de modular la expresión de genes involucrados en la señalización del ABA, y a través de ellos, posiblemente de otros genes. Esto sugiere que las vías de señalización del ABA y las GA están conectadas en varios niveles, y pueden afectarse de manera recíproca. En *Arabidopsis* se observó una inhibición, también moderada, de la expresión de *ABI5* y *ABI3* en presencia de GA₄, durante la incubación de semillas mutantes *ga1-3* que son GA-deficientes (Ogawa *et al.*, 2003).

A diferencia de otras GA2oxidasas que son inducidas por altos niveles de GA en otras especies, en la Fig.4.5 puede observarse, también, que la expresión de *SbGA2oxC* es modulada negativamente por GA en cariopses incubados de IS9530, y esto podría estar asociado con la regulación positiva de este gen por ABA como se observó en la Fig.4.2.

Fig.4.4: Expresión de *SbABI5*, *SbABI4* y un gen que se induce por ABA, *SbRab28*, en embriones durante la incubación de cariopses de sorgo maduros (42DPA). Se incubaron en agua (Controles) ó en una sn 100uM GA4+3 (IS9530) ó en paclobutrazol (RedlandB2), a 20°C.

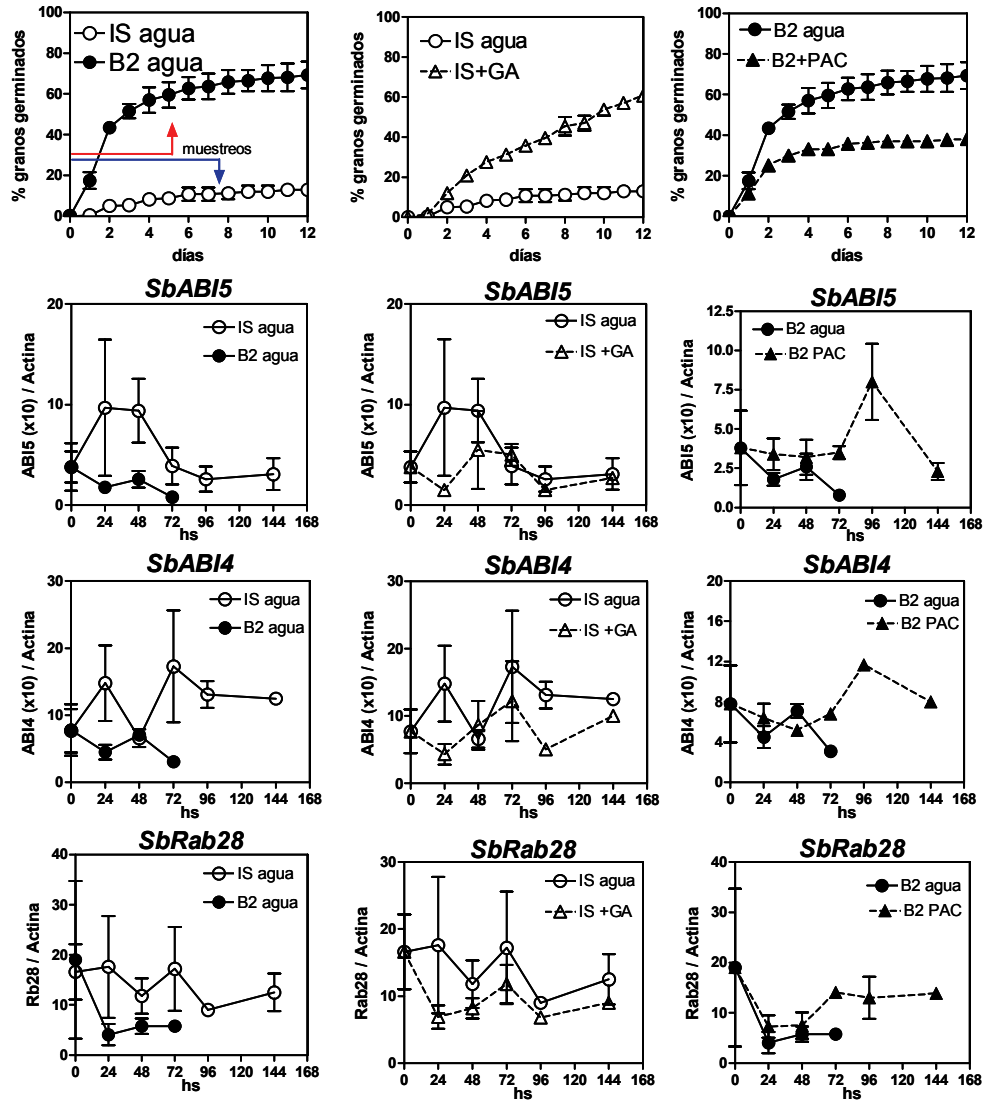
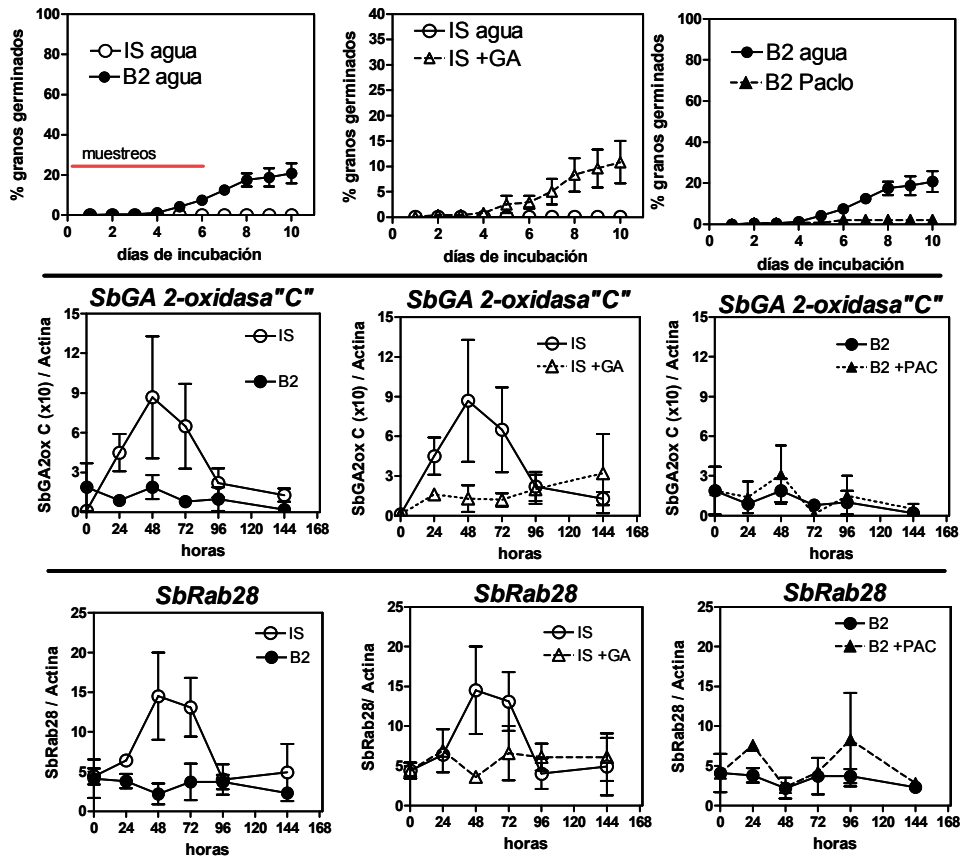


Fig.4.5: Expresión de *SbGA2oxidasasC* (¿inducible por ABA?) y un gen que se induce por ABA, *SbRab28*, en embriones durante la incubación de cariopses de sorgo inmaduros (30DPA). Se incubaron en agua (Controles) ó en una sn 100uM GA4+3 (IS9530) ó en paclobutrazol (RedlandB2), a 20°C.



CONCLUSIONES del Capítulo 4

Los resultados presentados en este capítulo permiten aceptar la hipótesis iv) “El ABA regula negativamente la biosíntesis de GA en el embrión durante la incubación de cariopses de sorgo. Esto debería verse como un menor contenido de GA durante la incubación de embriones de sorgo en presencia de ABA en comparación con los embriones en agua”. Los datos presentados en la sección A de este capítulo muestran que el bloqueo de la germinación de embriones aislados de sorgo está mediado, al menos en parte, por la inhibición del aumento de los niveles endógenos de GA, observado en condiciones propicias (agua) para la germinación de los mismos embriones. Tal como lo planteaba la siguiente y última hipótesis, la hipótesis v), el ABA efectivamente alteró la expresión de varios de los genes del metabolismo de GA; por un lado, y al contrario de lo que propone la primera parte de esta hipótesis, el ABA indujo la expresión de los genes *SbGA20oxidasas1* y *SbGA20oxidasas2*, y esto coincide con otras evidencias que apoyan un mecanismo de regulación negativa para estos genes. Los datos no muestran una regulación clara para el gen *SbGA-3b-OH* por el ABA, así como tampoco había evidencias de una regulación negativa por GA (Capítulo 2, sección C). Paralelamente, la expresión de los genes que codifican para enzimas que inactivan GA, *SbGA2-oxA* y *SbGA2-oxC*, se indujo significativamente por ABA en embriones de ambos genotipos, aunque esta inducción fue mayor en IS9530 que en RedlandB2. Estos resultados apoyan la hipótesis v) que postula una regulación del metabolismo de las GA a nivel transcripcional por parte del ABA durante la germinación de las semillas. Sin embargo, la confirmación de este resultado dependerá de la detección de alguno de los catabolitos resultantes del proceso de inactivación por estas enzimas.

El análisis de la región promotora de uno de estos genes reveló la presencia de elementos *cis*-regulatorios que en otras especies mostraron ser necesarios y suficientes para la inducción de la transcripción regulada por ABA. Esto apoya una posible regulación de estos genes de manera directa por factores de transcripción implicados en la señalización del ABA, como los candidatos analizados (*ABI3*, *ABI4* y *ABI5*).

Adicionalmente, se puso en evidencia una regulación recíproca entre ambas hormonas a través de la observación de la expresión de genes de señalización del ABA en respuesta a la manipulación de los niveles de GA; el agregado de GA redujo la expresión de genes como *ABI5* y *ABI4*, lo cual sugiere que moduló negativamente la señalización del ABA. Una respuesta similar se observó para el gen *SbGA2oxC*, lo cual también apoya una regulación positiva de este gen por ABA.

Es la primera vez que se muestra una acción directa del ABA sobre el metabolismo de las GA en la semilla embebida, y en las plantas en general. Esta interacción había sido propuesta previamente en sorgo a partir de datos de expresión del gen *SbGA20-ox1*, pero los resultados de este trabajo de tesis muestran que la expresión de este gen no está asociada con la inhibición de la germinación por ABA. Por otro lado la regulación negativa de los niveles de GA ha sido descrita en relación a diversos procesos en plantas además de semillas, y los genes de las enzimas responsables están fuertemente regulados en respuesta a factores del ambiente y etapas del desarrollo en diferentes especies. Por lo tanto no es sorprendente que estas enzimas cumplan un rol regulatorio principal

en la expresión de la dormición en cariopses de sorgo y posiblemente en otros cereales. Sin embargo, la regulación de estos genes por ABA tal como se sugiere a partir de los datos de esta tesis no había sido propuesta anteriormente y deberá ser confirmada en trabajos futuros.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La imposición de la dormición primaria ocurre durante el desarrollo temprano de las semillas en muchas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas, y está regulada hormonalmente, principalmente por las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El patrón de salida de la dormición que exhibe una población de semillas depende principalmente del genotipo, aunque puede ser modulado por factores del ambiente (disponibilidad hídrica, temperatura) que actuaron durante el desarrollo de la semilla en la planta madre; este patrón también se puede modificar a través de manipulaciones del contenido hormonal durante una etapa temprana del desarrollo, por ejemplo mediante la aplicación de inhibidores de biosíntesis de ABA ó de GA en semillas en desarrollo (Steinbach *et al.*, 1997). Estas hormonas actúan también en la expresión de la dormición (o mantenimiento de la dormición) que se manifiesta como el bloqueo de la germinación en la semilla embebida. Esto es evidente a partir del agregado de ABA ó GA (o de productos que inhiben su síntesis) al medio de incubación de las semillas y la observación de sus efectos sobre la germinación. Sin embargo, además del ABA y las GA, otras hormonas como etileno, citoquininas, brasinosteroides y glucosa, y pueden tener un rol principal en el control de la germinación en diferentes especies (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La expresión de diferentes niveles de dormición en semillas de cereales está regulada principalmente por los efectos antagónicos del ABA y las GA; estas hormonas controlan en última instancia el potencial de crecimiento del embrión (además de la degradación y removilización de reservas del endosperma), y en el caso de los cereales no hay restricciones mecánicas para la expansión de la radícula que deban ser eliminadas para que se complete la germinación del cariopse, como sucede en semillas de solanáceas y otras especies. En cariopses de sorgo, así como en otras especies de cereales, modificaciones en este balance ABA/GA podrían darse a través de cambios en los contenidos endógenos de una o ambas hormonas, y/o mediante cambios en la actividad de sus vías de señalización. Mediciones detalladas del contenido de ABA a lo largo del desarrollo y durante la incubación de embriones aislados y cariopses enteros provenientes de IS9530 y RedlandB2, mostraron que los niveles endógenos de ABA no difieren entre ambos genotipos (Steinbach *et al.*, 1997; Gualano *et al.*, 2007). Es importante notar que, aunque el contenido de ABA no se asoció con la diferente expresión de la dormición en estos genotipos, esto no significa que el ABA no sea importante para el establecimiento y expresión de la dormición; la aplicación de fluridone, un inhibidor de biosíntesis de ABA, en panojas en desarrollo, disminuyó el contenido de ABA y aceleró la salida de la dormición (Steinbach *et al.*, 1997). Estos mismos autores mostraron la importancia de las GA en el establecimiento y expresión de la dormición mediante la aplicación de paclobutrazol en panojas durante el desarrollo temprano, lo cual redujo el contenido de GA y demoró la salida de la dormición. Sin embargo, la información reunida hasta el inicio de esta tesis en el año 2003, no era concluyente con respecto a la existencia de una síntesis *de novo* durante la germinación en cariopses de sorgo granífero. En experimentos realizados por Steinbach *et al.*, (1997) el agregado de paclobutrazol al medio de incubación no afectó la germinación al cabo de 48 h para cariopses

cosechados en diferentes momentos del desarrollo, y aunque esto no era un dato concluyente, sugería que la síntesis *de novo* no era un proceso activo durante la incubación. Otras mediciones realizadas con cariopses de estas dos líneas de sorgo (Pérez-Flores *et al.*, 2003; Benech-Arnold *et al.*, 2003) mostraron que diferentes GA activas aumentaron durante las primeras 24 h de incubación, y mayores niveles de GA se asociaron con mayores porcentajes de germinación. Sin embargo, estas mediciones no se extendieron nunca más allá de las primeras 24 horas, y estas GA “tempranas” podían provenir de la hidrólisis de conjugados y no de la síntesis *de novo*. Por ejemplo, Rood y Pharis (1983) detectaron la liberación de GA4 a partir de la hidrólisis de conjugados con glucósidos durante la germinación de cariopses de maíz. La hidrólisis artificial de estos conjugados se logró luego de una hidrólisis ácida (incubación durante 6 h con HCL 1N). Quedaba por lo tanto aún por demostrar la relevancia de la síntesis *de novo* de GA para la germinación de cariopses de sorgo, y su relación con la expresión de diferentes niveles de dormición.

Por otro lado, la ausencia de un efecto del fluridone agregado al medio de incubación sobre la germinación de cariopses dormidos, en conjunto con mediciones del contenido de ABA que mostraban que éste se mantuvo o disminuyó durante la incubación (Benech-Arnold *et al.*, 2003), sugerían que la síntesis *de novo* de ABA no está implicada en la expresión de la dormición en sorgo granífero, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, como *Hordeum vulgare*. En cambio, es la sensibilidad del embrión al efecto inhibitorio del ABA la variable que muestra una alta correspondencia con el nivel de dormición en IS9530 y RedlandB2, y esto se confirmó en numerosas campañas y experimentos. Por otro lado, en ensayos previos (Benech-Arnold *et al.*, 2003) no se observaron diferencias en la sensibilidad del embrión a las GA entre estos genotipos (evaluada como la capacidad de concentraciones crecientes de GA para revertir la inhibición por ABA en embriones aislados). Por lo expuesto, los procesos que aparecen como relevantes en la expresión de diferentes niveles de dormición en estos genotipos de sorgo son el metabolismo de GA y la señalización del ABA.

En este trabajo de tesis se propuso avanzar en la caracterización de estos dos mecanismos en semillas de sorgo y de la posible regulación de los mismos a nivel transcripcional, con el objetivo de identificar sitios regulatorios del balance ABA/GA en la expresión de la dormición. Para ello se usaron las dos líneas endocriadas IS9530 y RedlandB2 como sistema modelo, las cuales formaron parte de investigaciones previas. En términos generales, se analizó la expresión de un conjunto de genes candidatos que codifican para putativos componentes de la señalización del ABA y del metabolismo de GA (luego de identificar las secuencias de sorgo granífero con mayor identidad con las secuencias conocidas para estos genes candidatos en otras especies de plantas). La expresión de estos genes se analizó por RT-QPCR en muestras de embriones tomadas al cabo de diferentes tiempos durante la fase II de incubación de las semillas, en la etapa previa a la emergencia de la radícula. Los patrones de expresión obtenidos se asociaron con mediciones paralelas de hormonas (principalmente GA) y con las respuestas de germinación. También se realizaron ensayos similares pero manipulando los niveles de GA durante la incubación de los cariopses y de ABA durante la incubación de embriones aislados.

Los resultados obtenidos en el primer capítulo, donde se analizó la expresión de genes candidatos implicados en la señalización del ABA, mostraron una mayor actividad transcripcional para varios de estos genes en cariopses de IS9530 comparando con RedlandB2, coherente con la mayor sensibilidad al ABA y la expresión de un alto nivel de dormición en IS9530. Los genes evaluados corresponden a los ortólogos de sorgo para los factores de transcripción ABI (ABI5, ABI4 y VP1/ABI3), una kinasa (PKABA1) y una fosfatasa (ABI1). También se midió la expresión de un gen de respuesta al ABA, *Rab28*. La inducción transitoria, pero coordinada, de *SbABI5*, *SbABI4*, *SbVP1* y *SbPKABA* fue observada solamente en condiciones más favorables para la expresión de la dormición (cariopses inmaduros de IS9530, y temperatura de incubación 20°C) y parece ser necesaria para inducir el bloqueo de la germinación. De los factores de transcripción analizados, la expresión de *SbABI5* fue siempre mayor en muestras de IS9530 en tres experimentos de dos campañas diferentes (y en otros experimentos no mostrados), mientras que *SbVP1* y *SbABI4* no siempre fueron coherentes con este patrón. En *Arabidopsis* y otras especies estos dos factores son necesarios para reforzar la inducción de la transcripción por ABI5, y su presencia y acción coordinada con ABI5 podría significar una inducción más intensa en respuesta al ABA. De los factores de transcripción implicados en la señalización del ABA, ABI5 parece ser fundamental para inducir la expresión de genes a través de la unión al elemento "ABRE", y la presencia de un segundo elemento "ABRE" en el promotor puede funcionar como elemento de acople para ABI5 aún en ausencia de ABI4 y VP1/ABI3 (Shen *et al.*, 2004). Debido a que la promoción de la expresión de *SbABI5* se repite en los distintos experimentos de esta tesis (y en otros similares realizados por G.M. Mendiondo, *comunicación personal*), este factor de transcripción parece ser un componente importante para la señalización del ABA durante la expresión diferentes niveles de dormición en estos genotipos. Actualmente se está analizando la presencia de este factor de transcripción a nivel de proteína, para lo cual se obtuvieron anticuerpos policlonales contra una porción específica de ABI5 (Biosynthesis, Tx, USA). Resultados preliminares de los Westerns realizados con muestras de 30 DPA apoyan la existencia de mayores niveles de ABI5 en cariopses embebidos de IS9530; ABI5 pudo detectarse en cariopses de IS9530 a las 48 h de incubación, mientras que no se detectó en muestras de RedlandB2.

En el segundo capítulo se puso en evidencia, en primer lugar, la existencia de dos posibles fracciones de giberelinas, una en la cual las GA estarían disponibles para la promoción del crecimiento del embrión, y una segunda fracción compuesta principalmente por GA que no se asociaron con la respuesta de germinación. Esta segunda fracción, extraída a pH ácido (3.0), mostró altos niveles de GA activas en cariopses inmaduros de ambos genotipos desde el tiempo cero de incubación, y tendieron a mantenerse estables durante el período muestreado. Estas GA podrían estar en el apoplasto del embrión formando parte de complejos con otros compuestos, reversibles a partir de la acidificación del apoplasto durante la germinación, y se propone que tendrían un rol principal en la hidrólisis de las reservas del endosperma. La otra fracción de GA detectadas luego de la extracción a pH neutro (7.0), mostró patrones diferentes para GA1 y GA3 en ambos genotipos, y estos patrones se asociaron con la respuesta de germinación. Estas GA, a diferencia de la fracción anterior, parecen ser el resultado de la síntesis *de novo* durante la incubación, además de estar reguladas

de manera diferente en ambos genotipos, y podrían estar implicadas principalmente en el crecimiento del embrión. Aunque estas evidencias pueden considerarse como preliminares, es la primera vez que se postula la existencia de dos fracciones de GA en semillas, y un rol diferente para cada fracción. Esto destaca no solo la importancia del método de extracción usado sobre los resultados obtenidos, sino que además nos obliga a pensar en otras instancias de regulación adicionales a la regulación transcripcional, donde intervienen variables espaciales como la compartimentalización de las GA, y bioquímicas, como el pH del apoplasto.

Al inicio de esta tesis se postulaba un rol principal para las dioxigenasas solubles GA20oxidasas y GA-3b-hidroxilasa en la síntesis diferencial de GA en cariopses de IS9530 y RedlandB2. Sin embargo, los datos de expresión para dos de estos genes, *GA20oxidasas* 1 y 2 (el primero identificado previamente por Pérez-Flores *et al.* (2003), y el segundo durante esta tesis) indican que están regulados negativamente por producto, similar a lo que se ha observado para estos genes en otras especies (Hedden y Phillips, 2000; Ogawa *et al.*, 2003). El nivel de expresión alcanzado para ambos genes fue mayor en cariopses de IS9530 (que expresan mayor dormición y exhiben menor contenido de GA) comparando con RedlandB2, pero además su expresión tendió a disminuir en presencia de GA exógenas (Fig.2.8), mientras que se indujo en presencia de ABA (Fig. 4.2). Aunque la expresión de *SbGA-3b-OH* fue también mayor en cariopses de IS9530 que en RedlandB2, no se observaron otras evidencias que apoyen una regulación negativa para este gen (no respondió a manipulaciones del nivel de GA ó ABA). Paralelamente, los niveles de GA pueden ser regulados negativamente por la inactivación que es llevada a cabo por enzimas GA 2-oxidasas. De los cuatro genes putativos identificados *in silico* en sorgo granífero (*SbGA 2-oxidasas A, B, C y D*), se midieron por PCR exitosamente tres. La expresión de estos genes que codifican para GA2-oxidasas en RedlandB2 fue menor que en IS9530, y esto explicaría la acumulación de mayores niveles de GA1 y GA3 observada durante la incubación de cariopses de RedlandB2 por una menor tasa de inactivación de GA. Por el contrario, en cariopses inmaduros de IS9530 se observó una fuerte inducción de los genes *SbGA2oxA* y *SbGA2oxC*, y esto sería la causa de los bajos niveles de GA en estos cariopses. Sin embargo, por el momento no se detectaron los catabolitos correspondientes que permitan la confirmación de una mayor tasa de inactivación de GA en cariopses dormidos de IS9530. La inducción de la expresión de estos genes en presencia de ABA (Fig.4.2), así como su inhibición por GA (Fig.4.5), apoyan una regulación positiva de estos genes por ABA, y sugiere que la menor acumulación de GA observada en embriones aislados e incubados en ABA (Fig.4.1) sería la consecuencia de una mayor tasa de inactivación de GA. La presencia de elementos regulatorios asociados con la inducción por ABA (Fig.4.3), y también de un elemento presente en el promotor de genes inhibidos por GA ("GAdownAt"; Ogawa *et al.*, 2003) sugieren que la expresión de *SbGA2oxC* es un sitio clave en la regulación de los niveles endógenos de GA en cariopses de sorgo, y constituye además un vínculo con la vía de señalización del ABA que, a través de la inducción de este gen, reduce los niveles de GA y conduce a la inhibición de la germinación.

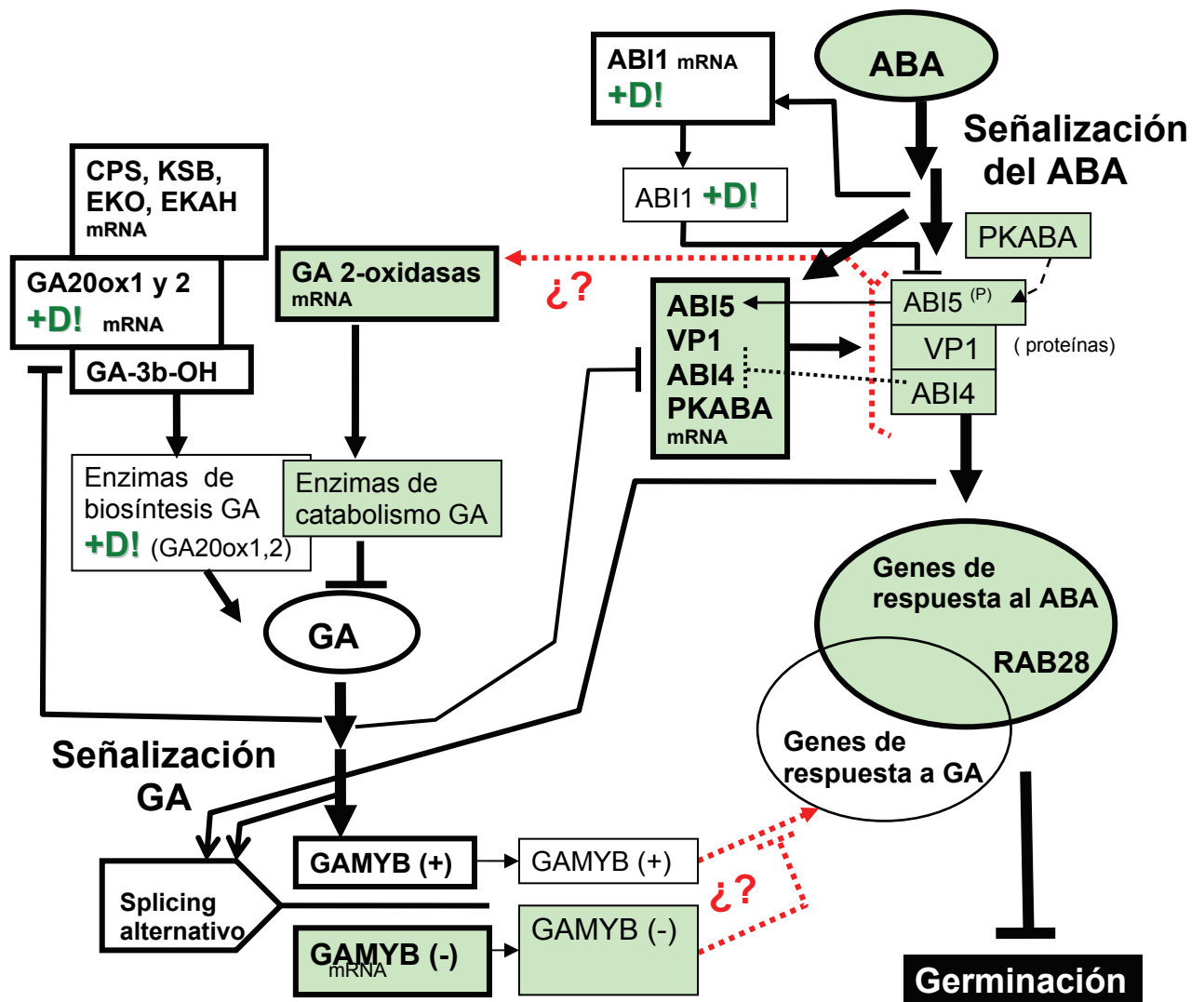
También se evaluó la posible participación del gen ortólogo *GAMYB* para sorgo en la expresión de la dormición. *GAMYB* es un factor de transcripción involucrado en la activación de genes inducida por GA durante la germinación y

fue ampliamente estudiado en cereales y especies de dicotiledóneas. Tanto la secuencia de aminoácidos de GAMYB como la estructura del gen (posición y tamaño de intrones y exones) están altamente conservados entre ortólogos de *Arabidopsis*, cebada, trigo y arroz (Gocal *et al.*, 2003), y esto se aplica a la secuencia putativa de sorgo identificada en este trabajo. Sin embargo, a diferencia de lo que se sabe en otras especies, en esta tesis se presentan evidencias de regulación por *splicing* alternativo para este gen en sorgo. Estas evidencias aún preliminares consisten en la obtención de varios productos de PCR de distinto tamaño (y cuyos tamaños coinciden con tamaños esperados por la retención de un intrón, ó la eliminación parcial o total de exones) y la presencia de un ESTcontig en PlantGDB en el cual se retiene parte de un intrón. Este es un gen de copia única en otros cereales, y en sorgo se encontró una secuencia única en PlantGDB. La proporción de diferentes especies de transcriptos parece estar regulada hormonalmente, ya que usando *primers* localizados en diferentes partes del gen (uno de ellos en una parte que es eliminada en uno de los productos de *splicing*) se obtuvieron patrones de expresión diferentes, y además fueron afectados diferencialmente por manipulaciones de los niveles de ABA y GA. Será necesario confirmar la identidad de los productos completos (incluyendo el primer exón) de GAMYB por *splicing* mediante su amplificación y secuenciación. Por el momento se postula que la inducción de genes de respuesta a GA mediada por GAMYB está afectada por un mecanismo de *splicing* alternativo que genera diferentes transcriptos. Futuros experimentos pondrán a prueba la relevancia fisiológica de estos transcriptos alternativos en el control de la transcripción inducida por GA.

Presentación de un modelo intergrando los componentes analizados y sus posibles roles en la expresión de la dormición

En el esquema de la pág.110 se muestran los componentes abordados en este trabajo, y su participación en la expresión de la dormición en cariopses embebidos. En los recuadros de marco grueso se destacan los genes cuya expresión se midió; los recuadros sombreados en verde indican los componentes que se encuentran activados en cariopses dormidos, y que contribuyen positivamente al bloqueo de la germinación. Otros componentes también se encuentran inducidos en cariopses dormidos, pero al contrario de los anteriores, su actividad regula negativamente la expresión de la dormición. Por ej., las fosfatasa tipo PP2C ABI1/ABI2 regulan negativamente la señal del ABA, y establecen un circuito de retroalimentación positiva que regula de manera negativa la señal del ABA (“*feedforward negative regulatory loop*”); el ortólogo de sorgo *SbABI1* parece actuar de esta misma forma. Los genes *SbGA20ox1* y *SbGA20ox2*, que participan en la biosíntesis de GA, también están inducidos en cariopses dormidos debido al menor contenido de GA las cuales intervienen en un mecanismo de regulación negativa de estos genes. Ambos mecanismos tienden a revertir la expresión de la dormición, a través de la disminución de la señalización del ABA y la mayor actividad de síntesis de GA. Sin embargo, su mayor expresión (y posiblemente actividad de las proteínas) no alcanzan a compensar los efectos de los otros procesos que ocurren simultáneamente, y que conducen a la reducción de los niveles de GA y a la mayor señalización del ABA, y el resultado de este balance favorece el bloqueo de la germinación. Los resultados de expresión de genes y GA activas sugieren que el menor contenido de GA en

cariopses dormidos es entonces una consecuencia de la alta actividad de las enzimas GA 2-oxidasas, y esta actividad catabólica prevalece sobre la actividad de síntesis aun cuando esta última esté aumentada por la des-represión de los genes de biosíntesis. Los datos presentados apoyan además una regulación a nivel transcripcional de las enzimas GA2oxidasas por el ABA, y la intensidad de esta inducción de la GA 2oxidasas fue mayor en IS9530, coherente con una mayor sensibilidad al ABA. El análisis de la secuencia del promotor de unos de estos genes (*SbGA 2-oxidasas*) mostró la existencia de numerosos elementos cis-regulatorios característicos de genes inducidos por ABA en otras especies, simultáneamente con elementos que otorgan especificidad para la expresión en la semilla. Esta posible interacción entre factores de transcripción como los candidatos ABI5, VP1 y ABI4 con el promotor del gen *SbGA 2-oxidasas*, se señala en el esquema con una línea punteada.



Esquema donde se muestran los componentes del balance ABA/GA abordados en este trabajo, y que tendrían un rol regulatorio en la expresión de la dormición en cariopses de sorgo. En los recuadros de color verde se muestran los componentes inducidos en el grano dormido y que bloquean la germinación. Los genes de biosíntesis de GA, *GA20oxidasa1* y 2, están inducidos cuando los niveles de GA son bajos. El gen *SbABI1* codifica para una putativa fosfatasa que regula negativamente la señal del ABA, y es inducible por ABA en *Arabidopsis*; su expresión es alta en cariopses dormidos. La presencia de transcritos diferentes para *SbGAMYB* sugiere un mecanismo de *splicing* alternativo que resulta en diferentes péptidos, cuyo rol fisiológico se desconoce aún. El ABA y las GA afectan las proporciones de distintos transcritos de *SbGAMYB*. Las líneas punteadas de color rojo describen posibles interacciones planteadas en base a los resultados obtenidos, y que serían relevantes para el control de la germinación: 1) la inducción de *SbGA2oxC* por los factores de transcripción ABI5, ABI4 y VP1 en respuesta al ABA, y 2) la existencia de diferentes formas de GAMYB con funciones antagónicas originadas mediante un proceso de *splicing* alternativo, controlado hormonalmente.

La estructura y función de la mayoría de los componentes analizados en sorgo están conservadas con respecto a otras especies, aunque para algunos de ellos se detectaron formas de regulación novedosas.

Aunque *SbABI* no se asoció con la baja sensibilidad al ABA de los embriones de RedlandB2, los patrones de expresión están de acuerdo con un modelo de regulación por retroalimentación positiva de este gen por ABA, descrito en *Arabidopsis* y *Fagus sylvatica*. De manera similar a lo observado para *SbABI1*, la expresión de *SbABI5* también se indujo por ABA, demostrando que la regulación de este factor de transcripción está conservada en sorgo con respecto a otras especies. Esta inducción fue relativamente mayor en IS9530 con respecto a RedlandB2, de acuerdo con la mayor sensibilidad al ABA, y también se indujo en respuesta al ABA. De manera similar a lo que se esperaba al inicio de esta tesis y en base a la función conocida para PKABA1 y VP1 en otras especies, estos dos componentes se expresaron más en cariopses dormidos de IS9530. Adicionalmente, los genes del metabolismo de GA también muestran una regulación similar a lo que se había descrito para otras especies; las diferentes mediciones en sorgo apoyan un mecanismo de inhibición por producto para genes del metabolismo de GA, similar a lo que ocurre en otras especies.

Estos resultados en general muestran que los componentes analizados están conservados entre sorgo y otras especies a nivel de secuencia y en general también en su regulación, aunque se encontraron también situaciones donde algunos componentes están regulados de manera diferente en sorgo, o al menos aún no se han identificado estos mecanismos en otras especies. Por ejemplo, *SbGAMYB*, que codifica para un factor de transcripción putativo que controla la inducción de genes por GA en diferentes especies (con identidad >90% con los genes ortólogos de arroz y cebada), parece estar regulado de manera muy diferente en sorgo, involucrando un mecanismo de *splicing* alternativo. Otro componente analizado en sorgo que mostró una alta identidad con sus ortólogos pero a la vez una regulación que no se observó para otras especies, es el factor de transcripción *SbABI4*; en la región regulatoria de este factor se encontró un elemento conservado también en maíz, *Arabidopsis* y otras especies, y que estaría implicado en una forma de regulación negativa por la proteína ABI4 según Niu *et al.*, (2002). En esta tesis se observó que la relación entre la expresión de *SbABI4* y la dormición mostró una fuerte interacción con la temperatura de incubación. Teniendo en cuenta estas observaciones en sorgo y la existencia de otro factor de transcripción del mismo tipo (AP2) cuya unión al ADN depende de la temperatura, se postula la hipótesis de una participación de *SbABI4* en la modulación de la expresión de la dormición por la temperatura. Finalmente, la promoción del catabolismo de GA por acción del ABA descrita en este sistema tampoco fue informada para otras especies, así como tampoco la existencia de dos fracciones de GA, una extraíble a pH neutro y asociada con el crecimiento del embrión resultado de la germinación, y otra formando parte de complejos reversibles solamente a pH ácido (3.0) y que no se asoció con la germinación. Estos resultados indican que aunque los actores involucrados en las vías de señalización y de metabolismo de hormonas como el ABA y las GA están altamente conservados entre sorgo y otras especies, la forma en que algunos de estos actores están regulados puede variar sustancialmente de una especie a otra.

Aporte de los datos generados en este trabajo de tesis para la búsqueda de resistencia al BPC en sorgo.

En cuanto al aporte de los conocimientos generados en esta tesis a la búsqueda de una solución al problema del brotado pre-cosecha, se pueden destacar algunos de los componentes analizados como posibles sitios para la manipulación genética en la búsqueda de aumentar la resistencia al BPC. A lo largo de este trabajo se pudo constatar la observación general de que los componentes de las vías de señalización de ABA y del metabolismo de GA guardan una alta identidad con los de otras especies más estudiadas, y que varios de estos componentes están regulados de manera diferente durante la expresión de diferentes niveles de dormición en semillas de sorgo provenientes de genotipos con susceptibilidad contrastante al BPC. De estos componentes, los genes que codifican para enzimas GA 2-oxidasas parecen ser sitios clave en la regulación negativa de los niveles de GA, mientras que la diferente producción de GA en cariopses de IS9530 y RedlandB2 no se asoció positivamente con la expresión de los genes para las GA2-oxidasas ni con otras enzimas de la biosíntesis de GA. Sin embargo, la mayor expresión de algunas de estas enzimas podría estar implicada en la salida de la dormición observada entre 30 y 42 DPA ya que su expresión aumentó entre estos momentos del desarrollo. De estos genes, los que codifican para enzimas GA 2-oxidasas aparecen como posibles candidatos para su manipulación a nivel molecular con el objetivo de lograr mayor resistencia al BPC. Sin embargo, y esto se aplica a los demás genes estudiados, la regulación de estos genes es compleja, ya que son componentes clave implicados en la acción de dos hormonas que afectan prácticamente todos los procesos en la planta además de su acción en la semilla, y por lo tanto están afectados por numerosos factores regulatorios, algunos de los cuales solamente actúan en etapas específicas del desarrollo. La expresión de varios de estos genes de manera ectópica podría tener consecuencias en otros procesos de la planta además de la dormición de las semillas; la sobreexpresión de alguno de estos genes de manera específica en la semilla puede lograrse mediante un promotor que cuente con elementos que le otorguen especificidad para ese estadio.

Diferentes componentes de la señalización del ABA fueron analizados en este trabajo, y todos estuvieron regulados de manera diferente en semillas en ambos genotipos de sorgo y en relación con el nivel de dormición expresado. Según se ha demostrado en maíz, ABI4 se expresa solamente en la semilla, a diferencia de *Arabidopsis* donde ABI4 también se expresa en tejidos vegetativos. Debido a la cercanía filogenética del sorgo con el maíz, ABI4 podría ser un componente también específicamente localizado en la semilla, y necesario para dar especificidad en la semilla a la acción de otros componentes más ubicuos, como ABI5. Aunque ABI3/VP1 se expresa en todos los tejidos de la planta en *Arabidopsis*, maíz y otras especies estudiadas, este FT también tiene funciones específicas en la semilla en maíz, ya que el mutante *vp1* de maíz no tiene efectos adicionales al fenotipo de semilla vivípara, al contrario del mutante *abi3* de *Arabidopsis* que presenta efectos pleiotrópicos en el desarrollo de la semilla y en tejidos vegetativos de la planta, aunque esto depende del dominio afectado por la mutación. ABI3/VP1 tiene varios dominios, y cada uno de ellos asociado con funciones específicas que pueden ser de represión (para genes inducibles por GA, como alfa-amilasa) ó inducción (para genes de proteínas LEA). Sin embargo, el análisis de la secuencia de SbVP1 no mostró diferencias entre las dos líneas de

sorgo estudiadas (Carrari *et al.*, 2001a). La aparente co-regulación de los factores de transcripción analizados, y también PKABA, parece sugerir que estos son genes que codifican para componentes “efectores” que están bajo el control de otro factor “aguas arriba”, y cuya actividad origina la diferente señalización del ABA en ambos genotipos de sorgo. Sin embargo, es posible plantear estrategias que consideren la manipulación de alguno de estos componentes “efectores” a través de su sobreexpresión localizada en la semilla como una forma de lograr una mayor resistencia al BPC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baskin JM, and C.C Baskin (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.*, 14: 1–16.

Batlla, D. and R.L. Benech-Arnold (2003) A quantitative analysis of dormancy loss dynamics in *Polygonum aviculare* seeds. Development of a thermal time model based on changes in seed population thermal parameters. *Seed Sci. Res.*, 13:55-68.

Benech-Arnold, R.L., Fenner, M., and P.J. Edwards (1991) Changes in germinability, ABA levels and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* induced by water stress under grain filling. *New Phytol.*, 118:339-347.

Benech-Arnold R.L., Kristof, G., Steinbach, H., and R.A. Sánchez (1995) Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in *Sorghum* varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility. *J.Exp. Bot.* 46:711-718.

Benech-Arnold, R.L., Giallorenzi, M.C., Frank, J., and M.V. Rodríguez (1999) Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Sci. Res.*, 9:39-47.

Benech-Arnold, R.L., Enciso, S., Sánchez, R.A., Carrari, F., Pérez-Flores, L., Iusem, N.D., Steinbach, H., Lijavetzky, D., and R. Bottini (2000) en *Seed Biology: Advances and Applications*. Black M., Bradford KJ., and Vázquez-Ramos J. Eds. Pp 101-111. CABI Publishing 2000.

Benech-Arnold, R.L., Enciso, S., Sánchez, R.A., and M.V. Rodríguez (2003) On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum caryopses. *New Phytol.*, 160: 371-377.

Benech-Arnold, R.L.; Gualano, N.; Leymarie, J.; Côme, D and F. Corbineau (2006) Hipoxia interfiere con el metabolismo de ABA y aumenta la sensibilidad a ABA en embriones de granos de cebada dormantes. *Jour of Exp Bot.*, 57:1423 – 1430.

Borrell, A., Cutanda, M.C., Lumbreras, V., Pujal, J., Goday, A., Culiáñez-Macià, F.A., and M. Pagès (2002) *Arabidopsis thaliana* AtRab28: a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance. *Plant Mol Biol.*, 50 (2):249-59.

Bradford KJ, Chen F, and M.B. Cooley (2000) Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos J, eds. *Seed biology advances and applications*. United Kingdom: CABI Publishing, 231-251.

Brocard-Gifford, I.M, Lynch, T.J., and R.R. Finkelstein (2003) Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiol.*, 131(1):78-92

Buchanan, B.B., Gruisem, W., and R.L. Jones (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. USA. Pp.95.

Busk, P.K., and M. Pages (1998) Regulation of abscisic acid induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37:425–435.

Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W.M., and W.E. Finch-Savage (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seed during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant Journal*, 46: 805–822.

Carrari, F., Perez-Flores, L., Lijavetzky, D., Enciso, S., Sánchez, R.A., Benech-Arnold, R.L., and N.D. Iusem (2001a) Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize vp1. Its potential involvement in pre-harvest sprouting resistance. *Plant Mol Biol*, 45:631-640.

Carrari, F., Frankel, N., Lijavetzky, D., Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., and N.D. Iusem (2001b) The TATA-LESS promoter of Vp1, a plant gene controlling seed germination. *DNA Sequence*, 12:107-114.

Carrari, F., Rodríguez, M.V., Iusem, N.D., y R.L. Benech-Arnold (2002) La naturaleza de la distinta sensibilidad al ABA en embriones de sorgo granífero de dos líneas con susceptibilidad contrastante al brotado precosecha. . XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal. 22 a 25 de Octubre de 2002, Punta del este, Uruguay.

Carrari, F., Benech-Arnold, R.L., Osuna-Fernandez, H.R., Hopp, E., Sánchez, R.A., Iusem, N.D. and D. Lijavetzky (2003) Genetic mapping of the *Sorghum bicolor* vp1 gene and its relationship with pre-harvest sprouting resistance. *Genome*, 46:253-258.

Castor, L. and R. Frederiksen (1977) Seed moulding of grain *Sorghum* caused by *Fusarium* and *Curvularia*. *Proc. of the Ann. Phytop. Soc.*, 4:151.

Chen, F., Dahal, P., and K.J. Bradford (2001) Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiol.*, 127(3):928-36.

Cordonnier-Pratt, M.M. Laboratory for Genomics and Bioinformatics The University of Georgia, Department of Plant Biology Plant Sciences Building, Rm. 2502, Athens, GA 30602-7271, USA tel: 706 542 1860.
<http://fungen.botany.uga.edu/Sorghum.htm>

Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., and G. Vachon (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 136:3660–3669.

Dahal, P., Argyris, J., and K.J. Bradford (2007) Differential expression of gibberellin, ABA and ethylene biosynthesis genes is associated with lettuce thermodormancy. En: Abstracts of the 2nd workshop on molecular aspects of seed dormancy and germination. Eds.: D.Rodríguez y O.Lorenzo. 1-4 Julio, Salamanca, España. Pp.13.

Dewar, J., Taylor, J.N.R., and P. Berjak (1998) Changes in selected plant growth regulators during germination in sorghum. *Seed Sci. Res.*, 8(1):1-8.

Dirksen, W.P., Sun, Q., and F.M. Rottman (1995) Multiple Splicing Signals Control Alternative Intron Retention of Bovine Growth Hormone Pre-mRNA. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 270(10):5346-5352.

- Eisenberg, A. and J. Mascarenhas (1985) Abscisic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta*, 166:505-514.
- Ezcurra, I., Ellerström, M., Wycliffe, P., Stålberg, K., and L. Rask (1999) Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.*, 40: 699–709.
- Finch-Savage, W.E., and G. Leubner-Metzger (2006) Seed dormancy and the control of germination. *Tansley Review - New Phytol.*, 171:501-523.
- Finkelstein, R.R., Tembargo, K., Shumway, J. and M. Crouch (1985) Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol.* 78:630-636.
- Finkelstein R.R. and T.J. Lynch (2000) The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *The Plant Cell*, 12:599–609
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., and C.D. Rock (2002) Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, (Supplement 2002):S15-S45.
- Fleck B, and N.P. Harberd (2002) Evidence that the Arabidopsis nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *Plant J.* 32(6):935-47.
- Gaskin, P., Gilmour, S.J., MacMillan, J., and V.M. Sponsel (1985) Gibberellins in immature seeds and dark-grown shoots of *Pisum sativum*. Gibberellins identified in the tall cultivar Alaska in comparison with those in the dwarf Progress No. 9. *Planta*, 163: 283-289.
- Gilmour, S., Zeevart, A., Schwenen, L., and J. Graebe (1986) Gibberellin metabolism in cell-free extract from spinach leaves in relation to photoperiod. *Plant Physiol.*, 82: 190-195.
- Gocal, G.F., Sheldon, C.C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D.J., MacMillan, C.P, Li, S.F., Parish, R.W., Dennis, E.S., Weigel, D. and R.W. King. (2001) GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 127(4):1682-1693.
- Gómez-Cadenas A, Zentella, R., Walker-Simmons, M.K., and T-HD Ho (2001) Gibberellin / ABA antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signalling molecules. *Plant Cell*,13:667–679.
- Gonzalez-García, M.P., Rodríguez, D., Nicolas, C., Rodríguez, P.L., Nicolas,G. and O. Lorenzo (2003) Negative Regulation of Abscisic Acid Signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 Plays A Role in Seed Dormancy Regulation and Promotion of Seed Germination. *Plant Physiol.*, 133:135–144.
- Groot, S., and C. Karssen (1992) Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds: studies with the sitiens mutant. *Plant Physiol.*, 99:952-958.
- Gualano, N., Carrari, F., Rodríguez, M.V., Pérez-Flores, L., Sánchez, R.A., Iusem N.D. and R.L. Benech-Arnold (2007) Reduced embryo sensitivity to ABA in sprouting susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with an altered ABA signalling. *Seed Sci. Res.* 17(2):81-90.

- Gubler, F., Kalla, R., Robert, J.K., and J.V. Jacobsen (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for MYB transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell*, 7:1879–1891.
- Gubler, F., Watts, R.J., Kalla, R., Matthews, P., Keys, M., and J.V. Jacobsen (1997) Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GAMyb. *Plant Cell Physiol.*, 38(3):362-5.
- Hedden, P. and A.L. Phillips (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 5:523-530.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research* Vol.27 No.1 pp. 297-300. (Reference to PLACE database).
- Hillhorst, H. (1995) A critical update on seed dormancy. I Primary dormancy. *Seed Sci. Res.* 5: 61-73.
- Himmelbach, A., Yang, Y., and E. Grill (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Current opinion in plant biology*, 6:470-479.
- Hoecker, U., Vasil, I.K., and D.R. McCarty (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes Dev.*, 9 (20):2459-69.
- Hofmann, P. and A. Steiner (1994) Seed quality as cause for differences in longevity behaviour after seed pretreatment in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Sci. Res.* 4: 323-328.
- Hoisington, D., Khairallah, M., and D. González de León (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT, 2nd ed México D.F., México.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D. and M.K. Walker-Simmons (2002) The Abscisic Acid-Responsive Kinase PKABA1 Interacts with a Seed-Specific Abscisic Acid Response Element-Binding Factor, TaABF, and Phosphorylates TaABF Peptide Sequences. *Plant Physiol*, 130: 837-846.
- Jones, H.D., Peters, N.C.B., and M.J. Holdsworth (1997) Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the viviparous 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *Plant J.* 12 (4): 911-920.
- Karszen, C., Brinkhorst-van der Swan, D., Breekland, A., and M. Koorneef (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L) Hynh. *Planta* 157:158-165.
- Keith, B. and L. Rappaport (1987) In vitro gibberellin A1 binding in *Zea mays* (L). *Plant Physiol.*, 85:934-941

- Kermode, A.R. (1995) Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. *In* J Kigel, G Galili, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp 273-332.
- Khan, A. (1982) Gibberellins and seed development. *In*: A. Khan, ed. *The Physiology and Biochemistry of Seed Development Dormancy and Germination*. Elsevier Amsterdam. 111-135.
- King, R. (1982) Abscisic acid in seed development. *In*: Khan, A., ed. *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 157-81.
- Koornneef, M., Reuling, G., and C.M. Karsen (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 61:377-383.
- Kuhn, J.M., and J.I. Schroeder (2003) Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:463-469.
- Lange, T. (1998) Molecular biology of gibberellins synthesis. *Planta* 204: 409-419.
- Lescot, M., Déhais, P., Moreau, Y., De Moor, B., Rouzé, P. and S. Rombauts (2002) PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, Database issue, 30(1):325-327.
- Lijavetzky, D., Martinez, C., Carrari, F., and E. Hopp (2000) Pre-harvest sprouting resistance in sorghum is controlled by just two major QTLs showing epistatic effects. *Euphytica*, 112:125-135.
- Li, B. and M.E. Foley (1995) Cloning and characterization of differentially expressed genes in imbibed dormant and afterripened *Avena fatua* embryos. *Plant Mol. Biol.*, 29: 823-831.
- Li H., Shen J.J., Zheng Z.L., Lin Y., and Z. Yang (2001) The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 126, pp. 670–684.
- Liu X., Yue Y., Li B., Nie Y., Li W., Wu W-H., and L. Ma (2007) A G Protein–Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. *Science*, 315:1712-1716.
- Loke J.C., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C., and Q.Q. Li. (2005) Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol.* 138:1457-1468.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., and N.H. Chua (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *PNAS*, 98 (8): 4782–4787.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Kinoshita, N., and N-H.Chua (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes and Development*, 17:410–418.

Mares, D.J. (1998) Proceedings of the Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals 1998. D.Weipert, ed. Pp. 77-81

McCarty, D.R., Carson, C.B., Stinard, P.S., and D.S. Robertson (1989) Molecular analysis of viviparous-1: an ABA insensitive mutant of maize. *Plant Cell*, 1: 523-532.

McKibbin R., Wilkinson M.D., Bailey, P.C., Flintham, J.E., Andrew, L.M., Lazzeri, P.A., Gale, M.D., Lenton, J.R., and M. Holdsworth (2001) Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *PNAS*, 99(15): 10203-10208.

Merlot, S., Gosti, F., le Guerrier, D., Vavasseur, A. and J. Giraudat (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant J.*, 25(3): 295-303.

Neill, S. and A. Rees (1987) Seed development and vivipary in *Zea mays* L. *Planta* 171:358-364.

Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and E. Nambara (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal*, 41(5): 697.

Nakamura, S., Lynch, T.J., and R.R.Finkelstein (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 26: 627–635.

Nakashima K., Fujita, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., and K.Yamaguchi-Shinozaki (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 60: 51–68.

Nambara, E., and A. Marion-Poll (2003) ABA action and interaction in seeds. *Trends in Plant Science*, 8 (5): 213-217.

Nutbeam, A.R., and D.E., Briggs (1982) Gibberellin-phenol interactions in plant extracts. *Phytochemistry*, 21(9):2217-2224.

Niu, X., Helentjaris, T., and J. Bate (2002) Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *The Plant Cell*, 14: 2565-2575.

Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., and S. Yamaguchi (2003) Gibberellin Biosynthesis and Response during *Arabidopsis* Seed Germination. *The Plant Cell*, 15: 1591–1604.

Pérez-Flores, L.J., Carrari, F., Osuna-Fernández, H.R., Enciso, S., Stanelloni, R., Sánchez, R.A., Bottini, R., and R.L. Benech-Arnold (2003) Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. *J Exp Bot*, 54 (390): 2071-2079.

Phillips, A., Ward, D., Uknes, S., Appleford, N., Lange, T., Huttly, A., Gaskin, P., Graebe, J. and P. Hedden (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 108: 1049-1057.

Quattrano, R., Ballo, B., Williamson, J., Hamblin, M. and M. Mansfield (1983) ABA controlled expression of embryo-specific genes during wheat grain development. In: Goldberg, R. ed. *Plant Molecular Biology*. NY: Liss Inc., Pp. 243-353.

Raz V., Bergervoet J.H.W., and M. Koornneef (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, 128: 243-252.

Razem F.A., A. El-Kereamy, S.R. Abrams and R.D. Hill (2007) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, 439(19):209-294.

Rock, C. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.*, 148: 357–396

Rodriguez M.V., Gualano N. y R.L. Benech-Arnold (2002) Modulación de la sensibilidad del embrión al ABA por las cubiertas (endosperma + pericarpio) durante el desarrollo en cariopses de sorgo granífero. . XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal. 22 a 25 de Octubre de 2002, Punta del este, Uruguay.

Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G.K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Gitano H., Ashikari M. and M. Matsuoka (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 134:1642–1653,

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shen, Q.J., Casaretto, J.A., Zhang, P., and T.H.D. Ho (2004) Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Mol Biol*. 54: 111–124.

Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., Kristof, G., Sánchez, R.A., and Marcucci-S. Poltri (1995) Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting-resistant and sprouting-susceptible varieties. *J. Exp. Bot.*, 46:701-709.

Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., and R.A. Sánchez (1997) Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum sedes. *Plant Physiol.*, 113:149-154.

Suzuki, M., Ketterling, M.G., Li, Q-B., and D.R. McCarty (2003) Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiol.*, 132: 1–14.

Tamura, N., Yoshida, T., Tanaka, A., Sasaki, R., Bando, A., Toh, S., Lepiniec, L., and N. Kawakami (2006) Isolation and characterization of high temperature-resistant germination mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 47(8):1081-94.

Thomas, S.G., Phillips, AL., and P. Hedden (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *PNAS*, 96: 4698–4703.

Tomoaki S., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., and M. Matsuoka (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.*, 134:1642-1653.

Tomoyasu T., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Inoue, Y., and Y. Kamiya (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol*, 118:1517-1523.

Triplett, B. and Quattrano, R. (1982) Timing, localization and control of wheat germ agglutinin synthesis in developing wheat embryos. *Dev. Biol.*, 91: 491-496.

Ullah, H., Chen, J.G., Wang, S., and A.M. Jones (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol.*, 129(2): 897-907.

Visser, K, Vissers, A., Cagirgan, M., Kijne, J., and M. Wang (1996) Rapid germination of a barley mutant is correlated with a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo. *Plant Physiol.*, 111: 1127-1133.

Walker-Simmons M.K. (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting-resistant and -susceptible cultivars. *Plant Physiol.*, 84: 61-66.

Washio K. (2003) Functional Dissections between GAMYB and Dof Transcription Factors Suggest a Role for Protein-Protein Associations in the Gibberellin-Mediated Expression of the RAMY1A Gene in the Rice Aleurone. *Plant Physiol*, 133: 850–863.

White, C.N., Proebsting, W.M., Hedden, P., and C.J. Rivin (2000 a) Gibberellins and Seed Development in Maize. I. Evidence That Gibberellin/Abscisic Acid Balance Governs Germination versus Maturation Pathways. *Plant Physiol.*, 122: 1081–1088.

White, C.N., and C.J. Rivin (2000 b) Gibberellins and Seed Development in Maize. II. Gibberellin Synthesis Inhibition Enhances Abscisic Acid Signaling in Cultured Embryos. *Plant Physiol.*, 122: 1089–1097.

Xue, G-P. (2003) The DNA binding activity of AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *The Plant J.*, 33:373-383.

Yamaguchi, S., and Y. Kamiya (2002) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *J. Plant Growth Regul.*, 20: 369–376.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.*, 10: 88–94.

Yamauchi, W.Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and S. Yamaguchi (2004) Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds. *The Plant Cell*, 16: 367–378.

Yazaki, J., Shimatani, Z., Hashimoto, A., Nagata, Y., Fujii, F., Kojima, K., Suzuki, K., Taya, T., Tonouchi, M., Nelson, C., Nakagawa, A., Otomo, Y., Murakami, K. Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and S. Kikuchi (2004) Transcriptional profiling of genes responsive to abscisic acid and gibberellin in rice: phenotyping and comparative analysis between rice and *Arabidopsis*. *Physiol. Genomics*, 17(2):87-100.

Zou, M., Guan, Y., Ren, H., Zhang, F., and F. Chen (2007) Characterization of alternative splicing products of bZIP transcription factors OsABI5. *Biochemical and biophysical research communications*, 360: 307-313.

ANEXO

INDICE

Contenidos	Nº de página
Primera parte: Alineamientos de proteínas de sorgo y otras especies	1
TABLA A-1. Genes candidatos y secuencias de sorgo.	2
TABLA A-2. Primers para pcr en tiempo real.	3
Fig.A-1 a A-13	4 – 16
Segunda parte: Expresión relativa a <i>Actina</i> para los genes candidatos en base a los valores de Ct	17
Tabla A-3	18
Fig. A-14	20
Tabla A-4	20
Tercera parte: Análisis de secuencias de <i>SbGAMYB</i>	21
Secuencias de sorgo para GAMYB	21
Fig.A-15: Esquemas de plantGDB	23
Fig.A-16: Dominios conservados en <i>SbGAMYB</i>	24
Cuarta parte:	
Análisis de la región promotora de <i>SbABI4</i> y <i>SbGA 2oxidasaC</i>	
Identificación de la región promotora de <i>SbABI4</i> . Secuencia completa del gen.	25
Identificación y análisis de la región promotora de <i>SbGA 2oxidasaC</i> .	26

ANEXO. PRIMERA PARTE.

En la primera parte de este Anexo se detallan los códigos para las secuencias de sorgo correspondientes a los genes candidatos y que fueron identificadas durante este trabajo de tesis. Las mismas se obtuvieron mediante una búsqueda *in silico* en la base de datos de sorgo de PlantGDB (ver Metodología). Se presentan además los alineamientos con proteínas de referencia. En la Tabla A-1 se indica para cada gen candidato: la clase de secuencia encontrada (EST-mRNA, GSS-ADN genómico) en PlantGDB y que codifica para el ortólogo putativo de sorgo; el código de acceso para estas secuencias en PlantGDB, y el nº de página para cada Figura (A-1 a A-13) donde se muestran los alineamientos con secuencias de referencia de otras especies y en algunos casos, secuencias homólogas de sorgo. En la Tabla A-2 se presentan las secuencias de los “*primers*” usados en las reacciones de PCR en tiempo real. Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa Clustal Wallis 1.8 (LALIGN Server, <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y luego se procesaron con el programa Boxshade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Anexo: Primera parte.

TABLA A-1. Secuencias identificadas para sorgo con alta identidad con los genes candidatos estudiados en esta tesis.

Nombre del gen en sorgo	Tipo de secuencia	Código PlantGDB	Alineamiento (N° de Fig. y pág.)
<i>SbABI5</i>	GSScontig + EST	SbGSStuc11-12-04.5065.1	Fig.A-1 (Pág.4)
<i>bZIP (16042)</i>	GSScontig + EST	SbGSStuc11-12-04.16042.1	
<i>bZIP (70604)</i>	GSS contig + EST	SbGSStuc11-12-04.70604.1 EST:34445268	
<i>bZIP (48312)</i>	GSS contig	SbGSStuc11-12-04.48312.1	
<i>SbPKABA</i>	GSScontig +EST (PUT contig)	SbGSStuc11-12-04.16891.1 + PUT-157a-Sorghum_bicolor- 30348924	Fig.A-2 (Pág.5)
<i>SbPKABA (b)</i>	EST (PUT contig)	PUT-157a-Sorghum_bicolor- 10848926	
<i>SbABI4</i>	GSScontig +ES T	SbGSStuc11-12-04.6057.1	Fig.A-3 (Pág.6)
<i>SbABI1</i>	GSS contig + EST PUT contig	SbGSStuc11-12-04.5746.1 + PUT-157a-Sorghum_bicolor-31814	Fig.A-4 (Pág.7)
<i>SbRAB28</i>	GSS contig + EST PUT contig	SbGSStuc11-12-04.7638.1 + PUT- 153a-Sorghum_bicolor-62151485	Fig.A-5 (Pág.8)
<i>SbCPS</i>	GSS contig	SbGSStuc11-12-04.21980.1	Fig.A-6 (Pág.9)
<i>SbKSB</i>	EST singlet	EST SA1_10_H05.b1_A002 gi 31331270 gb CD425007.1 [31331270]	Fig.A-7 (Pág.10)
<i>SbEKO</i>	GSS contig + EST PUT contig	GSS_SbGSStuc11-12-04.75629.1 y el EST45964370.1 del PUT-150a- Sorghum_bicolor-2391	Fig.A-8 (Pág.11)
<i>SbEKAH</i>	GSS contig + EST PUT contig	SbGSStuc11-12-04.6084.1 + PUT- 157a-Sorghum_bicolor-39184	Fig.A-9 (Pág.12)
<i>SbGA20ox1</i>	GSS contig + EST	SbGSStuc11-12-04.6172.1	Fig.A-10 (Pág.13)
<i>SbGA20ox2</i>	GSS contig + EST	SbGSStuc11-12-04.10330.1	
<i>SbGA-3b-OH</i>	GSS contig + EST PUT contig	SbGSStuc11-12-04.1819.1 + PUT-157a-Sorghum_bicolor-882	Fig.A-11 (Pág.14)
<i>SbGA 2-ox A</i>	GSS contig	SbGSStuc11-12-04.14304.1	Fig.A-12 (Pág.15)
<i>SbGA 2-ox B</i>	EST PUT contig	PUT-157a-Sorghum_bicolor-8546	
<i>SbGA 2-ox C</i>	GSS contig	SbGSStuc11-12-04.29476.1	
<i>SbGA 2-ox D</i>	GSS contig	SbGSStuc11-12-04.48717.1	
<i>SbGAMYB</i>	GSScontig + EST PUT	SbGSStuc11-12-04.10216.1 / PUT-157a-Sorghum_bicolor-3768	Fig.A-13 (Pág.16)

TABLA A-2. PRIMERS PARA PCR EN TIEMPO REAL

NOMBRE GEN	FW	REV
ABI5	GCAGCAGACAATGCTGTTTCC	GCAGCGGAGGCACCAA
BZIP16042	CCGCGGCCGATTCAG	CCCCAAAGTTGCCGAAGAA
BZIP70604	CAAGGATTTCCGGCTCCATGA	CCTCCGCGGTCCAGATG
BZIP48312	CGCACGCTCAGCCAGAA	CGGTGAAGCCCACGATCT
SBPKABA	CACGCTCTACGTCATGCTCG	TCTTTTGGATCCTCGAACGG
ABI4	GATCAGCAGCAGCCTTCTTAATT	AAACTTCAAACCGACCAAGCA
ABI1	CGAATGAAGAGGCATGCAAA	TGCGACACCATTGTTCTTGTG
VP1	ACATCGACCAGATCCTCGAC	CCAGAACGGGTTTCTCTTCA
RAB28	GAGAGGCACACCCAAATCTC	CCTCTGGCTCATTGTCAAGC
CPS	CCACCCACGCCGATCA	GGGCGATGCTAAGATCAATGA
KSB	CGGTGATCAATGAGCCACTAAAG	CCTCCCTCTCCACACAACA
EKO	TGGACAAATCTTGGAGGCACTA	AACGCGGTGTTCCATGAGA
EKAH	TGCGGCTCGTCAACATCTC	GCAGCTTACCGTTCACGAAGA
GA20 ox 1	CGCTTCGCGTCCAAGCT	GCCCTGGTCGTCCGAGTAG
GA20 ox 2	CACGCTGCAGGTCGATCTC	GCATCGGTATCGCAAAATGA
GA3-b-OH	GAGGCGGAGCGGAGGAT	GCACCGAGGGTACCAGTTGA
GA2 ox A	CGGCACAGGGTAATTGCAA	GGCGCAGCGAAGTAGATTG
GA2 ox B	CAACGTCGGTGATCTCCTTCA	ACCCTGTGCCGGATGCT
GA2 ox C	CACGAGGAGTACACAAGCACACA	GGGCAAGCACGCTGAGAA
GA2 ox D	TAGCTGGCCTAGCCATGCA	CCTGTGTGTCGTCTGTAAAGC
GAMYB (E2)	TCTGGGAAGAACCAACAACC	GGAGTGGATTCCGTCAAAGA
GAMYB (E3)	TCATGGAAGGCCTCATTGATT	CACCTGCACGCCCTCAAG
SB ACTINA	GCCGTCCTCTCTGTATGC	CGAGCTTCTCCTTCATGT

Los *primers* fueron diseñados con los siguientes programas: “Primer3” (GAMYB(E2); VP1 y *Actina*; amplicones entre 100 y 200 nt), y los demás *primers* con el “Primer Express”, de Applied Biosystems. Este último programa priorizó un tamaño de amplicón de 50 nt. En cada caso se hizo una primer reacción de PCR con cDNA como templado, y se corrió el producto en gel de agarosa 1,5 % con EtBr para verificar el tamaño de un único producto y que tuviera el tamaño esperado, además de observar un solo pico en la curva de disociación (*melting curve*) al final de la PCR en tiempo real. Cada banda fue eluida del gel y purificada mediante un kit (Nucleospin extraction kit, Macherey-Nagel, Alemania) y el producto obtenido se usó para preparar diluciones seriadas (hasta 1.10^{-10} , 1ml de cada una). Cinco de estas diluciones se usaron como curva patrón para las mediciones posteriores.

```

SbABI5-5065.1 1 ----GGRRESGMNFPGGSGRRQQQEPHELPPMTPLFLARQGSVYSLTFDEFQSSLG----
HvABI5 1 -----MDFRSSNGSSSERRPAEAG--ASLTRQGSYLSLTFEEFQSTLG----
OsABI5 1 -----MDFPGGSGRQQQ----LPPMTPLFLARQGSVYSLTFDEFQSTLG----
AtABI5 1 MVTRETKLTSEREVESSMAQARHNGGGGGENHPFTSLGRQSSYLSLTLDEFQHALCE----
BZIP-16042.1 1 -----EEEEEEVRGVMDPKDGERMGAAGPGLSRQGSYLSLTFDEFQNTLG----
BZIP-70604.1 1 -----GGREGMEFKNWGSSSRPAAVVVDEGQPLARQGSVYSLTFDEFQSLGGAAT
BZIP-48312.1 1 -----LARQGSVYSLTFDEFQSTLG----

SbABI5-5065.1 53 -----G-AAKDFGSMNMDLRLRSIWSAEELHNVAAN-----ASAADHAAHAAR---
HvABI5 43 GGAGVGGGDLGKDFSSMNMDLRLRSIWTAEESQAMAAS-ASGAG-----AGAP---
OsABI5 41 -----G-VGKDFGSMNMDLRLRSIWTAEESHAVGAATTTTATTASVAAAEHAAV---
AtABI5 58 -----NGKNFGSMNMDLRLRSIWNAAENNNNQOAAAAAGSHSVPANHNGFNNNNN
BZIP-16042.1 47 -----GMGGGLGKDFGSMNMDLRLRSIWTAEESQATASASASASASAAAGAGAPVGD---
BZIP-70604.1 53 GGGGGGSGGIPKDFGSMNMDLRLRSIWTAEETQAMASASAAAG-----AGMP---
BZIP-48312.1 21 -----AGATKDFGSMNMDLRLRSIWTAEESNAMATAAPTTPAASVDAHARAQQQQQT

SbABI5-5065.1 95 -----ASSLQROGS-LTLPRTLSQKTVEVWRDLVVCV
HvABI5 90 -----PMSLQROGS-LTLPRTLSAKTVEVWRNLVVD
OsABI5 90 -----APPVQROGS-LTLPRTLSQKTVEVWRDMMCF
AtABI5 109 NGGEGGVGVFSGGSRGNEDANNKRGIANESSLERQGS-LTLPAPLCKRTVEVWSEIHRG
BZIP-16042.1 100 -----GAALQROGS-LTLPRTLSVKTVEVWRDFARE
BZIP-70604.1 101 -----LTPLQROGS-LTLPRTLSAKTVEVWRNLVVD
BZIP-48312.1 74 -----GAPLQROGS-FTLSRTLSQKTVEVWREIVGF

SbABI5-5065.1 126 GGG--PSAEAAAPPPP-----AQRQPTLGEITLLEFLVRAGVVREDMTA
HvABI5 121 DP--LPVGAEGAEPQPH-----RQATLGEITLLEFLVRAGVVREIPTA
OsABI5 121 GGGGASTAPAAAEPPPP-----AHRQPTLGEITLLEFLVRAGVVREDMSV
AtABI5 168 GSGNGGDSNGRSSSSNGQNN----AQNGGETAARQPTLGEITLLEFLVRAGVVREHPTN
BZIP-16042.1 131 GPP--GPTAGGAEPQPN-----RQPTLGEITLLEFLVRAGVVRENPA
BZIP-70604.1 133 EPPQAQVADGGGHHQPH-----RQSTLGEITLLEFLVRAGVVRENPA
BZIP-48312.1 105 TGGEDAQPVAAPAPTTPAPAPAPLPAQAQAQAQRQPTLGSMTLLEFLVRAGVVREDMGQ

SbABI5-5065.1 168 F-----PPVLPAPVCPPPPPQOTMLFPH-----GDVFAPLVPPLQFG---
HvABI5 162 PAVPPP-----PMQPRPVVAPKGAFTVGNFPSANDVG-TAALGFPPVAMGDLALG---
OsABI5 166 PPVPPAPTPTAAAVPPPPPPQQOTPMLFGQ-----SNVFPMPVPLSLG---
AtABI5 224 PKPNPNPNQNPSSVIPAAAQQQLYGVFQGTGDPSPFGQAMGVGDPSGYAKRTGGGGYQ
BZIP-16042.1 172 AAAAAAAVSAQPVAPRPIQAVNNGASIFFGNFGGANDAGAGAMGFAPVVGIGDQAMG---
BZIP-70604.1 176 APPAPQPLT---MMPPRPVFVAPKSSAFVFNLPGADDAAAAAALGFAPVGMGDLALG---
BZIP-48312.1 165 QT-----LVLQPHAQGLFSQ-----GNAVAPQT---MQLG---

SbABI5-5065.1 205 -----NGLVSGAVGQQQGGGPAAPAVSPRPVTASGFGKMEGGDLSLSPSPVPYVFGG
HvABI5 212 -----NGLMPRALG--MGGAPLVVQTAVKP---VDSGSKGSEDLSSPSEFMPYSFEG
OsABI5 210 -----NGLVSGAVG-HGGGAASLVSPVRFVSSNGFGKMEGGDLSLSPSPVPYVFKG
AtABI5 284 QAPPVQAGVCYGGVGFAGGGQMGVGLSPVSSDGLGHGVNDNIGGQYGVDMGGLRG-
BZIP-16042.1 229 -----NGLMPGVAG--MAGGAVTVVSPVDTVAQLDSMGKNGDLSLSPMAPVPYVPEFEG
BZIP-70604.1 230 -----P--PRAAAG--MGGSAMAVQTAVNQ---QLDSGGKGYSDLSSPTEPLPFSFEG
BZIP-48312.1 192 -----NGMVAGVVG--QGLGGGMTVAAPTTPVVLNMGCKVEAGDLSLSP--VPYVFDT

SbABI5-5065.1 258 GLRARK-PPAMEKVVERRQRRMIKNRESAARSRQRKQAYMMELEAEVAKLKEMNDELQKK
HvABI5 259 IVRGRRTGGGVEKVVERRQRRMIKNRESAARSRARKQAYTMELEAEVQKLDLNEELVKK
OsABI5 262 GLRGRK-APGLEKVVERRQRRMIKNRESAARSRQRKQAYMMELEAEVAKLKELNDELQKK
AtABI5 343 --RKRVVDGPEKVVERRQRRMIKNRESAARSRARKQAYTMELEAEVAKLKEENAQLKHA
BZIP-16042.1 280 VIRGRRSAGGVEKVVERRQRRMIKNRESAARSRARKQAYTMELEAEVQKLEQNEELQKK
BZIP-70604.1 276 MIRGRRHGGGVEKVVERRQRRMIKNRESAARSRARKQVSTFCTEFMHVDVLLIKPFVSR
BZIP-48312.1 242 ALRVRK-GPTVEKVVERRQRRMIKNRESAARSRARKQV-----

SbABI5-5065.1 317 QVEMLEKQKNEVLERMRRQVGPTAKRICLERTLTGPW
HvABI5 319 QTEILKMOKREAPEMKDQFGRKKRQ--CLRRTLTPGW----
OsABI5 321 QDEMLEKQKNEVLERMSRQVGPTAKRICLERTLTGPW----
AtABI5 401 LAELERKRKQYFESLKSRAQPKLPKSNGLRLRLMRNPNPCPL
BZIP-16042.1 340 QVCTISVQLKSIKCYLSEKSERICIFGPMLMEAVISQILVK
BZIP-70604.1 336 LQSCWAESNMLRKFYPN-----
BZIP-48312.1 -----

```

Fig. A-1. Alineamiento entre la secuencia de ABI5 identificada para sorgo (SbABI5) y los ortólogos de ABI5 de cebada (HvABI5), arroz (OsABI5) y arabisopsis (AtABI5), y tres homólogos de sorgo identificados en esta tesis denominados BZIP-16042, 70604.1 y 48312.1. Programas: Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server.

Referencias de las proteínas del alineamiento:

- HvABI5: AAO06115 353 aa PLN 02-JAN-2003 / bZIP transcription factor ABI5 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]. ACCESSION AAO06115.1 GI:27469352 AY150676.1
- OsABI5: BAD17318 357 aa PLN 28-APR-2004 / putative bZIP transcription factor ABI5 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]. ACCESSION BAD17318.1 GI:46806070 [AP005287.3](#)
- AtABI5: NP_565840 442 aa PLN 20-APR-2007 / ABI5 (ABA INSENSITIVE 5); DNA binding transcription factor [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION NP_565840.1 GI:18404091 NM_129185.3

```

SbPKABA1a 1 -----MDKYEPPVREIGAGNFGVAKLMRNKETRELVAMKFFIERGNRI
SbPKABA1b 1 MDRAALTVGPGMDMPIMHDGDRYELVRDIGSGNFGVAKLMRNRADGQLVAVKMIERGEKI
TaPKABA1 1 -----MDRYEVVRDIGSGNFGVAKLVRDVRTKEHFVAVKFFIERGHKI
HvPKABA1 1 -----MDRYEVVRDIGSGNFGVAKLVRDVRTREHFVAVKFFIERGHKI
SAPK5 1 -----MEKYEPPVREIGAGNFGVAKLMRNKETRELVAMKFFIERGNRI

SbPKABA1a 42 DENVFREIIVNHRSLRHPNIIIRFKEVVLTPTHLAIVMEYAAAGGELFERICEAGRFFHEDEAR
SbPKABA1b 61 DENVQREIIVNHRSLRHPNIIIRFKEVVLTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSSEDEAR
TaPKABA1 42 DEHVQREIIMNHRSLKHPNIIIRFKEVVLTPTHLAIVMEYASGGELFQRICNAGRFSSEDEGR
HvPKABA1 42 DEHVQREIIMNHRSLKHPNIIIRFKEVVLTPTHLAIVMEYASGGELFQRICNAGRFSSEDEGR
SAPK5 42 DENVFREIIVNHRSLRHPNIIIRFKEVVLTPGRHLAIVMEYAAAGGELFERICEAGRFFHEDEAR

SbPKABA1a 102 YFFQQLVCGVSECHAMNIICHRDLKLENTLLDGSAPARLKICDFGYSKSSVLHSRPPKSTVG
SbPKABA1b 121 FFFQQLISGVSYCHSMQVCHRDLENTLLDGSAPARLKICDFGYSKSSVLHSQPKSTVG
TaPKABA1 102 FFFQQLISGVSYCHSMQVCHRDLENTLLDGSVAPARLKICDFGYSKSSVLHSQPKSTVG
HvPKABA1 102 FFFQQLISGVSYCHSMQVCHRDLENTLLDGSVAPARLKICDFGYSKSSVLHSQPKSTVG
SAPK5 102 YFFQQLVCGVSYCHAMQIICHRDLKLENTLLDGSAPARLKICDFGYSKSSVLHSRPPKSTVG

SbPKABA1a 162 TPAYIAPEVLSRREYDGGHADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPKDPKNFRKTIISRIIMSVQY
SbPKABA1b 181 TPAYIAPEVLLKKEYDGGVADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEDEPKNFRTIQIRILGVQY
TaPKABA1 162 TPAYIAPEVLSRREYDGGVADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPDEPNFRKTIIRILSVQY
HvPKABA1 162 TPAYIAPEVLSRREYDGGVADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEPNFRKTIIRILSVQY
SAPK5 162 TPAYIAPEVLSRREYDGGHADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPKDPKNFRKTIISRIIMSVQY

SbPKABA1a 222 KIPEYVHVSHNCRHLLSRIFVGNPQYKRITMSEIKSHPWFLKNLRELKEEAQAAYYSRRG
SbPKABA1b 241 SIPDYVHISPECQDLISRFVANPATRITPEIRNHPWFLKNLEADLMDSTMSKQYEE-
TaPKABA1 222 SVPDYVVRVSMDCVHLLSRIFVGNPQQRITPEIKNHPWFLKRLPEMTDEYQORMQLAD-
HvPKABA1 222 SVPDYVVRVSMDCVHLLSRIFVGNPQQRITPEIKNHPWFLKRLPEMTDEYQORMQLAD-
SAPK5 222 KIPEYVHVSQPCRHLLSRIFVANPQYKRISMGEIKSHPWFLKNLRELKEEAQAVYYNRRG

SbPKABA1a 282 VGDAAGSSNANGNGNANAVAPAAYSQSVEEIMRIVQEAQTLPKPARFVSCYGWDAASD
SbPKABA1b 300 -----PEQPMQSMDEIMQTLAEATIPAAGSRGLNQFLNDGLDL
TaPKABA1 281 -----MNTPSQSLEEAMATIQEAQKPGDNALGVAGQVACLGSM
HvPKABA1 281 -----MNTPSQSLEEAMATIQEAQKEGHNALGLAGQVACLGSM
SAPK5 282 ADHAASSAS-----SAAAAAASFPSQVEDIMRIVQEAQTVPKPKDPVSCYGWGTDGDD

SbPKABA1a 342 DDDQYEEEAPEEEDDYDRTVRQVHASGEFDMSSLQI-
SbPKABA1b 338 DDDMEDLDSADLDLLESSGEIVYAM-----
TaPKABA1 319 DLDDIDFD-IDDIDVSSGDFVCPL-----
HvPKABA1 319 DLDDIDFD-VDDIDIENSDFVCPL-----
SAPK5 334 DDDQQPAEEED--EEDDYDRTVREVHASVDLDMSSLQIS

```

Fig.A-2: Alineamiento entre dos secuencias de sorgo con alta identidad con PKABA (SbPKABA1a: PUT-157a-Sorghum_bicolor-30348924 y SbPKABA1b: PUT-157a-Sorghum_bicolor-10848926) y las ortólogas de trigo (TaPKABA1) y cebada (Hv PKABA1) y una proteína homóloga de arroz, SAPK5 (stress/ABA induced protein-kinase). (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias para las secuencias del alineamiento:

- TaPKABA1: ABD37624 342 aa PLN 12-SEP-2006 / serine-threonine protein kinase [Triticum aestivum].
ACCESSION ABD37624.1 GI:87312444 DQ343302.1
- HvPKABA1: BAB61735 342 aa linear PLN 03-JUL-2001 / protein kinase HvPKABA1 [Hordeum vulgare].
ACCESSION BAB61735.1 GI:14588571 AB058923.1
- SAPK5: Q7XKA8 370 aa linear PLN 13-NOV-2007 / Serine/threonine-protein kinase SAPK5 (Osmotic stress/abscisic acid-activated protein kinase 5). [Oryza sativa Japonica Group] ACCESSION Q7XKA8.1
GI:71153744

ABI4 (factor de transcripción)

```

SbABI4      1  -----MEPNNNQPAATAEEAAAGSGPGGEGGRKKGKAPKGGPENGKFRYRGVRO
ZmABI4      1  -----MEASNNESAPTAEAAAGSGPAGGEGGRKKGKAPKGGPENGKFRYRGVRO
AtABI4      1  MDPLASQHQHNHLEDNNQTLTHNNPQSDSTTDSSTSSAQRKRKKGKGGPDNSKFRYRGVRO

SbABI4      49  RSWGKWVAEIREPRKRSRKWLGTFFATAEDAARAYDRAALLLYGPRAHLNVTSPPPPTLAA
ZmABI4      48  RSWGKWVAEIREPRKRSRKWLGTFFATAEDAARAYDRAALLLYGPRAHLNLTSPPPPTLAA
AtABI4      61  RSWGKWVAEIREPRKRTRRKWLGTFFATAEDAARAYDRAAVVLYGSRALNLTSPSSPSSVSS

SbABI4     109  PRS--HPHSSATSSSSAPPALRPLLPRPPLHHQLSSGACAPFA-----
ZmABI4     108  PRS--HPHSSATSS--APPALRPLLPRPPLHQLSSDGAPAPD-----
AtABI4     121  SSSSVSAASSPSTSSSSSTQTLRPLLPRPAAATVGGGANFGPEYGI PFNNNIFLNGGTSMLC

SbABI4     149  -----PDFHHHHQQFQCHLLLPQAQOPTPPLYAN-----TATASTVTTVPTRVA
ZmABI4     146  -----FHYHNOFORRLLP-----OPTPPLYAN-----TATASTVTTVPTRVA
AtABI4     181  PSYGFFPQQQQQONQMVQMGQFQHQQYQNLHSNTNNNKISDIELTDVPVTNSTSFHHEVA

SbABI4     194  VPQEP-----AVAPAVGSSTSLQEPQASTPEEAPR-----ETG
ZmABI4     185  VPQEP-----ATAPAVGSSTSLQEPQAVGTPEEARG-----EAG
AtABI4     241  LGQEQGGSGCENNNSMEDLNSTAGSVGSSLSITHPPPLVDPVCSMGLDPGYMVGDGSSTI

SbABI4     227  WDYHGGEEDYAAALLWDEPEPFF-----
ZmABI4     218  WDYNGGEEDYAAALLWDEPEPFF-----
AtABI4     301  WPFGEEEYSHNWGSIWDFIDPILGEFYHVCBFMDTVAAWPQFEGQDYMTVWPEEQEYRT

SbABI4     251  -----WEDVELK---
ZmABI4     242  -----WEDVELK---
AtABI4     361  VWSEPPKRRAGRIKLQETRHPVYRQVRRRGKVGQWVCELRVPVSRGYSRLWLGTEANPEM

SbABI4
ZmABI4
AtABI4     421  AARAHDSAALALSGHDACLNFADSARWMPVHATGSFRLAPAQEIKDAVAVALEVFQGGH

SbABI4
ZmABI4
AtABI4     481  PADACTAEGSTTPITSSDLSGLDDEHWIGGMDAGSYASLAQGMLMEPPAAGGWREDDGE

SbABI4
ZmABI4
AtABI4     541  HDDGFSTSTSLWSY

```

Fig.A-3: Alineamiento (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server) entre secuencias predichas para ABI4 de sorgo (GSS SbGSStuc11-12-04.6057.1), y ABI4 de maíz y *Arabidopsis*.

Referencias de las secuencias del alineamiento:

ZmABI4: AAM95247 248 aa PLN 09-OCT-2002 / AP2 domain transcription factor [Zea mays].
 ACCESSION AAM95247.1 GI:22415744 [AY125490.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AAM95247.1)

AtABI4: NP_181551 328 aa PLN 04-NOV-2005 / ABI4 (ABA INSENSITIVE 4); DNA binding / transcription factor [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION NP_181551.1 GI:15225661 NM_129580.1

ABI1 / ABI2 (fosfatasa tipo PP2C)

```

SbABI1      1  -----GQRGSLLEFRDGGDG-----
AtABI2     1  MDEVSPAVAVVPFRPFTDPHAGLR-----GYCNGESRVTLPESSCSGDGAMKDSSFEIN-
AtABI1     1  MEEVSPAIAGPFRPFSETQMDFTGIRLGKGYCNNQYSNQDSENGDLMVSLPETSSCSVSG

SbABI1     16  -----GDLRGGRGDLRRRGMRAGGREAGSR-----CRRRRRRRR
AtABI2     54  -----TRQDSLTSSSSAMAGVDISAGDEINGSDEFDPRSMNQSEKKVLS
AtABI1     61  SHGSESRKVLISRINSPNLNMKESAAADIVVVDISAGDEINGSD-----VTSEKKMIS

SbABI1     49  QGRRRQEERLPHGLRAGLGLRVHARPQRRDGGTPAPRSRASP-----TCRCA
AtABI2     98  RTESRSLFEFKCVPLYGVTSICGRRPEMEDSVSTIPRFLQVSSSLDGRVTNGFNPHLS
AtABI1    114  RTESRSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRFLQSSSGSMLDG-----RFDPQSA

SbABI1     96  CSPGAGTSTAWASQVANYCRERLQVLLRQELRLLGKDLGETSEVEMKEHWDDLFTRCFQR
AtABI2    158  AHFFGVYDGHGSQVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDG--DTWQEKWKKALFNSFMR
AtABI1    170  AHFFGVYDGHGSQVANYCRERMHLALAEEIAKEKPMLCDG--DTWLEKWKKALFNSFLR

SbABI1    156  LDDEVSGQASRLVGGVQESRPVAAENVGSTAVVAVVCSSHVVANCGDSRVVLCRGKEPV
AtABI2    216  VDSEIETVAH-----APETVGSTSVVAVVFPHIFVANCGDSRAVLCRGKTPL
AtABI1    228  VDSEIESVA-----PETVGSTSVVAVVFPSHIFVANCGDSRAVLCRGKTAL

SbABI1    216  ELSIDHKPDRKDERARIEALGGKVIQWNGYRVSGILAMSRSIGDRYLKPFVIPKPEVTVF
AtABI2    264  ALSVDHKPDRDEAARIEAAGGKVIRWNGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPSVIPDEVTSV
AtABI1    274  PLSVDHKPDREDEAARIEAAGGKVIQWNGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPSIPDEVTAV

SbABI1    276  PRAKDDCLILASDGLWDVIPNEEACKVARROIQLWHKNNGVASSLCDEGD---ESTDP
AtABI2    324  RRVKEDDCLILASDGLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEALLPAE--KRGEGKDP
AtABI1    334  KRVKEDDCLILASDGVWDVMTDEEACEMARKRILLWHKKNAVAGDASLLADERRKEGKDP

SbABI1    332  AAQAAADYLMRLALKKGTEDNITVIVVDLKPRKLKSNSHAGSIRVRADHDM
AtABI2    383  AAMSAAEYLSKMALQKGSKDNISVVVDLKGIRKFKSKSLN-----
AtABI1    394  AAMSAAEYLSKLAIQRGSKDNISVVVDLKPRRKLKSKFLN-----

```

Fig.A-4: Alineamiento entre una secuencia de sorgo con alta identidad con ABI1 y ABI2 (traducida a partir de las secuencias de sorgo: EST DSAF1_67_H05.b1_A011 y [PUT-157a-Sorghum_bicolor-31814](#)) y ABI1 y ABI2 de arabis (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias para las secuencias del alineamiento:

AtABI1: CAA55484 434 aa PLN 14-NOV-2006 / ABI1 [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION CAA55484.1 GI:509419 [X78886.1](#)
 AtABI2: CAA72538 423 aa PLN 14-NOV-2006 / ABI2 [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION CAA72538.1 GI:2564213

Rab28

```

SbRAB28      1  MSQRQPRRPSGHQETTSGL-EQGAVERYGDVFFPAVAGGLAEKPVAFQDAATMQSAENLVFGQ
ZmRAB28      1  MSQEQPRRPSGHQETTSGLGGEQGAVERYGDVFFPAVSGGLAEKPVARR-TATMQSAENLVFGQ
GmPM26       1  MSQEQPRRPKGG-----QNPIIKYGDVF-VVSGDLAQKPVAFEDAAMMQSAETRVLGGQ

SbRAB28      60  TLRGGPAAAMQSACTANERMGAVGHDAQATDATAVQGVTVSETARG-----
ZmRAB28      60  TLKGGPAAAMQSAATNERMGAVGHDAQATDATAVQGVTVSETRVPGGGRITVTEFVAGQAV
GmPM26       51  TQPGGAASVMQSAATRNEQAGLVGHRDVTDTVTGDRGVTVTETKVPGRRIITEAVGGQVVE

SbRAB28      105 -----
ZmRAB28      120 GQYLARDDDGGGGIAGPGAGAGVAGKDITKVTIGEALEATALAAGDAPVERSDAARIQAA
GmPM26       111 QYVEATPVEAGRSSAIKEN-----AITIGEALEATAQTVGQKAVDQSDAFAIQAA

SbRAB28      105 -----
ZmRAB28      180 EARATG-LDANVPGGLARQAQSAAAANSWAWGDEDKATLGDVLANATARLVADKPVESAD
GmPM26       161 GGESNGEVNVI TPGGLAAMAQSAAAYNADCKLDQAKVKLADILAGATAKLPADEKAATLQD

SbRAB28      114 ALGVAGPENRNRDDGTARPGGVAASMAAAARLNREAVWDDQ
ZmRAB28      239 ALGVAGAENRNRNDGTARPGGVAASMAAAARLNREAVWE-
GmPM26       221 AEGVACAENVRNPDATATPGGVAASVAAAAARLNENVK----

```

Fig.A-5: Alineamiento entre la secuencia (incompleta) putativa Rab28 de sorgo identificada durante este trabajo de tesis, obtenida a partir de la traducción de las secuencias parciales: PUT-153a-Sorghum_bicolor-62151485 (primer parte de la proteína) y PUT-157a-Sorghum_bicolor-48412 (última parte de la proteína). Estas dos secuencias no llegan a solaparse, y no se encontró una secuencia que abarque la parte media del gen. Se muestran las secuencias de Rab28 de maíz y una proteína homóloga de soja, GmPM26. Para el diseño de los primers para PCR se usó la primer secuencia (la segunda parte se identificó posteriormente).

Referencias de las secuencias del alineamiento:

- ZmRab28: CAA41854 278aa PLN 16-JAN-1992 / rab28 [Zea mays] ACCESSION CAA41854.1 GI:22460 ZMR28DNA [X59138.1](#)

- GmPM26: Seed maturation protein PM26 [Glycine max] ACCESSION [Q9SEK8_SOYBN_AAF21312.1](#)

Copalil di-fosfato sintetasa

```

SbCPS      1  -----
ZmCPS      1  ---MPYPPHYFWQSSRRRRRRRRGRDGAPRQPQARRVVERAAAGPGHATTTQQPDNVSSA
OsCPS      1  -----QANII
AtCPS      1  MSLQYHVLNSIFSTTFLSSTKTTISSSFLTISGSPLNVARDKRSRCSSIHCSKLRTQEYLN

SbCPS      1  -----QADETELQPLIDQVRAMLRSMNDGDISISISAYDT
ZmCPS     57  KVFQTSRVETESKLENGRKPODLEDEHQAEEALQPLIDQVRAMLRSMNDGDTSASAYDT
OsCPS      6  EHETPRITKWPNSRDLDDDHQQONNEADEEADELQPLVEQVRSMLSSMEDGAITASAYDT
AtCPS     61  SQEVQHDLPLIHEWQQLQGEDAPQISVGSNSNAFKEAVKSVKTILRNLDGEITISAYDT

SbCPS     34  AWVALVPKLDGGGGSQPEFPATVRWIVDHQLPDGSWGDPALFSAYDRMINTLACVVALTK
ZmCPS    117  AWVAMVPKVGGDGGAQPFPATVRWIVDHQLPDGSWGDSALFSAYDRMINTLACVVALTK
OsCPS     66  AWVALVPRLDGGG--TOFPAVRWIVGSQLADGSWGDEALFSAYDRVINTLACVVALTR
AtCPS    121  AWVALLDAGDKT--PAFFSAVKWIAENQLSDGSWGDAYLFSYHDRLINTLACVVALRS

SbCPS     94  WSLEPEKCKAGLSFLHENMWRLAEEQESMPIGFEIAFPSLIQTARNLG-VEFPYDHPAL
ZmCPS    177  WSLEPARCEAGLSFLHENMWRLAEEAESMPIGFEIAFPSLIQTARDLGVVDFPYGHPAL
OsCPS    124  WSLHHDQCKQGLQFLNLNDWRLAEEPDMPIGFEIAFPSLVEAARGLG-IDFPYDHPAL
AtCPS    177  WNLFPHQCNKGITFFRENIGKLEDENDESMPIGFEIAFPSLLEIARGIN-IDVPYDSPVL

SbCPS    153  QSIYSNREIKLKRIPKDMMHRVPTSILHSLEGMPDLDWARLLNQSSDGSFLSPSATAY
ZmCPS    237  QSIYANREVKLKRIPKDMMHRVPTSILHSLEGMPDLDWPRLLNQSCDGSFLSPSATAY
OsCPS    183  KGIYANRELKLKRIPKDMMHVPTSILHSLEGMPCLDWQRLLKLQCSDGSFLSPSATAY
AtCPS    236  KDIYAKKELKLTRIPKEIMKIPTTLHSLEGMRDLDWEKLLKLQSQDGSFLSPSSTAF

SbCPS    213  ALMQTGDKKCFEYIDRIVKKFDGGVPNVPVDLFEHIWVDRLRLGLSRYFOREIMQCM
ZmCPS    297  ALMQTGDKKCFEYIDRIVKKFNGGVPNVPVDLFEHIWVDRLRLGLSRYFOREIEQCM
OsCPS    243  ALMQTGDKKCFAYIDRIVKKFDGGVPNVPVDLFEHIWVDRLRLGLSRYFOREIEQNM
AtCPS    296  AFMQTRDSNCLEYLRNAVKRENGGVPNVPVDLFEHIWVDRLQRLGLSRYFEEEIKECL

SbCPS    273  DYVNRHWTEDGICWARNSNVK-----
ZmCPS    357  DYVNRHWTEDGICWARNSNVKDVDDTAMAFRLLRLHGYNVSPSVFKNFEKDGEFFCFVGQ
OsCPS    303  DYVNRHWTEDGICWARNSNVKEVDDTAMAFRLLRLHGYNVSPSVFKNFEKDGEFFCFVGQ
AtCPS    356  DYVHRYWTDNGICWARCSHVQDDDTAMAFRLLRLHGYQVSADVFKNFEKEGEFFCFVGQ

```

Fig.A-6: Alineamiento entre una secuencia de sorgo traducida (SbGSStuc11-12-04.9771.1, identificada durante este trabajo de tesis) con alta identidad con la secuencia de ent-copalil difosfato sintetasa (CPS, ó KSA), y secuencias conocidas para CPS de maíz, arroz y arabis (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias en el alineamiento:

CPS de maíz: AAA73960 823 aa PLN 03-AUG-1995 / kaurene synthase A.[Zea mays]

ACCESSION:AAA73960.1 GI:576886 MZAN1A accession [L37750.1](#)

CPS de arroz: BAD42449 776 aa PLN 04-SEP-2004 / ent-copalylidiphosphate synthase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]. ACCESSION BAD42449.1 GI:51889420

CPS de Arabidopsis: [NP_192187.1](#) 802 aa PLN 20-APR-2007 / GA REQUIRING 1 (GA1); ent-copalyl diphosphate synthase [Arabidopsis thaliana] GA1. ACCESSION NM_116512

Ent-kaurene sintetasa

```

SbKSB      1  -----IKDPEYNELFR L MSTCGRLLNDVETFEREY
ZmKSB     302  TFG LGPIVLPAL Y FVGPK I SES I VKD PEYDEL F KLMSTCGRLLNDVQTFEREY
OsKSB     598  SFALGPTITSAAL F VGP E L SEEVFRSKEYIHL MNLAN T IGRLLNDMOTYEKEI
AtKSB     596  SFALGPIVLPAT Y LIGPPLPEKT V DSHQYNQLYKLVSTMGRLLNDIQGFKRES

SbKSB      38  VSL LVLHGG-----SMSISDA RRK LQKPI DTCRRDLLRLV LREE--GVIPR
ZmKSB     362  VSL LVLHGG-----SMSISDA RRK LQKPI DTCRRDLLSLV LREE--SVVPR
OsKSB     658  VMLHALSHSGGGGRG S PEAS MEEBAKREMRRLV LQGSRC DLLRLVTRDG--GVVPP
AtKSB     656  VSL HMKHER-----DNRSKEVIIESM KGLAERKREELHKLVL EEKGSVVPR

SbKSB      89  KMCKVCYFFYS G TDGFSS PVEKAREVD AVINEPLKLQGS HASLRVV
ZmKSB     413  KMCKVCYFFYS T TDGFSS QVERAKEVD AVINEPLKLQGS HTLVSDV
OsKSB     716  FMSKVLHEVYMEK DGYFTADGVMAS ANAVILDPLQV TLLPSGLGTL
AtKSB     709  *.**  :.*  **: :  ..:** :*:::

```

Fig.A-7: Alineamiento entre la secuencia de sorgo traducida (CD425007 EST SA1_10_H05.b1_A002) y secuencias ortólogas para KSB de maíz, arroz y arabidopsis (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias en el alineamiento:

KS(B) de maíz (secuencia parcial): AF105149 458 aa PLN 02-JUN-1999 / kaurene synthase (KS) [Zea mays]. ACCESSION AF105149.1 GI:4959321

KS(B) de arroz: AAQ72565 821 aa PLN 31-MAY-2005 / ent-kaurene synthase like-6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]. ACCESSION AAQ72565.1 GI:37683580

KS(B) de Arabidopsis: NP_178064 785 aa PLN 20-APR-2007 / GA2 (GA REQUIRING 2); ent-kaurene synthase [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION NP_178064.1 GI:15219383

Ent-kaurene oxidasa

```

SbEKO      1  MESLVAAALPAGGAAAAAAGGLVAAAALACKAGLVGPK-KHLNAPPVAVPGLPMIGNLHQL
OsEKO      1  -----MESLLAAGAGGIGVAAAAAVVAATLAVVPPKDRGNPPPAVAVPGLPVIGNMHQL
HvEKO      1  -----ALAAKAGVVGAG--RTTAPPVAVPGLPMIGNLHQL
AtEKO      1  -MAFFSMISI LLGFVISSFIFIFFFKKLLSFSRKNMSEVSTLPSVPPVPPGFPVIGNLHQL

SbEKO      60  KEKKPEQTFTKWAEIYGPLYTIRTGASSVVVLNSAQVAKEAMIAKFSSISTRKLSKALSVA
OsEKO      54  KEKKPEHFTFKWSKTYGPIYTIKTGASSVVVLNSTEVAKEMIEKFSSISTRKLPKALSVA
HvEKO      33  KEKKPKTFKAKWSDIYGPIYTIKTGASSVAVLNSSEVAKEMVAKYSSISTRKLPKALSVA
AtEKO      60  KEKKPKTFTRWSEIYGPIYSIKMGSSSLIIVLNSTETAKEAMVTRFSSISTRKLSNALTV

SbEKO      120  LTRDKTMVATSDYGDFFHKMVKRYVMTSMLGTS AQKQFRDTRNMMVDNMLNTFHTLLTDDP
OsEKO      114  IS-RKNMVISISDYGDFFYKMAKRNIMLA LIGFNAQKHFC DTRERMVSNVLSLHKLVAADP
HvEKO      93  LTRDKTMVATSDYGDFFHKMVKRLLVMSGMLGSSAQRFDRDTRDMMMDNMLSTFHTLVTDPP
AtEKO      120  LTRCDKSMVATSDYDDEFFHKLVKRCLLNGCLGANAQKRRKRHYRDALIEVSSKLEHAHARDEP

SbEKO      180  NSPLNFRVVFKNELFRLSLIQALGEDVSSVYVEEYGVKVISQEEIYQATVADMMMCATVD
OsEKO      173  HSPLNFRVVTTELFGLSLIQNLGEDVCSVYVEEFGREISKKEEIFHVLVHEILSCVVEPD
HvEKO      153  HSPLNFRVFKDELFRSLIQALGEDVSSVYVEEFGREISKDEIYQITVVDMMMCATVD
AtEKO      180  QEPVNFRAIFEHLELFGVALKQAFGKDVESVYVKELELGVTLKDEIFKVLVHDMMEGATVD

SbEKO      240  WRDFFPYLSWIPNRSFETRVLTTEARRTTVMQALINQOKIRIARGQTRISYLDFFLLAEN-
OsEKO      233  WRDFFPYLSWIPNKSFETIVSSTEFRRDAVMNALIKROKERIARGEARISYIDFFLEARN
HvEKO      213  WRDFFPYLSWIPNKSFETRVHTAESRRTAVMQALIRQOKKRIANGEARASYLDFFLLAEK-
AtEKO      240  WRDFFPYLKWIPNKSFEARIQOKHKRRLAVMNALIQDRLKQNGSESDDDCYLNFLMSEAK

SbEKO      299  --TILTDEQLMLVWEAVIEAADTTLVTTTEWAMYELAKHPEKQVSTEACFSPQOEYLYQEIQ
OsEKO      293  STQLTDEQLMLVWEAVIEAADTTLVTTTEWAMYELAKNPK-----QEWLYREIR
HvEKO      272  --ALTDEQLMLVWEAVIEAADTTLVTTTEWAMYELAKNPEK-----QDRLYQEIR
AtEKO      300  --TLTKEQLATLVWETIIEETADTTLVTTTEWAMYELAKHPS-----VQDRLCKEIQ

SbEKO      357  KVCGNKTVTEDELPELPYLNVAVFHETLRRHSPVPLVPPRFVHENTNLAGYEVPAAGTEV--
OsEKO      343  EVCGGKAVTEEDLPRLPYLDAVLHETLRLHSPVPLVPPRFVHDDTTLAGYDVPAGTQVMV
HvEKO      320  EVCGDETVTEDEVPRLPYLSAVFHETLRLHSPVPLVPPRFVHETTTLAGYDVPAGTEIVV
AtEKO      348  NVCGGGEKFKEEQLSQVYPYLVGFVHETLRKYSPAFLVPTRYVAHEDTQIGGYHVPAGSEIAI

SbEKO      403  NVFGCHMDEEAWESPGEWSPERFLGEG-FKLADRYKTLAFGAGRRTCAGSQQAVSIACVA
OsEKO      380  NLYGCNMMKKDWEEPEWRPERFMDGR-FEADMKYKTMAFGAGRRSCAGSLQATSISSCAA
AtEKO      408  NLYGCNMDKKRWERPEDWPPERFLDDCKVETSDDLHKTMAFGAGKRV CAGALQASLMAGIA

SbEKO      462  IARFVQELQWTLREGDGDKEEDTMOYTA LKHLPLHVHLKPRGS-
OsEKO      462  IARFVQDFAWRLKEGDEDNVDTVQLTSSYKHLPLVYVYLLPRGRK
HvEKO      439  IARFVQDFAWRLKEGDEDNVDTVQLTSSYKHLPLVYVYLLPRGRK
AtEKO      468  IGRLVQEFEWKLRDGEENVDTYGLTSSYKLVPLMAIINPRRS-

```

Fig.A-8: Alineamiento entre la secuencia de sorgo traducida (obtenida a partir del empalme de secuencias GSS_SbGSSstuc11-12-04.75629.1 y el EST45964370.1 del PUT-150a-Sorghum_bicolor-2391) y secuencias conocidas para EKO de arroz, cebada y arabidopsis (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias en el alineamiento:

EKO de cebada: AAT49064 481 aa PLN 14-OCT-2004 / ent-kaurene oxidase 1 [*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*].ACCESSION AAT49064.1 GI:49065958
[AY551434.1](#)

EKO de arroz: BAD54586 503 aa PLN 15-SEP-2007 / ent-kaurene oxidase [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)].ACCESSION BAD54586.1 GI:53792001
[AP005471.2](#)

EKO de Arabidopsis: NP_197962 509 aa PLN 20-APR-2007 / GA3(GA REQUIRING 3); oxygen binding [*Arabidopsis thaliana*].ACCESSION NP_197962.1 GI:15239520 [NM_122491.2](#)

Ent-kaurenoico hidroxilasa

```

SbEKAH      1  -----MLGEEAALLSWAAALLLGAAALVLDAAARWAHGW
ZmDWARF3    1  MLGVGMAAAALLGAVALLLADAAARRAHWYREAAEAVLVGAVALVVDAAARWAHGW
AtEKAH      1  -----MAETTSWIPVWFFPLMVLGCFG---LNWLVRKVNVM

SbEKAH      38  EAPLGAARRARLPPGEMGWPLVGGMWAFLRAFKSGKPDAFIASFVRRFGRTGVYRGM
ZmDWARF3    61  EAALGAARRARLPPGEMGWPLVGGMWAFLRAFKSGKPDAFIASFVRRFGRTGVYRSM
AtEKAH      35  ESSLGENR-HYLPFGDLGWPLVGGMWAFLRAFKTSDDSDSFRTRLIKRYGPKGTVKAM

SbEKAH      98  SPTVLVTTPEACKQVLMDDDAFVTGWPKATVALIGPKSFVAMPYDEHRRRLRKLTAAP
ZmDWARF3    121 SPTVLVTTAEGCKQVLMDDDAFVTGWPKATVALVGRSFSVAMPYDEHRRRLRKLTAAP
AtEKAH      94  NPSIIIVTTSDTCRRVLTDDDAFKPGWPTSTMELIGRKSFSVIGISFEEHKRLRRLTAAPV

SbEKAH      158 FDALTAFLPFIDRTVTSSLRWADES-----
ZmDWARF3    181 FDALTGFLPFIDRTVTSSLRWAADHGGSVEFLTELRRMTFKIIVQIFLGGADQATTRA
AtEKAH      154 HEALSTYIPVIEENVITVLDKWTKMG-EFEFLTHLRKLTFRRIIMYIFLSSSESENVMDA

SbEKAH      184  -----
ZmDWARF3    241  RSYTELNYGMRAMAINLPGFAYRGLRARRRLVAVLQGVLDERRAARAKGVSGGGVDM
AtEKAH      213  REYTAFLNYGVRAMAVNIPGFAYRRLKARKKTLVAAFQSIIVTERRNQRKQNILSNKKDM

SbEKAH      184  -----SSGAGAG
ZmDWARF3    301  RLIEAQDERGRHLDDDEIIDVLMYLNAGHESGHITMWATVFLQENPDMFARAKAEQ
AtEKAH      273  NLLNVKDEDGKTLDDDEIIDVLMYLNAGHESGHITMWATVFLQEHPEVLQRAKAEQ

SbEKAH      193  VEFTELRRMTFKIRDFRKMAYLSQVIDETLRLVNI SFVSFRQATKDVFNQYLIPKG
ZmDWARF3    361  IMRSIIPSSORGLTLRDFRKMAYLSQVIDETLRLVNI SFVSFRQATRDVFNQYLIPKG
AtEKAH      333  ILKSRPEGQGLSLKETRKMAYLSQVIDETLRLVNI SFVSLTAFREAKTDVEMNGYLIPKG

SbEKAH      253  VOLWYRSVHMDPQVYDPDTKFNPSRWEG-HSPRAGTFLAFGLGARFCPGNDLAKLEIS
ZmDWARF3    421  VOLWYRSVHMDPQVYDPDTKFDPSRWEG-HSPRAGTFLAFGLGARLCPGNDLAKLEIS
AtEKAH      393  VLTWERDVEIDPEVFPDPKFKDPARWNGFVVPKAGAFLPFGAGSHLCPGNDLAKLEIS

SbEKAH      312  LHHFLLGYRLARTNPRCRVRYLPHPRPVDNCLAKITRVSEY
ZmDWARF3    480  LHHFLLGYKRLARTNPRCRVRYLPHPRPVDNCLAKITRVGS--
AtEKAH      453  LHHFLLKYQVQRSNPECLVMYLPETRPDNDCLARISYQ----

```

Fig.A-9: Alineamiento entre la secuencia de sorgo traducida (obtenida a partir de las secuencias) y secuencias conocidas para EKAH de maíz (DWARF3) y arabisopsis (AtEKAH). Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server.

Referencias de las secuencias en el alineamiento:

EKAH de maíz (Dwarf3): Q43246 519aa PLN 11-SEP-2007 / Cytochrome P450 88A1 (Dwarf3 protein).
 ACCESSION Q43246.1 GI:5915847 swissprot: locus C88A1_MAIZE, [Q43246.1](#)

EKAH de Arabidopsis: AAK11564 490aa PLN 21-FEB-2001 / ent-kaurenoic acid hydroxylase [Arabidopsis thaliana].ACCESSION AAK11564.1 GI:13021853 AF318500 [AF318500.1](#)

GA 20 - oxidasa

```

SbGA20ox1      1  -----LGSIMVQQASLGEPLLLQPPPPSLVFDAARLSGLS-DIPQOFLWPADESPTPDAA
SbGA20ox2      1  DRLLALVGGKQVDRRLLLLPVSPAADDGKDDNGAAAVINLWGQLKIPDEFVWSHAET-MVSSE
OsGA20ox       1  -----MSMVVQQEQEVVFDAAVLSGQT-EIPSQOFLWPADESPTPDAA
AtGA20ox       1  -----MATECIATVPOIFSENKTKSDSSIFDAKLLNQHSHHLPQQFVWPDHEKPS-STDV

SbGA20ox1      55  EELAVPLIDLDSG--D-----AAEVVR----QVRRACDLHGFFQVNVHGIDDALLQEAHRC
SbGA20ox2      60  RELDAPVVDVGAAMRGGDDDCGAGIRRAAELVSGACSSHGLFQVLTGHGIDDPALARAALDG
OsGA20ox       42  EELEVALIDVGAAGAE-----RSSVVR----QVGEACERHGFFLVNVHGIEAALLEEAHRC
AtGA20ox       54  QPLQVPLIDLAGFLSGDSDCLASEATR----LVSKAATKHGFFLITNHGVDESLLSRAYLH

SbGA20ox1      104 MDAFFTLPMSSDKQRAQRRCQDSCGYASSFTGRFASKLPWKETLSFRYS---DDQGDGDVV
SbGA20ox2      120 AAFFRLPLATKQORASRAPGNVTGYTAAHADRFANLTPWKETLSFGHRD--RRTSGSHVV
OsGA20ox       93  MDAFFTLPLGKQRRSGARG-RTAYASSFTGRFASKLPWKETLSFRYSAGDEEGEGVG
AtGA20ox       110 MDSFFKAPACEKQKAQRKWKGESSGYASSFVGRFSSKLPWKETLSFKFSP--EKKIHSQTV

SbGA20ox1      161 VDYFVDKLGDAYRHHG-----EVYGRYCSMSRLSLELMEVLGESLGVG--
SbGA20ox2      178 VDYFTSTLGSDFKPLGIFARILLHHIACCRRVYQNYCNAMKEVSLATMEVLGVS LGVGR-
OsGA20ox       152 EYLVRKLGAEHGRRLLG-----EVYSRYCHEMSRLSLELMEVLGESLGLVGD
AtGA20ox       168 KDEVSKKMGDGYEDFG-----KVYQEYAEAMNTLSLKTMEELGMSLGVGR-

SbGA20ox1      205 -RRHFRFFFQGNDSIMRLNYYPPCORPVDTLGTGPHCDPTSLTILHOD-DVGGLOVFDAA
SbGA20ox2      237 --SYRDFEFADGSSIMRCNYYPPCPEPERTLGTGPHCDPSALTVLHODGDV DGLQVLVDG
OsGA20ox       198 RREYFRFFFQGNDSIMRLNYYPCORPLD TLGTGPHCDPTSLTILHOD-HVGGLEVWAEAG
AtGA20ox       213 --RYFKEFFEDSDSIFRLNYYPCOKPELALGTGPHCDPTSLTILHOD-QVGGLOVFDVN

SbGA20ox1      263 TGPGTGRWRSIRPHPGAFFVFNIGDTFMALSNGRYRSC LHRAVVNSRVPRRSLAFFLCP
SbGA20ox2      295 -----EWRTRVPRPGALVVVSI GDTFMVR-----
OsGA20ox       257 -----RWRRAIRPRPGALVVNVGDTFMALSNARYRSC LHRAVVNSTAPRRSLAFFLCP
AtGA20ox       270 -----KWSIIPP NPHAFVFNIGDTFMAL TNGRYKSLHRAVVNSERERERTFAFFLCPKG

SbGA20ox1      323 DKVVRPPAELVDDANP--RAYPDTWRRTLLDFTMRHYRSDMRTL EAFSNWLNHGGHLS
SbGA20ox2      311 DTVVRPPEELVDDHHP--RVYPDTWRALLDFTQRHYRADMRTEQAFSDWLNHHRHLQPT
OsGA20ox       311 DTVVRPPEELVDDHHP--RVYPDTWRALLDFTQRHYRADMRTEQAFSDWLNHHRHLQPT
AtGA20ox       324 EKVVKPPPEELVNGVKSGERKYPDTWSMFLEF TQKHYRADMNTLDEFSIWLKNRRSFSF---

SbGA20ox1      381 PPP
SbGA20ox2      ---
OsGA20ox       369 IYS
AtGA20ox       ---

```

Fig.A-10: Alineamiento entre dos GA 20-oxidasa de sorgo (SbGA20ox1, Pérez-Flores et al., 2003, secuencia parcial; la secuencia completa está codificada por el contig SbGSSstuc11-12-04.6172.1; SbGA20ox2, identificada durante este trabajo de tesis, codificada por el GSS contig: SbGSSstuc11-12-04.10330.1), y una GA 20-oxidasa de arábido y de arroz ([AAB48239.1](#)). (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias del alineamiento:

GA20oxidasa de arroz: AAB48239 371 aa PLN 28-FEB-1997 / DEFINITION gibberellin C-20 oxidase [Oryza sativa] ACCESSION AAB48239.1 GI:1854637 [U50333.1](#)

GA20oxidasa de Arabidopsis: NP_196337 380 aa PLN 28-APR-2007 / Gibberellin 20 oxidase 3; gibberellin 20-oxidase [Arabidopsis thaliana]. ACCESSION NP_196337.1 GI:15240722 [NM_120802.2](#)

GA-3 β -hidroxilasa

```

SbGA-3b-OH      1  MPTPSHLAN-PRYFDFAARRVPETHAWPGLHDPVVDGG--APGPDVAVPVVDLAGAA
TaGA3b-OH      1  MPTPAHLSKDPRYFDFAARRVPETHAWPGLHDPVVDGSGAGGGPDVAVPVVDMR---
OsGA3b-OH      1  MPTPSHLKN-PLCFDFRAARRVPETHAWPGLDHPVVDGGG-GGGEDAVPVVDVR---
HvGA3b-OH      1  MPTPSHLSKDPHYFDFAARRVPETHAWPGLHDPVVDGGGAGGGPDVAVPVVDMR---

SbGA-3b-OH     58  PRAAVVAQVARAAEQWGAFLRLTGHGVPAELLARVEDRTATMFALPADDKMRAVRGPGI
TaGA3b-OH     56  -DPCAAEAVALLAAQDWGAFLLVGHGVPLELLARVEAAIAGMFALPASEKMRAVRPPI
OsGA3b-OH     54  -AGDAAARVARAAEQWGAFLLVGHGVPAALLSRVEERVARVFSLPASEKMRAVRGPGI
HvGA3b-OH     56  -DPCAAEAVALLAAQDWGAFLLVGHGVPLELLARVEAAIAGMFALPASEKMRAVRPPI

SbGA-3b-OH    118  GYGSPPISSFFSKCMWSEGYTFSPANLRADLRKLPKDGDDYTSFCDVMEEFHKHMR
TaGA3b-OH    115  GYGSPPISSFFSKCMWSEGYTFSPANLRSDLRKLWPKAGHDYRHFCAVMEEFHRMR
OsGA3b-OH    113  GYGSPPISSFFSKCMWSEGYTFSPSSLRSLRRLWPKSGDDYLLFCVMEEFHKEMR
HvGA3b-OH    115  GYGSPPISSFFSKCMWSEGYTFSPANLRSDLRKLWPKAGHDYRHFCAVMEEFHRMR

SbGA-3b-OH    178  DKLLELFLMALGLTDEQVGGVEAERRIAETMTATMHLNWPYRCPDPRRALGLIAHTDS
TaGA3b-OH    175  DKLLELFLVALGLTGEQVAAVESEQKIAETMTATMHLNWPYRCPDPRRALGLIAHTDS
OsGA3b-OH    173  DELLRLFLRALGLTGEVAVGVEAERRIGERMTATVHLNWPYRCPDPRRALGLIAHTDS
HvGA3b-OH    175  DKLLELFLVALGLTGEQVAAVESEHKIAETMTATMHLNWPYRCPDPRRALGLIAHTDS

SbGA-3b-OH    238  FTFVLQSLVPGQLQFRHAPDRWVAVPAVPGAFVNVVGDLFHILTNGRFHVSVYHRAV
TaGA3b-OH    235  FTFVLQSLVPGQLQFRHGPDRWVTVPAVPGAMVNVVGDLFQILTNGRFHVSVYHRAV
OsGA3b-OH    233  FTFVLQSLVPGQLQFRRGPDRWVAVPAVAGAFVNVVGDLFHILTNGRFHVSVYHRAV
HvGA3b-OH    235  FTFVLQSLVPGQLQFRHGPDRWVTVPAVPGAMVNVVGDLFHILTNGRFHVSVYHRAV

SbGA-3b-OH    298  LDRISLGYFLGPPPAEKVAPLREAVPPGRTPAYRAVTWPEYMGVRKKAFTTGASALKM
TaGA3b-OH    295  SDRISLGYFLGPPPAEKVAPLREALAG-TEAAYRAVTWPEYMGVRKKAFTTGASALKM
OsGA3b-OH    293  RDRVSLGYFLGPPPAEKVAPLPEAVPAGRSPAYRAVTWPEYMAVRKKAFTTGASALKM
HvGA3b-OH    295  SDRISLGYFLGPPPAEKVAPLREALAG-TEAAYRAVTWPEYMGVRKKAFTTGASALKM

SbGA-3b-OH    358  LAAAATAADLDDDAGAGAAAEFVVHQQLLVSS
TaGA3b-OH    354  ISTDNDANHTDDLIS-----
OsGA3b-OH    353  TDAATAADEHDDVAAAADVHA-----
HvGA3b-OH    354  ISTDDAADVLPDVLSS-----

```

Fig.A-11: Alineamiento entre una secuencia traducida que codifica para una putativa GA 3b-hidroxilasa de sorgo (SbGA3b-OH; codificada por el EST PUT contig [PUT-157a-Sorghum_bicolor-882](#) y el GSS contig SbGSStuc11-12-04.1819.1). (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias del alineamiento:

- GA 3b-OH arroz: BAB62072 373aa PLN 17-JUL-2001 / GA 3beta-hydroxylase [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]. BAB62072.1 GI:15005015 [AB054083.1](#)

- GA 3b-OH trigo: AAZ94378 370aa PLN 15-JUN-2006 / gibberellin 3-oxidase 2-2 [*Triticum aestivum*].
ACCESSION AAZ94378.1 GI:74013818 [DQ118251.1](#)

- GA 3b-OH de cebada: AAT49061 369 aa PLN 14-OCT-2004 / GA 3-oxidase 2 [*Hordeum vulgare*].
ACCESSION AAT49061.1 GI:49065952 [AY551431.1](#)

GA 2-oxidasa

A)

```

SbGA2oxC      1  MVVLANPPVVDQIPLLRSPGFRDTFSGVP-----VVDLSSP--AAARAIVDACERF
OsGA2ox3      1  MVVLAQPPAVDHIPLLRSPDGDVFSGVP-----VVDLQSP--CAARAVDACERY
OsGA2ox1      1  MVVPSATTPARQETVVAAAPFAAAAAGVVGSGGGVTTIATVDMSEAERGAVARQVATACAAH

SbGA2oxC      50  GFFKVVNHGVPAA--MGRASEAVRFFAQADKDRAGPAYPFGYGSK-----
OsGA2ox3      50  GFFKVVNHGVATDT--MDKAESEAVRFFSQTQPDKDRSGPAYPFGYGSKRIGFNQDMGWL
OsGA2ox1      61  GFFRCVGHGVPAAAPVAARLDAATAAFFAMAPAEEKORAGPASPLGCGCRSIGFNQDVGEL

SbGA2oxC      -----
OsGA2ox3     108  EYLLALDDASLAD---ACTVPSCAVFRALNEYISGVRKVAVRVMEAMSEGLGIAQADA
OsGA2ox1     121  EYLLHANPAAVAHRARTIDAMDPSRFSAIVNEYIEAMKKLACEILDLLGEGGLGLKDPRY
  
```

B)

```

SbGA2oxA      1  -----SNVVNEYVGCAMRQLACEILDLLGEGGLGLKDPRS
SbGA2oxB      1  -----
SbGA2oxD      1  -----PLCCSCRSALNEYVAARVAVRVLEAMAEGGLGIADAAA
OsGA2ox1     121  EYLLHANPAAVAHRARTIDAMDPSRFSAIVNEYIEAMKKLACEILDLLGEGGLGLKDPRY

SbGA2oxA      34  FSKLITDSDSLLRINHYPPACTIQKLDHDNQCCKMKSFRIKTNGVNOQSAGARIGFGE
SbGA2oxB      1  -----TKGIGFGE
SbGA2oxD      41  LSSMVTGAGGDQVFRVNHYPFPCPALQGLG-----CSATGFGE
OsGA2ox1     181  FSKLITNADSDCLLRINHYPPSCNIHKLDHDDQCNIKSLVSTKASNGGNLMAGCRIGFGE

SbGA2oxA      94  HSDPQILSLLRSNDVDGLQVLLNCD-G--REVWVQVPSDPSAFFVNVGDLLQALTNGKVI
SbGA2oxB      9  HTDPQILSLLRANDVDGLQVLLPDGHGGGDEQWVQVPADPSAFFINVGDLLQALTNGRLV
SbGA2oxD      78  HTDPQLISVLRNNGTSGLOALRDG----AQWVSVPSDRDAFFVNVGDSLQVLTNGRFK
OsGA2ox1     241  HSDPQILSLLRANDVEGLQVFPDHEG--KEMWVQVPSDPSAFFVNVGDVLLQALTNGRLI

SbGA2oxA     151  SVRHRVIANSRCLRSTIYFAAPPLHARILALPETITANSRQYRPFRTWAHEYKKTMYSLR
SbGA2oxB      69  SIRHRVMASTTRPRLSTIYFAAPPLDARVAALPETVTAGAPRRYRFTWAHEYKRAMVALR
SbGA2oxD     133  SVKHRVVTNSLKSRSVSEIYFACPALEQRIVPLPELLAEGEESLYKEFTWGEYKKAAYKTR
OsGA2ox1     299  SIRHRVIATACRPRLSSTIYFASPPHARISALPETITASSPRRYRSFTWAHEYKTTMYSLR

SbGA2oxA     211  LSESRLNLFHIDHDDHSNVKGGEQE-
SbGA2oxB     129  LSENRLDLFHATSGSSRDVIDDDHEQ
SbGA2oxD     193  LGDNRLAQFEKRS-----
OsGA2ox1     359  LSESRLLELFKIDDDSDNASEGKA--
  
```

Fig.A-12: Alineamiento entre secuencias parciales de sorgo correspondientes a cuatro posibles GA 2-oxidosas (SbGA 2oxidosas A, B, C y D), identificadas durante este trabajo de tesis (códigos de las secuencias: SbGA2oxA: SbGSStuc11-12-04.14304.1, SbGA2oxB: PUT-157a-Sorghum_bicolor-8546, SbGA2oxD: SbGSStuc11-12-04.29476.1, SbGA2oxC: SbGSStuc11-12-04.48717.1) y diferentes GA 2oxidosas de arroz. (Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias del alineamiento:

- OsGA2ox1: AAV43914 382 aa PLN 02-NOV-2004 / gibberellin 2-oxidase [Oryza sativa (japonica)]ACCESSION AAV43914.1 GI:55168046 [AC119288.4](#)

- OsGA2ox3: BAC16752 327 aa PLN 26-SEP-2002 / gibberellin 2-oxidase [Oryza sativa (japonica)]ACCESSION BAC16752.1 GI:23491592 [AB092485.1](#)

GAMYB

```

SbGAMYB      1  MYRVKSEGEEDCEMMLQDQMDSPVADDVSSGGGSPHPHRGAGPPLKKGWPWTS AEDAILVD
OsGAMYB      1  MYRVKSESD-CEMHHQ-EQMDSPVADDGSSGG-S--PHRGGGPPLKKGWPWTS AEDAILVD
HvGAMYB      1  MYRVKSESD-CEMMHQEQDQMDSPVGGDDGSSGGGSS--PHRGGGPPLKKGWPWTS AEDAILVD

SbGAMYB     61  YVKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTPPEERLIIQLHAKMGN
OsGAMYB     56  YVKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTEEERLIIQLHAKMGN
HvGAMYB     58  YVKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTPPEERLIIQLHAKMGN

SbGAMYB    121  KWARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRASLPIYPASVCNQSSNEDQQVSGDMNGGEN
OsGAMYB    116  KWARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRASGLPIYPASVCNQSSNEDQQCSSDFDCGEN
HvGAMYB    118  KWARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRASGLPIYPASVCNQSSNEDQQGSSDFDCGEN

SbGAMYB    181  ISNDLLSGNSLYLPDFTSDNFIANPEALSYAPQLSAVSISNLLGQSFASKNCSFMDQVDQ
OsGAMYB    176  LSNDLLNANGLYLPDFTCDNFIANSEALPYAPHLSAVSISNLLGQSFASKSCSFMDQVNQ
HvGAMYB    178  LSSDLLNGLYLPDFTCDNFIANSEALSYAPQLSAVSISNLLGQSFASKNCSFMDQVNQ

SbGAMYB    241  AGMLKQSSCVLPALSDAIDGVLSVDQFSNDSEKLKQALGFDYLNEANASSKSIAPFGVVA
OsGAMYB    236  TGMLKQSDGVLPGLSDTINGVSSSVDQFSNDSEKLKQAVGGFDYLHEANSISKIIAPFGGGA
HvGAMYB    238  AGMLKQSDFLPLGLSDTINGALSSSVDQFSNDSEKLKQALGFDYLHEANSSSKIIAPFGGGA

SbGAMYB    301  LTGSHAFLNGNFSASRPTNGPLKMELPSLQDTESDPNSWLKYTVPAMQPTELVDPYLQS
OsGAMYB    296  LNGSHAFLNGNFSASRPTSGPLKMELPSLQDTESDPNSWLKYTVPAMIQPTELVDPYLQS
HvGAMYB    298  LTGSHAFLNGTFSTSETNGPLKMELPSLQDTESDPNSWLKYTVPAMQPTELVDPYLQS

SbGAMYB    361  PSATPSVKSECASPRNSGLLELLLHEAQALRSGKNQQPSVRSSSSSSAGTPCETTTVVSPE
OsGAMYB    356  PAATPSVKSECASPRNSGLLELLLHEAQTLRSGKNQQTSVISSSSSVGTPCTTTVVSPEF
HvGAMYB    358  PTATPSVKSECASPRNSGLLELLLHEAQGLRSGKNQQLSVRSSSSSSVTPCDTTVVSPEF

SbGAMYB    421  FDMGQEYWEEQPGSFLSEYAHFSGNSLTESTP-VSAASPDFFQFSKISPAQSPSMGSGEQ
OsGAMYB    416  DMCQEYWEEQHPGFFLNDCAPFSGNSFTESTPPPVSAASPDIIFQLSKVSPAQSPSMGSGEQ
HvGAMYB    418  DLCQEYWEERLN- - - -EYAPFSGNSLTGSTAPMSAASPDVFQLSKISPAQSPSLGSGGEQ

SbGAMYB    480  ALEPKHES- - -AASPHENLRPDALFSGNTADPSVIFNNAIAMLMGNGINAEYKHVLGDGV
OsGAMYB    476  VMGPKYEP- -GDTSPHENLRPDALFSGNTADPSVI-----
HvGAMYB    473  AMEPAYEPGAGDTSSPHENLRPDALFSGNTADSSVFNNAIAMLLGNDMNTECKPVFGDGI

SbGAMYB    537  VLDSSSWNNMPHAFQMTEFK-
OsGAMYB
HvGAMYB    533  MFDTSVVSNLPHACQMSEFEFK

```

Fig.A-13: Alineamiento entre el ortólogo de GAMYB putativo para sorgo obtenido a partir de secuencias parciales de sorgo: La primera parte de la proteína (aa 1 a 128; Exón 1) se obtuvo a partir de la traducción de un EST RHOH1_33_H11.g1_A002 (gi|45956698|gb|CN129172.1|CN129172) que no llega a superponerse con las secuencias que abarcan los demás exones. Los aa 129 a 556 están codificados por el GSS contig SbGSStuc11-12-04.10216.1 y del EST cDNA clone DSAF1_41_B03_A011 5' (gi|37708329|gb|CF759104.1).

(Clustal Wallis, Boxshade; LALIGN server).

Referencias de las secuencias del alineamiento:

- OsGAMYB: CAA67000 553aa PLN 18-APR-2005 / transcription factor GAMyB [Oryza sativa].
 ACCESSION CAA67000.1 GI:1707640 embl accession [X98355.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CAA67000.1)

- HvGAMYB: CAA61021 553aa PLN 18-APR-2005 / GAMyB protein [Hordeum vulgare].
 ACCESSION CAA61021.1 GI:1200239 embl accession [X87690.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CAA61021.1)

ANEXO. SEGUNDA PARTE.

En sección se muestran los valores de expresión promedio obtenidos en cada experimento y para cada gen en relación a la *Actina*; el objetivo es mostrar el nivel global de expresión de cada gen con respecto a la *Actina* sin el uso de una escala numérica arbitraria. En la tabla A-3 se muestra el valor de expresión para cada gen relativa a *Actina*, calculado a partir de la diferencia de valores de Ct entre el gen y *Actina*. Esto permite comparar y detectar cambios en el nivel de expresión media de un gen entre diferentes experimentos, por ej., realizados en diferentes momentos del desarrollo. Para esta comparación se asume una eficiencia máxima e igual para todos los pares de *primers*; sin embargo, aunque esto no es cierto en ninguno de los casos, este análisis es solo orientativo, y los valores de expresión relativa no pretenden una exactitud cuantitativa. Los valores se presentan gráficamente en las Figuras

Tabla A-3: Valores de Ct promedio obtenidos para los diferentes genes analizados; el Ct promedio se calculó con los valores de Ct individuales de todas las muestras en un mismo experimento o medición (cada valor de Ct individual es el promedio de dos duplicados de reacción). La diferencia el Ct promedio de cada gen y el Ct promedio de *Actina* ("x") permite calcular la expresión relativa global de cada gen con respecto a la *Actina* dentro de cada experimento (valor "y"). Un mayor Ct implica un mayor n° de ciclos para alcanzar el valor umbral de fluorescencia, o sea un menor n° inicial de moléculas. Para la siguiente relación se consideró una eficiencia máxima, donde el n° de moléculas se duplica en cada ciclo. En la última columna se calculó el valor de expresión promedio para cada gen con respecto a la *Actina*, a partir de la diferencia entre valores de Ct promedio. La primer parte de la ecuación asigna el signo (+ ó -) al valor "y"; el segundo término calcula el cambio en el n° de moléculas asociado a un n° de ciclos de PCR.

Serie G (30 DPA - 2004)

Nombre gen	Ct promedio	x = Ct gen- Ct Actina	y = (x /-(x)) . 2 ^(x)
CPS	25,2	0,7	-1,6
KSB	27,0	2,5	-5,6
EKO	26,0	1,5	-2,8
EKAH	24,9	0,5	-1,4
GA-20 oxidasa 1	29,4	4,9	-29,9
GA-20 oxidasa 2	26,0	1,5	-2,8
GA-3b-hidroxilasa	24,7	0,2	-1,1
GA-2 oxidasa C	25,6	1,2	-2,2
GA-2 oxidasa A	24,5	0,0	1,0
GA-2 oxidasa D	26,8	2,3	-5,0
GAMYB 2003	24,8	0,3	-1,2
GAMYB 2005	23,1	-1,4	2,6
PKABA	23,6	-0,9	1,8
ABI 1	22,0	-2,5	5,6
ABI 4	22,8	-1,7	3,2
VP1	23,8	-0,7	1,6
ABI 5	26,7	2,2	-4,7
RAB28	19,4	-5,1	34,5
ACTINA	24,5	0,0	1,0

Serie A (30 DPA - 2006)

CPS	24,4	2,7	-6,6
KSB	25,9	4,2	-18,4
EKO	22,5	0,8	-1,8
EKAH	22,7	1,0	-2,1
GA-20 oxidasa 1	28,7	7,0	-128,2
GA-20 oxidasa 2	23,5	1,8	-3,6
GA-3b-hidroxilasa	25,3	3,6	-12,4
GA-2 oxidasa C	23,9	2,3	-4,8
GA-2 oxidasa A	22,9	1,2	-2,3
GA-2 oxidasa D	26,7	5,0	-32,1
GAMYB 2003	22,1	0,5	-1,4
GAMYB 2005	21,4	-0,3	1,2
PKABA	23,9	2,2	-4,6
ABI 1	21,2	-0,5	1,4
ABI 4	21,5	-0,1	1,1
VP1	21,0	-0,6	1,6
ABI 5	24,1	2,5	-5,5
RAB28	18,0	-3,7	12,8
ACTINA	21,7	0,0	1,0

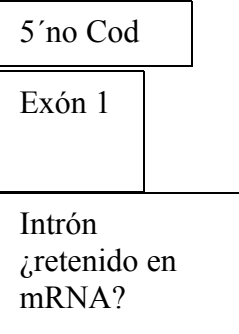
Serie P (42 DPA - 2006)			
Nombre gen	Ct promedio	x = Ct gen- Ct Actina	y = (x /-(x)) . 2^(x)
CPS	23,9	1,7	-3,2
KSB	24,9	2,7	-6,5
EKO	21,2	-1,0	2,0
EKAH	21,8	-0,4	1,4
GA-20 oxidasa 1	30,0	7,8	-220,8
GA-20 oxidasa 2	25,9	3,7	-13,1
GA-3b-hidroxilasa	25,9	3,7	-13,0
GA-2 oxidasa C	25,9	3,7	-13,2
GA-2 oxidasa A	22,4	0,2	-1,1
GA-2 oxidasa D	28,0	5,8	-56,0
GAMYB 2003	20,2	-2,0	4,1
GAMYB 2005	20,2	-2,0	4,0
PKABA	22,7	0,5	-1,4
ABI 1	20,4	-1,8	3,5
ABI 4	20,8	-1,4	2,6
VP1	21,8	-0,4	1,3
ABI 5	24,3	2,1	-4,2
RAB28	15,8	-6,4	83,6
ACTINA	22,2	0,0	1,0
IS9530 (embriones en agua/ABA)			
GA-20 oxidasa 1	29,4	4,6	-25,0
GA-20 oxidasa 2	25,1	0,3	-1,2
GA-3b-hidroxilasa	24,7	-0,1	1,1
GA-2 oxidasa C	21,1	-3,7	13,1
GA-2 oxidasa A	23,1	-1,7	3,3
GAMYB 2003	21,5	-3,4	10,2
GAMYB 2005	20,8	-4,0	15,7
ABI 1	21,6	-3,2	9,3
ABI 4	24,2	-0,6	1,5
ABI 5	25,9	1,1	-2,1
ACTINA	24,8	0,0	1,0
RedlandB2 (embriones en agua/ABA)			
GA-20 oxidasa 1	28,3	2,8	-7,1
GA-20 oxidasa 2	25,6	0,1	-1,1
GA-3b-hidroxilasa	23,4	-2,1	4,3
GA-2 oxidasa C	23,0	-2,5	5,6
GA-2 oxidasa A	23,1	-2,4	5,3
GAMYB 2003	20,8	-4,7	25,8
GAMYB 2005	20,5	-5,0	31,3
ABI 1	21,7	-3,8	14,1
ABI 4	23,2	-2,3	4,9
ABI 5	27,1	1,6	-3,0
ACTINA	25,5	0,0	1,0

ANEXO. TERCERA PARTE.

A continuación se detallan las secuencias de sorgo obtenidas en PlantGDB y que codifican para una hipotética proteína con alta identidad con GAMYB de otras especies. Los límites de exones e intrones se definieron a partir de los alineamientos de los EST de sorgo con secuencias de ADN genómico, y por comparación con las secuencias de proteínas de referencia (GAMYB de cebada y arroz).

> [PUT-157a-Sorghum_bicolor-3768](#) (incluye EST45956698) (aa 1 a 127)

```
TCTGGTGTAGTGGTGGCGGCATCTCGCTTAGGGGAGATCCCCCTCCTCCCCGGTTCACCCCTCTGCTCTGCTCCAC
CCGAGTCGACTCCTTCCCTTGCAATCCGCTGCTGGTCAGCTCACAGCAGCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGTCCATTGGAGG
AGCTCAGCTAGGCTCCACGCTGGGCTCGATCGGCACCCGGTGTGCGGAGATTCCGCGAGCGCGCCATGTACCGGGTAAA
AGCGAGGGCGAGGGCGACTGCGAGATGATGCTGCAGGACCAGATGGACTCGCCGGTGGCCGACGCTGAGCAGCGGAGG
CGGGTGCCTCATCTCACAGGGGCGCCGGGCCGCCCTGAAGAAAGGGCCATGGACGTCGCGGAGGACGCCATCTCTGG
TGGACTACGTCAAGAAGCACGGCGAAGGGAAGTGAACCGCGGTGCAGAAGAACACCGGGCTGTTCCGCTCGCGCAAGAGC
TGCCGCTCCGCTGGGCGAACCACTCAGGCCAACCTCAAGAAGGGGCGCTTACCCCGGAGGAGGAGCGCCTCATCAT
CCAGCTCCACGCCAAGATGGGGAACAAGTGGCAAGGATGGCTGCTCATGTAAGTGCCTAGCCGAAATACTTGATCCCT
GTGCTGCACTTCTTTCGCACATCCGTATTTTCGTATTTTCAGTCTGCACATGTCGAATACTTGATCCCTGCTCTGGGGTCT
GATCAGGTGAAGTTTCCAGGAGAAATTGATGTTGCTGGGTCTTTATTACGTACGTGCAGTCTTTAATTCAGGATGTG
TATTTCTGTAGTTATTTAGCGAATTATTTCTGTTTTGTGTACGTACTGGAAGTGT (..... INTRÓN.....?????)
```



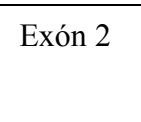
Traducción de la secuencia [PUT-157a-Sorghum_bicolor-3768](#) (aa 1 a 128)

> PUT-157a-Sorghum_bicolor-3768 frame+2, 337 bases, A63 checksum.

```
WTLSQLQSSSSSLFLLLKTLSP*PENSPHTLVLSGGGISLRRDPPPPPVST
PLLCSRTRVDSFPCNPLLVSSOQQRRRRRSPLEELS*APRWARSAPAAARE
RERAMMYRVKSEGEGDCEMLQDQMDSPVADDVSSGGGSPHPHRGAGPPLK
KGPWTSAEDAILVDYVKKHEGGNWNAVOKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRP
NLKKGAFTPEERLIQLHAKMGNKWARMAHVSA*PKYLIPCAALLLHI
RISYFSLHMSNT*FPALGSDQVKFPGRIDVDFVGSLLRTCSL*FRMCISVV
I*RIILFCVTYWNCNDLSMLQ*LVWFSTLIQ*IPIWV
```

>SbGSStuc11-12-04.10216.1-, Reverse complementary sequence of SbGSStuc11-12-04.10216.1 + EST37708329 rev compl.

```
CTCAGTTGCCAGGGCGTACTGACAATGAAATTAAAAATTACTGGAACACTCGAATAAAGAGATGTCA
ACGAGCTAGCCTTCTATCTATCCTGCAAGTGTATGCAATCAATCTTCAAATGAAGATCAGCAAGTGTCTGG
TGATTATAATGGTGGCGAGAACATATCCAATGATCTTCTATCCGGGAACAGCCTTTATCTACCAGATTTTACCAGTGACA
ATTTCATTGCTAATCCAGAGGCTTTATCATATGCACCACAGCTGTGACGTGTTTCAAATAAGCAATTTACTCGGCCAAAGC
TTTGCATCAAAAACTGTAGCTTCATGGATCAGGTAGACCAAGCAGGGATGCTGAAACAATCTAGCTGTGTGCTTCTCTGC
ATTGAGCGATGCCATFGACGGTGTGCTTTCTCAGTTGATCAATTTCAAATGACTCTGAGAAGCTCAAGCAAGCTTTAG
GTTTTGATTATCTTAATGAAGCCAATGCTAGCAGCAAGAGTATTGCACCTTTCCGGGGTTGCACCTTACTGGCAGCCATGCC
TTTCTAAATGGCAACTTCTCTGCTTCTAGGCCACAAATGGTCTTTGAAGATGGAGCTCCCTTCACTCCAAGATACTGA
ATCTGATCCAAATAGCTGGCTCAAGTATACTGTGGCTCCTGCAATGCAGCCTACTGAGTTAGTAGATCCTTACCTGCAGT
CTCCATCAGCGACCCCTTCAGTGAATCTGAGTGTGCATCGCCGAGGAACAGTGGTCTTTTGGAAAGAGCTGCTTCATGAA
GCTCAGGCACTAAGATCTGGGAAGAACCAACAACCATCGGTCCGAAGTTCAGATTCTTCTGCTGGCACACCTTGTGAGAC
```

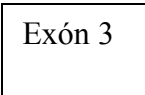


GAMYB(E2) Fw →

```
TACTACGGTGGTTAGCCAGAGTTTGATATGGCCAGGAATATTGGGAAGAACAGCCTGGTTCCTTTCCTCAGTGAATATG
CTCATTTTAGTGAAATCTTTGACCGAATCCACTCCTGTAGTGTGCGTCACCTGATTCTTTTCAGTTCTCCAAAT
```

← GAMYB(E2) Rev

```
TCTCCTGGTGAGACTGCTGACCCTTTCTTTCAATAATTGATTGATTAGCTCAGTTACTAGAGGCTTATTCATTTGCAGC
ACAAAGCCCTTCAATGGGCTCTGGTGAGCAGGGCGTTAGAGCCTAAACATGAGTCAGCAGCTTCACTCA ( TCCGAAAACT
TGAGGCCTGATGCATTATTTCTTGGGAACACAGCTGATCCATCCATTTTCAACAATGCCATAGCAATGCTCATGGGCAAT
GGCATTAATGCTGAGTCAAAACATGTTCTTGGTGATGGAGTTGTGCTCGATTCTTCTCGTGGAACAACATGCCACATGC
TTTTCAATGACGGAATCAAATGAGTTCCATGTACTTCTTTGTGATTCTGAAGGGCTTCTGCTGCTTGTTTGGGGTC
```



AAATATCATGGGAAGGCCTCA) TTGATTGTGATGCTGCATTCCTGACAGTGATCCTTGAGGGCGTGCAGGTGCAGCGGCTACC

GAMYB (E3) Fw →

← GAMYB (E3) Rev

ATGTTATCTTCATGTGAATAGTCCFTTTGTCTAATAAAGTGCATGAAGATAACCGGATAATATTTTTTTTGTCTTTGATT
AGAGAACCGTTTTTGTTCATCCCTGTCAGGATTATGTTGGAACCGTGCATGATTTTTTGTGAACAATTTAATATCGGTT
ATTGATATTGTGCTGTGTGCTATCCCTGGTGCATTTGCATGTGGGTAGCAATTTGTTTAAAGTATACACCGTCATGCTG
CTGGCACATCGTTTTGTGCAATATTGATGGTTTTTTAGATGTCCATTAATTTGCAATATGAAACTCAGAAATATATATGCAT
GTTTCATGTTTTGTGCTCCTGAAGTCCGATTGAGTGAAAGCGCCAATCCTTTGCACCACAGTTCTAGCTTCCCTGCCTT
TGAAAATCTGCTAGCTTTAGCTGATGGCTGAAGGAAAAGGCAAGGATAAGATGCCAGGTGATGAATAATTAAGGTTGTAA
TATTGTGGCTTCAGAGTTGGAACCCAAAAGGTGTTGTATCATCTACGACACTAGGAGGCCGCGACACTGCACGGTCGCAA
ACAGTGTGTACCTAACTGCTCTGATATCAGTTCCTTGCGTTGGATTTCGTCCTTTTGGTTTCACACGATCAATTCGTTTAT
TCGTTTCATTCCTGTGCTGCATATCCTCGTACTTAGTATTTATTTTTTTATCACGCTTTCTTGTTCATTGGGCCTGCAA
GGTGAAGCCATGTCACCCCTCGGACTCCATTTGAATCCAGGACTCTCAAAGTAGTAATAGTTTAAACAGAGATGATT
TAACTAGTTGTCAATGTAAATCCTAGCGGAATTTGGAAGGTAGGTATCTTCTAATGAAGCATTTAGATGGTACACGTGA
AGAATTAAGAAGACAAGACAATATACACAAACGAAACTTTCCAAGTGTGAACCCATCT

3'no Cod

Referencias:

En negrita: regiones que se transcriben según los EST. **En sombreado gris:** porciones no codificantes (intrones, región 5' y 3'). **En negrita y subrayado:** región del GSS contig alineada con el EST 37708329.

En amarillo: prolongación de la secuencia en sentido 5' por el EST 37708329.

La región entre paréntesis y en itálica en el exón 3 está ausente en el EST 31344700 pero no en los otros (ver Fig.A-14), y sería un caso de eliminación parcial de intrón.

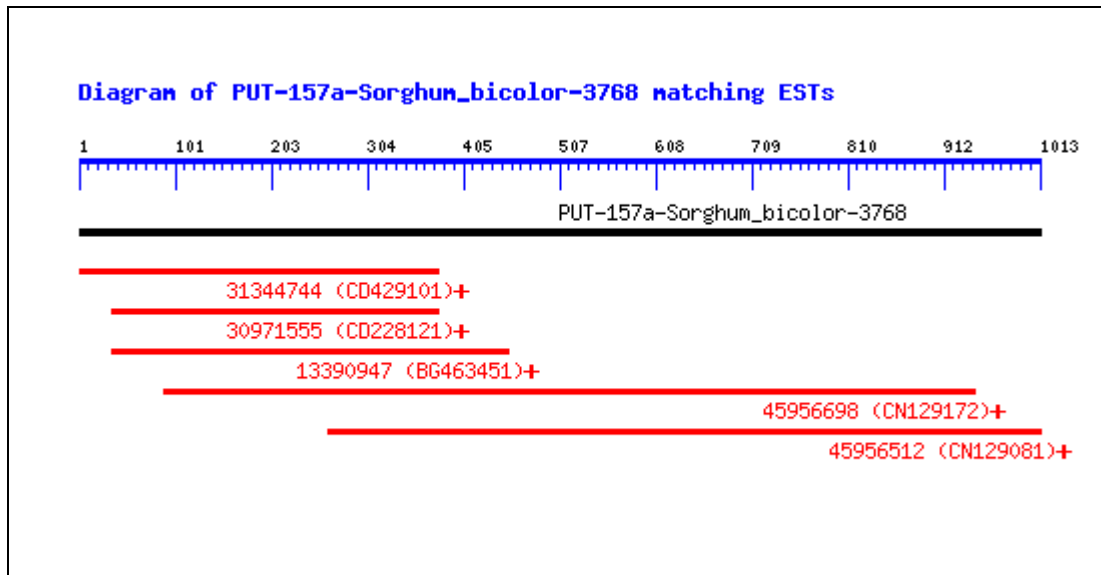
Traducción de la secuencia SbGSStuc11-12-04.10216.1 + EST37708329 rev compl. (se eliminó el intrón de 72 nt ubicado entre los exones 2 y 3): Abarca los últimos 428 ó 429aa de GAMYB.

>, frame+3, 555 bases, 4E3 checksum.

QLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRASLPIYPASVCNQSSNEDQOVSGDYNGGENISNDLLSGNSLYLPDFTSDNFIAN
PEALSYAPQLSAVSI SNLLGQSFASKNCSEFMDQVDQAGMLKQSSCVLPALSDAIDGVLSSVDQFSNDSEKLGQALGF
DYLN EANASSKSIAPFGVALTGSHAF LN GNFSASRPTNGPLKME LPSLODTE SDPNSWLKYTVAPAMOPTLVDPYL
QSPSATPSVKSE CASPRNSGLLEELLHEA QALRSGKNQOQPSVRSSSSSAGTPCETTTTVVSPFEFDMGOEYWEEQPGSF
LSEYAHFSGNSLTESTPVSAASPDFFQFSKISPAQSPSMGSGEQALEPKHESAASPHPENLRPDALFSGNTADPSIF
NNAIAMLMGNINA EYKHVLGDGVVLDSSSWNNMPHAFQMT EFK*VPCTSL*F*RASCCLFWGQYHGRPH*L*CCIP
DSDP*GRAGAAATMLSSCE*SFCLIKCMKITG*YFFCFVLENRFCHPCQDYVGNVS*FLFEQFNIGY*YCAVCYPLV
HLHVGSNLFKYTPSLL

Fig. A-15. Esquemas extraídos de PlantGDB que muestran **a)** los EST's incluidos en el PUT-157a-Sorghum_bicolor-3768 PlantGDB-assembled Unique Transcript-fragment derived from Sorghum_bicolor mRNAs Jan_28_2007 (based on GenBank release 157) y **b)** las secuencias de ADN genómico y transcritos (EST) que abarcan los exones 2 y 3 de la hipotética proteína ortóloga de GAMYB.

a)



b)

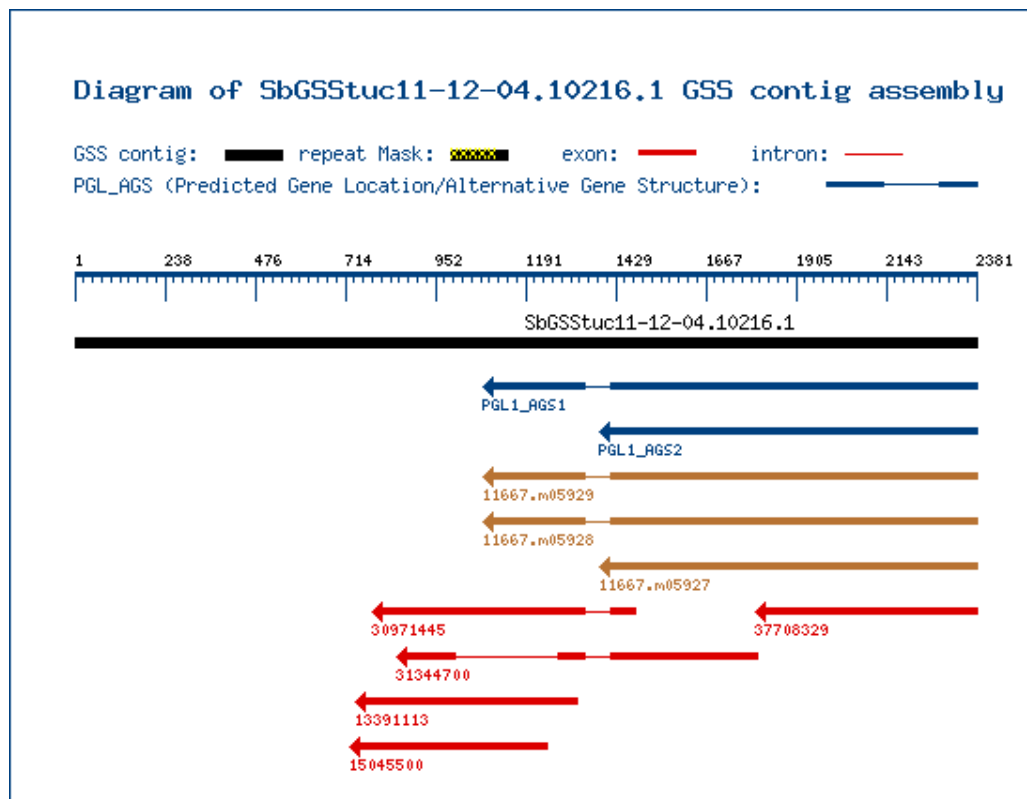
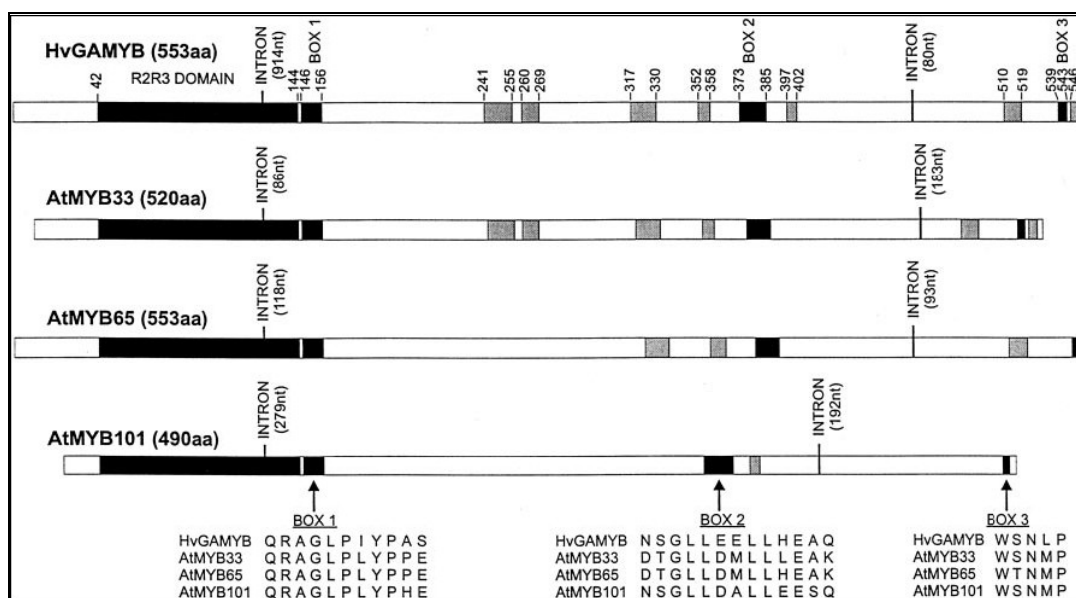


Fig. A-16: Secuencia hipotética para la proteína GAMYB de sorgo (557aa). Se muestra la ubicación de intrones y dominios conservados. Abajo se muestra un esquema extraído de Gocal et al. (2001), donde se puede observar la estructura de GAMYB y genes homólogos.

1-
 MYRVKSEGE GDC E M M L Q D Q M D S P V A D D V S S G G G S P H P H R G A G P P **L K K G P W T S A E D A I L**
V D Y V K K H G E G N W N A V Q K N T G L F R C G K S C R L R W A N H L R P N L K K G A F T P E E R L I Q L H A K M
G
N K W A R M A A H -128 (intrón?)
 129-
Q L P G R T D N E I K N Y W N T R I K R C Q R A S L P I Y P A S V C N Q S S N E D Q Q V S G D Y N G G E N I S N D L L
 S G N S L Y L P D F T S D N F I A N P E A L S Y A P Q L S A V S I S N L L G Q S F A S K N C S F M D Q V D Q A G M L K Q S S
 C
 V L P A L S D A I D G V L S S V D Q F S N D S E K L K Q A L G F D Y L N E A N A S S K S I A P F G V A L T G S H A F L N G N F
 S
 A S R P T N G P L K M E L P S L Q D T E S D P N S W L K Y T V A P A M Q P T E L V D P Y L Q S P S A T P S V K S E C A S P
 R
N S G L L E E L L H E A Q A L R S G K N Q Q P S V R S S S S S A G T P C E T T T V S P E F D M G Q E Y W E E Q P G S F
 L S
 E Y A H F S G N S L T E S T P V S A A S P D F F Q F S K I S P A Q S P S M G S G E Q A L E P K H E S A A S P H P E N L R P D
 A
 L F S G N T A D P S I F N N A I A M L M G N G I N A E Y K H V L G D G V V L D S S S **W N N M P** H A F Q M T E F K -557
 Referencias:
En verde: BOX1, BOX2 y BOX3.
Negrita y subrayado: Dominio R2R3 de unión al ADN, característico de factores MYB.



ANEXO. CUARTA PARTE.

Identificación de la región promotora de *SbABI4* y *SbGA 2-oxidasaC*.

Identificación de la región promotora de *SbABI4*:

Se identificó la región 5' no codificante para el gen putativo *SbABI4* en el GSS contig *SbGSStuc11-12-04.6057.1* a partir del sitio probable de inicio de la traducción según el alineamiento con la proteína ABI4 de maíz. No se encontraron ESTs de sorgo alineados con este GSS contig que mostraran el sitio probable para el inicio de la transcripción. En la secuencia de abajo se muestran el posible sitio de unión de la ARN polimerasa, TATA box, y la secuencia adyacente que contiene un sitio de unión para ABI4, denominado *coupling element* (CE) y que está conservada en los promotores de ABI4 de arroz, *Arabidopsis* y maíz.

>*SbGSStuc11-12-04.6057.1*-, Reverse complementary sequence of *SbGSStuc11-12-04.6057.1*

```
TCGTAAGAATTTTTTCAGTTATTTACAACAGATATAGTAGGAGTAGCTGTATACTCCCTCTATTAAAGGATACTCGGTAATTGATTCCTGTTGG
TTCCGCTCATTGCGTGAGAACATGAATTTTAAGTGTGACTATATCAAGCAGGAGGCTTTATTACTCCTATACCCGTTGATATTACTGGGAAATGGA
GTTGACCGCTGCGTGCATGCAGTAGTCATTTCCAAGAAGCTTTCAACCAAGTTGTTGACAGTGCGACACGAAGGAAGCCGTAGAGTAAATTTCAATC
TGTTGGACGATCGATCCAAGTGAAGTGCCATTGATACAGAGAGACGTTGGCACATCATCAAAGTCATCTACTAGACACAGACCACATCGATCCTGTC
TCCCTGCATGCATGCATGCATGAGCCAGCAAGTGAGAAGCCAATTTGCTCCATCAATCTGTGCTTGTCTGTACCCGCGATTACTCCAACGATTTACCG
CATGCATGGCATCGACTGGCCAAAGTTGTTTTTGTGTTTCAATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTGGATGCTCAAGGCTGCTCGCTGTACTGCACTCTGTACTCTCTCAGCTCTCTT TATATTTGAC CACCGCCCCTCTCCACCAAGCGCATCCACCTCG
GCCTCCATCCCTAGCGCTCTTGCCCAAAGCACACGCCGCCGAGAGAGACAGACACCACCACCTCTCCCTCACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTAC
CCCATCCCTCTCTCTCTCTCATATACCTGCTTCTCTCC ATGGAACCCAACAACAATCAGCCCGCGGCCACGGCCGAGGAAGCTGCGGCAGGCAG
CGGCCCGCGCGGAGAAGCGGGGGAAGGGCAAGGGCCCAAGGGCGGCCGAGAACGGCAAGTTCCGGTACCGCGCGCTGCGGCAGCGGAGCTGG
GGCAAGTGGGTGGCGAGATCCGGGAGCCCGGAAGCGCTCCCGCAAGTGGCTCGGCACCTTCGCCACCGCCGAGGACGCCCGCGCGCTACGACC
GCGCCGCGCTCTCTCTCTACGGCCCCCGCGGCACCTCAACGTCACCTCCCCCGCCGCGCTACGCTCGCGCGCGCGCTCGCACCCGCACTCTCTC
CGCGACGTCGTCGTCGTCCTCCCGCCAGCGCTCCGGCCGCTCTGCCCGCCCGCCGCTGCACCATCAGCTCTCCAGCGCGCCCTGTGCTCCTGCA
CCGGAATTTCCACCACCACCACCAGCAGTTCAGTGCACCCACTCTTGCCGCGAGGCGAGCCGACACCCGCGCTATACTACGCCAACACGGCCACGG
CGTCCACGGTCAACCACACTGTGCGGACACGGGTGGCGGTTCCCGAGGAGCGCGCTCGCGCCGCGAGTAGGTTCTCTGACATCTCTACAGGAGCC
GCAGGCGAGTACGCCGAGGAGGCGCCAGGGAGACAGGGTGGGACTACCACGGCGCGAGGAGGAGGACTACGCCGCGCGCGCTGCTCTGGGACGAG
CCGGAGCCCTTCTCTGTTGATGCTTCTCAAGTGATGATCAGCACGACGCTTCTTAATTGCGTGCCGGTTGCCAGCACCCCTGCTTGCTCGGTT
TGAAGTTTCGGAGTGACGGCAGCTCATGCTCCTGCATCTGCATCACTGCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTC
ATAGGCTTACTAGCTAGGTTTCTGATTCCTTTGTAATAAATTAATTTTATAGATTTTAAATCATTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGAGGTATAGTAAGGTGAGGTGGTATTACAGGAGGGATTTAGGTTTCGCTGTTGATTTACAGATTCATTTGAATCACATCGTGTCCATTTCTTGC
ATGGATCCTTCATGCATGGATGCAGTCTATTTAATGATTTGCATATATAAAATCAGAGATGCAACAATTTCCCCCTTGATCTCTGTTTTCTCC
TTTCAATTGTTGAATTTAGTACACATAAATCGAGGCTCCAGC
```

Referencias:

Texto normal: Región 5' no codificante.

Subrayado y negrita: región codificante del gen.

Sombreado gris: Región 3' no codificante del gen.

El gen *SbABI4* parece no tener intrones, y tiene 257aa. Resultado de la traducción de la secuencia ***SbGSStuc11-12-04.6057.1***-(Reverse complementary):

>/tmp/outseq.input.19997 [Unknown form], frame+2, 1021 bases, 122F checksum.

```
RKEFFSVIYNRYSRSSCILPLLKDTR*LI PCWFRSLRENMFKC*LYQAGGFITPIVDITGKWS*PLRACSSHFQEFNQVVDSATRRKP*SKFQS
VGRSIQVKCH*YRETLAHHQSHLLDTHIDPVS LHACMHEPASEKPIAPSI CACSVPRLLQRFTACMASTGQSCFLFSILSLSLSLSHQP*SIIHPFH
WMLKAARCTALCTLSALFIFDHRPSPPSASTSASIP SALAPKHTPPQRDRHHHPSLTSLSLSLPHSPSSLSYTLTPS MEFNNNQPAATAFEAAAGS
GPGGEGGRKQKPKGGPFKRYRQVRQRSWGWVVAEIREPRKRSRKWLGFATAEDAARAYDRAALLLYGPAHLNVTSPPPPTLAAPRSHPHSS
ATSSSSAPPALRPLRPPPLHHQLSSGACAPADPFHHHHQFOCHLLPOAQOPTPLLYANTATASTVTTTVPTRVAVPQEPVAVPAPVGSSTSLQEP
QASTPEEAPRETGWYDHGGEEDYAAALLWDEPEPFWFVDVFLK**SARRFLIACRLPAPCLVGLKFRSDGSSSCSCICITALHACVVGSN*ASKKGR
*AY*LGFLIPL**IIFRFFLISFFFFP*ECD*GIVR*GGITGRDLGFAVDLQIQFESHVRVHFLHGSFMHGCSLFDNLHI*KSEMQQFSPLDPLFSP
FNC*ILVHINRGSS*LLVLI*LVF*FLQLRTEYL*CIYMTACKSWFHGSI*PSSAILHIPLYPEMGI STTTQHLF*FPTIYCPLO*SVIHRFDSFA
NLHFS DASVVCRFHMSPLFFSFLAYSLLTDIFMPYFCLLQSPQFPRLTYTIFHIVSMIRN*ISVFLQPHCSLL*QHSAM*SNLRGASIQEHR
RLTYSTVLDNKPYVLDLASPVARAFAQGYIYITASFYDYNFNVECLCRGPRMRLSATVF*KNKKILCRPALDKGFF*KIKKILCRG PALGKGLLK
KIKNFLCRRPALGKETANGTMTAAFLCRVPDKGPSAKTLP LPSKTFPRDL
```

Subrayado: Secuencia hipotética de la proteína *SbABI4*, usando como referencia la secuencia de la proteína ABI4 en maíz.

Análisis de la región promotora del gen *SbGA-2 oxidasaC*.

Se analizó una secuencia que abarca las primeras 557 bases del GSScontig (SbGSStuc11-12-04.48717.1 Largo = 976 pb) que abarca la primera parte de un gen que codifica para una GA 2-oxidasa putativa, denominado *SbGA2oxC*. A partir de la base 558 comienza el alineamiento con un EST (alineado con las últimas 419 bases del GSS y que codifica para los aa 1 a 96 de la proteína ortóloga de arroz y el sitio probable de inicio de la traducción). Abajo se muestra la lista completa de elementos cis-regulatorios identificados por el programa Web Signal Scan Program en la base de datos PLACE. Se resaltaron en recuadros aquellos elementos que están relacionados con la regulación por ABA.

>SbGSStuc11-12-04.48717.1 Length = 976 pb >/tmp/outseq.input.10388 [Unknown form], reverse complement, 976 bases, 84A checksum.

```
AGAAAGGATACCGGATCAAGGGCAGGTTTCATCTCATCTTTAGGTCTTCCCTAACCAACATCATCTTCACTGTCTCA
CGTAGTACGCACTCTTATCTGATCCGCTCATGTCTGCCCTGATCAGAGCGGTCCCGGTGCCGGCGTGGTTAACGGG
AGGGAGGGAGGGACTGGGAGCTAGGGCCGGGCGCCGTGGGAAAACCTGCTATTGGCCGGCGTGCCATCGCCTCGTATC
GTATGCGTCTCCATGGAGCCATGCATGCAGCGCGGGCCGACCTGCCACCGGTGGATCGCGTCCGGACACGTCG
CGCCCCGACCCCGACTGCCCTGGCTCCATCGGCACCGTGCACCAAAGCGATCCCACCCCGATGCATCCTTTTCG
TCTCCCTGTCAGCTGGGTCCCATCCAGCCAGGTGCCGCTCGTCCCTTCTCGCTTCGCTCCGGGCGGGGCTCCTCCT
CGTGCTCGTCCCGGCACAGGCTTGAGACGATCTATATATATACGCCCCACGAGCTCTCCAGTTCTCCCCACATGC
ACTTGCTGCAGCAACCGTAGTACACAAGCACACACCCTCGTCTCCACCTCCCTGTTCTCAGCGTGCCTTGCCCTG
TTTCGACCTCCTCTGCTCATCCGCTCCCTCGCCCGCCACGCCCCACCGTAGTACAGGCGGGCAGACAGCCATGGTG
GTGCTCGCCAACCCGCTGTGCTCGACCCAGATCCCGCTGTGCGGTCCCGGGGCCAGGGACACCTTCTCGGGCGT
GCCGGTTCGTCGACCTGTCCAGCCCCGCCGCGCGCGCGATCGTTCGACGCTCGGAGCGCTTCGGCTTCTTCAAGG
TCGTCGAACCAACCGCGTGCCTCGGCCACCATGGGCGAGGCGGAGTCCGAGGCGTCCAGGTTCTTCGCGCAGGCGCAG
GCCGACAAGGACCGCGCCCGGCCGCTACCCGTTTCGGCTACGGCAGCAAGC
```

Referencias:

Texto normal: región 5' no codificante y que no se transcribe. Esta secuencia se usó para el análisis de elementos cis-regulatorios.

Negrita y subrayado: región alineada con la GA2ox3 de *Oryza* (1-96 aa).

Subrayado: Alineamiento con el EST: gjj13239909|gb|BG357923.1|BG357923 EST

OV2_32_A01.b1_A002 Ovary 2 (OV2) *Sorghum bicolor* cDNA, mRNA sequence 446 pb.

El recuadro muestra el posible TATA box.

Web Signal Scan Program. Database searched: PLACE

This is the sequence you submitted

>./././tmp/sigscan//signalseq.12243 [Unknown form], 557 bases

```
AGAAAGGATACCGGATCAAGGGCAGGTTTCATCTCATCTTTAGGTCTTCCC
TAACCAACATCATCTTCACTGTCTCACGTAGTACGCACTCTTATCTGAT
CCGCTCATGTCTGCCCTGATCAGAGCGGTCCCGGTGCCGGCGTGGTTAA
CGGGAGGGAGGGAGGGACTGGGAGCTAGGGCCGGGCGCCGTGGGAAAAC
GCTATTGGCCGGCGTGCCATCGCCTCGTATCGTATGCGTCTCCCATGGAG
CCATGCATGCAGCGCGGGCCGACCTGCCACCGGTGGATCGCGTCCGG
ACACGTCGCGCCCCGACCCCGACTGCCCTGGCTCCATCGGCACCGTGC
CCCAAAGCGATCCCACCCCGATGCATCCTTTTCGTTCCCTGTCAGCTG
GGTCCCATCCAGCCAGGTGCCGCTCGTCCCTTCTCGCTTCGCTCCGGG
GGGGCTCCTCCTCGTGTGCTCCCGGCACAGGCTTGAGACGATCTATAT
ATACGCCCCACGAGCTCTCCAGTTCTCCCCACATGCACTTGCTGCAG
CAACCGT
```

RESULTS OF YOUR SIGNAL SCAN SEARCH REQUEST

../../../../tmp/sigscan//signalseqdone.12243: 687 base pairs
Signal Database File: user.dat

Factor or Site Name	Loc.(Str.)	Signal Sequence	SITE #
ABRECE1HVA22	site 278 (+)	TGCCACCGG	S000014
ABRELATERD1	site 76 (-)	ACGTG	S000414
ABRELATERD1	site 302 (-)	ACGTG	S000414
ACGTABREMOTIFA2OSEM	site 300 (-)	ACGTGKC	S000394
ACGTATERD1	site 77 (+)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site 303 (+)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site 77 (-)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	site 303 (-)	ACGT	S000415
ARFAT	site 71 (+)	TGTCTC	S000270
AUXREPSIAA4	site 401 (+)	KGTC CAT	S000026
BIHD1OS	site 392 (+)	TGTCA	S000498
CAATBOX1	site 204 (-)	CAAT	S000028
CACFTFPPCA1	site 68 (+)	YACT	S000449
CACFTFPPCA1	site 87 (+)	YACT	S000449
CACFTFPPCA1	site 539 (+)	YACT	S000449
CACFTFPPCA1	site 81 (-)	YACT	S000449
CACFTFPPCA1	site 558 (-)	YACT	S000449
CACFTFPPCA1	site 667 (-)	YACT	S000449
CBFHV	site 271 (+)	RYCGAC	S000497
CCAATBOX1	site 204 (-)	CCAAT	S000030
CGACGOSAMY3	site 304 (-)	CGACG	S000205
CGCGBOXAT	site 262 (+)	VCGCGB	S000501
CGCGBOXAT	site 262 (-)	VCGCGB	S000501
CIACADIANLELHC	site 353 (+)	CAANNNNATC	S000252
CURECORECR	site 82 (+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site 559 (+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site 668 (+)	GTAC	S000493
CURECORECR	site 82 (-)	GTAC	S000493
CURECORECR	site 559 (-)	GTAC	S000493
CURECORECR	site 668 (-)	GTAC	S000493
DOFCOREZM	site 3 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site 354 (+)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site 37 (-)	AAAG	S000265
DOFCOREZM	site 379 (-)	AAAG	S000265
DPBF COREDCDC3	site 561 (+)	ACACNNG	S000292
DRECR COREAT	site 271 (+)	RCCGAC	S000418
E2FCONSENSUS	site 204 (+)	WTTSSCSS	S000476
EBOXBNNAPA	site 395 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 414 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 533 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 539 (+)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 395 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 414 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 533 (-)	CANNTG	S000144
EBOXBNNAPA	site 539 (-)	CANNTG	S000144
GADOWNAT	site 300 (-)	ACGTGTC	S000438
GATABOX	site 7 (+)	GATA	S000039
GATABOX	site 93 (-)	GATA	S000039
GATABOX	site 228 (-)	GATA	S000039
GCCCORE	site 419 (+)	GCCGCC	S000430
GGTCCCATGMSAUR	site 401 (+)	GGTCCCAT	S000360
GT1CONSENSUS	site 193 (+)	GRWAAW	S000198
GT1CORE	site 145 (+)	GGTTAA	S000125
GTGANTG10	site 67 (-)	GTGA	S000378
GTGANTG10	site 75 (-)	GTGA	S000378
IBOX	site 91 (-)	GATAAG	S000124
IBOXCORE	site 92 (-)	GATAA	S000199
IBOXCORENT	site 90 (-)	GATAAGR	S000424
LTRECOREATCOR15	site 272 (+)	CCGAC	S000153
LTRECOREATCOR15	site 320 (+)	CCGAC	S000153

MYB1AT	site	51 (+)	WAACCA	S000408
MYB1AT	site	144 (-)	WAACCA	S000408
MYB2CONSENSUSAT	site	148 (+)	YAACKG	S000409
MYBATRD22	site	50 (+)	CTAACCA	S000175
MYBCORE	site	551 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCORE	site	148 (-)	CNGTTR	S000176
MYBCOREATCYCB1	site	149 (+)	AACGG	S000502
MYBPLANT	site	52 (+)	MACCWAMC	S000167
MYBST1	site	6 (+)	GGATA	S000180
MYCATERD1	site	533 (-)	CATGTG	S000413
MYCATRD22	site	533 (+)	CACATG	S000174
MYCCONSUSAT	site	395 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	414 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	533 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	539 (+)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	395 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	414 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	533 (-)	CANNTG	S000407
MYCCONSUSAT	site	539 (-)	CANNTG	S000407
NODCON1GM	site	35 (-)	AAAGAT	S000461
NODCON2GM	site	89 (+)	CTCTT	S000462
OSE1ROOTNODULE	site	35 (-)	AAAGAT	S000467
OSE2ROOTNODULE	site	89 (+)	CTCTT	S000468
POLLEN1LELAT52	site	1 (+)	AGAAA	S000245
PRECONSCRHSP70A	site	320 (+)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PRECONSCRHSP70A	site	200 (-)	SCGAYNRNNNNNNNNNNNNNNNNHHD	S000506
PYRIMIDINEBOXOSRAMYL1A	site	378 (+)	CCTTTT	S000259
RAV1BAT	site	414 (-)	CACCTG	S000315
REALPHALGLHCB21	site	52 (+)	AACCAA	S000362
RHERPATEXPA7	site	75 (+)	KCACGW	S000512
RHERPATEXPA7	site	462 (-)	KCACGW	S000512
RYREPEATBNNAPA	site	252 (+)	CATGCA	S000264
RYREPEATBNNAPA	site	256 (+)	CATGCA	S000264
RYREPEATBNNAPA	site	535 (+)	CATGCA	S000264
RYREPEATBNNAPA	site	254 (-)	CATGCA	S000264
RYREPEATGMGY2	site	252 (+)	CATGCAT	S000105
RYREPEATGMGY2	site	253 (-)	CATGCAT	S000105
RYREPEATLEGUMINBOX	site	252 (+)	CATGCAY	S000100
RYREPEATLEGUMINBOX	site	535 (+)	CATGCAY	S000100
RYREPEATLEGUMINBOX	site	253 (-)	CATGCAY	S000100
RYREPEATVFLEB4	site	252 (+)	CATGCATG	S000102
RYREPEATVFLEB4	site	252 (-)	CATGCATG	S000102
SEBFCONSSTPR10A	site	70 (+)	YTGTCWC	S000391
SORLIP1AT	site	279 (+)	GCCAC	S000482
SORLIP1AT	site	652 (+)	GCCAC	S000482
SORLIP2AT	site	178 (+)	GGGCC	S000483
SORLIP2AT	site	269 (+)	GGGCC	S000483
SURECOREATSULTR11	site	487 (+)	GAGAC	S000499
SURECOREATSULTR11	site	72 (-)	GAGAC	S000499
SURECOREATSULTR11	site	238 (-)	GAGAC	S000499
SURECOREATSULTR11	site	385 (-)	GAGAC	S000499
SURECOREATSULTR11	site	581 (-)	GAGAC	S000499
SV40COREENHAN	site	286 (+)	GTGGWWHG	S000123
TAAAGSTKST1	site	37 (-)	TAAAG	S000387
TRANSINITMONOCOTS	site	216 (-)	RMNAUGGC	S000202
WRKY71OS	site	393 (-)	TGAC	S000447

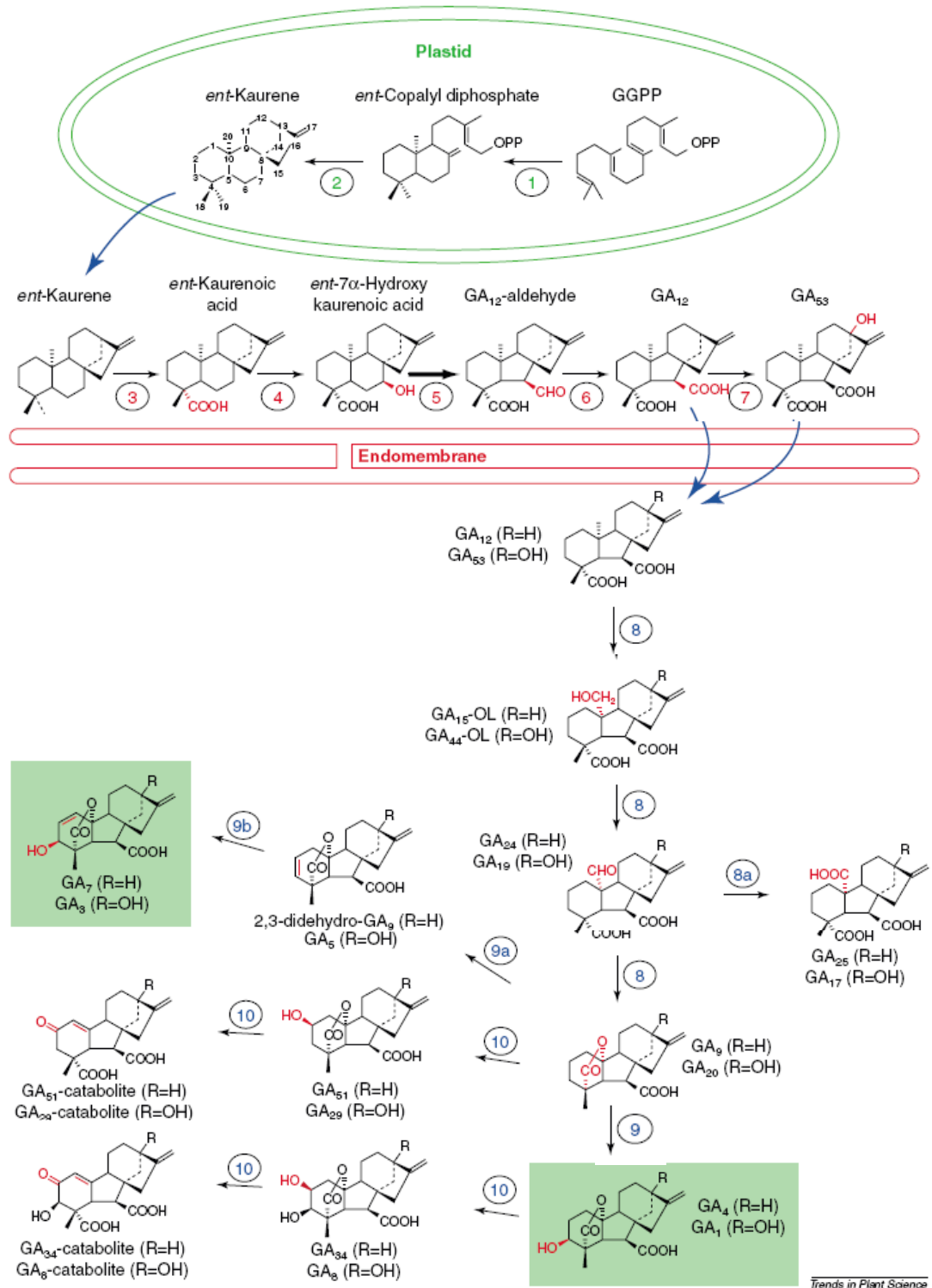


Fig. 1. Metabolismo de giberelinas (GA) en plantas superiores, extraído de Hedden y Phillips (2000). Se muestra la compartimentalización subcelular en plásticos, endomembrana y citoplasma. Las GA con actividad biológica son GA1,3,4 y 7. Las enzimas que catalizan cada paso son: (1) *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS); (2) *ent*-kaurene synthase (KS); (3) *ent*-kaurene 19-oxidase (EKO); (4) *ent*-kaurenoic acid 7 α -hydroxylase; (5) GA12-aldehyde synthase; (6) GA 7-oxidase (GA7ox); (7) GA 13-hydroxylase (GA13ox); (8) GA 20-oxidase (GA20ox); (9) GA 3 α -hydroxylase (GA3ox); (10) GA 2-oxidase (GA2ox). Una enzima GA20ox de semillas de calabaza (8a) cataliza los tres pasos oxidativos de GA12 a GA25 y de GA53 a GA17.