

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. La llavor: endosperma, embrió i proteïnes de reserva

La formació de llavors és una etapa crucial en el cicle vital d'una planta ja que significa l'inici d'una nova generació esporofítica. Una llavor ha d'aconseguir un apropiat desenvolupament de l'embrió, ha de permetre la seva posterior germinació i ha de poder integrar el desenvolupament de l'embrió i la plàntula amb l'entorn. Per això, les llavors de les angiospermes són sotmeses a dessecació i dormància. El manteniment d'un embrió viable en aquestes condicions requereix el desenvolupament d'una sèrie de mecanismes com són l'acumulació de protectors osmòtics i altres soluts com hidrats de carboni i proteïnes. Les llavors han desenvolupat també mecanismes de protecció contra estressos biòtics i amb aquesta finalitat contenen proteïnes amb propietats antifúngiques i molècules contra l'atac d'insectes i altres animals sobre les llavors o la plàntula. Així, les llavors representen l'èxit d'un procés d'adaptació que assegura la supervivència i proliferació de les plantes superiors. Les llavors, a més, són importants per a la nostra vida ja que constitueixen el principal mitjà de propagació d'espècies de cultiu, així com una valuosa font d'alimentació (tant humana com animal) i de matèria prima per a la indústria. En aquest context, adquireixen especial rellevància les llavors dels cereals, ja que blat, blat de moro i arròs conjuntament han suposat la base de la dieta de la majoria de cultures tant orientals com occidentals.

Estructura de la llavor i desenvolupament

A les angiospermes, la llavor és el fruit d'un procés de doble fecundació únic en el regne vegetal, que dóna lloc tant a l'embrió com a l'endosperma. L'adquisició d'aquesta doble fecundació es considera un dels components fonamentals de l'èxit evolutiu de les angiospermes (Stebbins, 1974).

Aquest procés de doble fecundació té lloc gràcies a que 2 cèl·lules espermàtiques presents a l'interior del tub pol·línic alliberen el seus 2 nuclis generatius al gametòfit femení. El nucli d'una de les cèl·lules espermàtiques es fusiona amb l'ovocèl·lula formant el zigot, que donarà lloc a un embrió diploide. El segon nucli espermàtic es fusiona amb els 2 nuclis polars del sac embrionari originant l'endosperma triploide (figura 1). El terme doble fecundació implica que l'endosperma té un origen sexual, però aquest teixit triploide no donarà lloc a un nou organisme, sinó a un teixit amb un programa de desenvolupament tancat (Consonni i col., 2005).

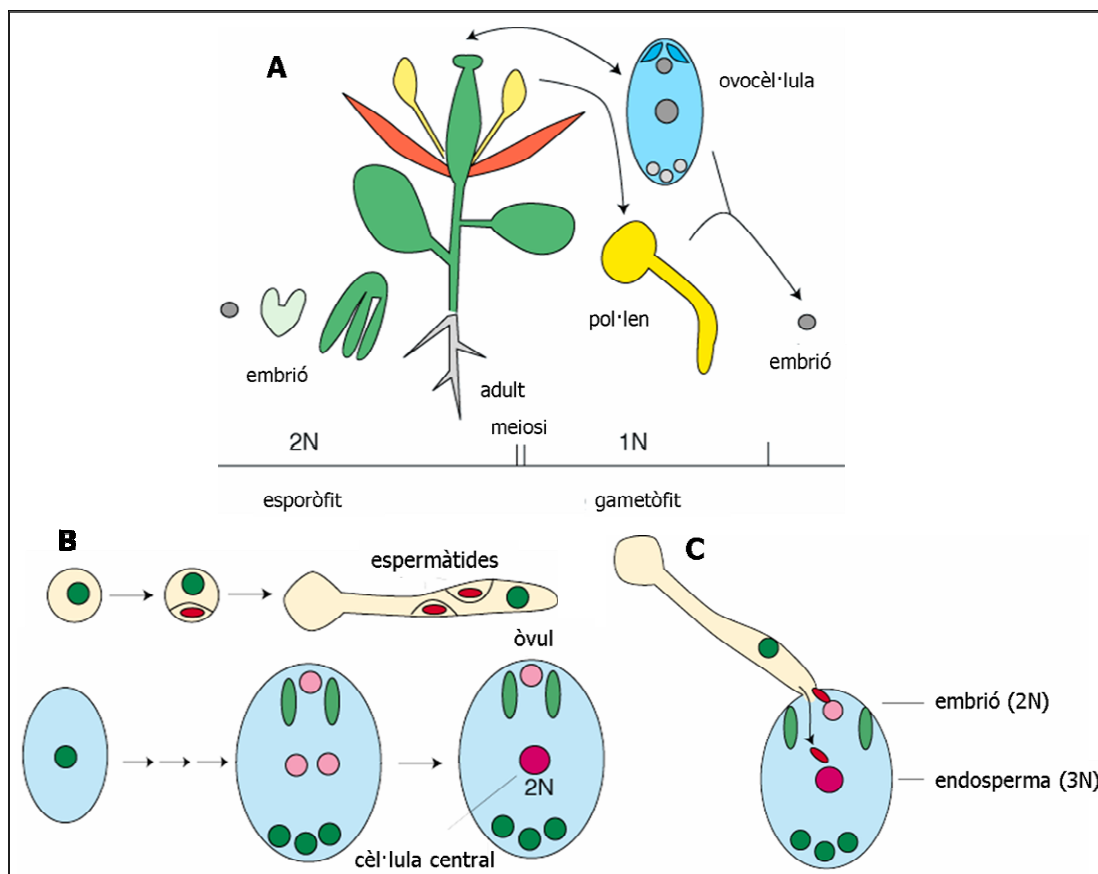


Figura 1. El procés de doble fertilització en el cicle vital d'una angiosperma. A. Cicle vital d'una planta amb flor hermafrodita, mostrant l'alternança entre etapes diploides (espòrofítiques) i les etapes haploides (gametofítiques). **B.** En la fase gametofítica, el pol·len pateix 2 divisions cel·lulars mentre que l'ovocèl·lula pateix 2 divisions cel·lulars i una fusió nuclear. **C.** La doble fertilització en el sac embrionari dóna lloc a l'embrió (2n) i l'endosperma (3n).

Un altre avantatge evolutiu de les angiospermes és que en aquestes, a diferència de les gimnospermes, la llavor es desenvolupa dintre de l'òvari matern. Així la llavor està formada per dos components més: el pericarp, que és un teixit adherent derivat de la paret de l'òvari, que forma la capa més externa de la llavor i la nucel·la, una fina membrana derivada de la capa epidèrmica més externa del sac embrionari que es manté en la llavor, formant una capa contínua entre el pericarp i l'endosperma (Consonni i col., 2005).

El grau de desenvolupament que assoleix cadascun d'aquests teixits determina, en gran mesura, les diferències observades entre els diferents tipus de llavor que es troben entre les angiospermes (Bewley i Black, 1994; Boesewinkel i Bouman, 1995). La contribució relativa que l'endosperma fa a la massa de la llavor madura varia molt d'unes espècies a unes altres i pot ser quasi inexistent (com en molts llegums), consistir en 2 o 3 capes perifèriques (com a les cucurbitàcies o l'enciam) o constituir la major part del volum de la llavor (com als cereals, els lliris, les palmeres i la majoria de dicotiledònies més primitives (Martin, 1946)).

1.1. Endosperma: funció, origen i desenvolupament

A les angiospermes, l'endosperma actua com a component de la llavor especialitzat en acumular productes de reserva i se l'ha relacionat amb l'aport de nutrients a l'embrió. Però donades les variacions existents entre diferents espècies en l'evolució d'aquest teixit, la funció que realitza en el desenvolupament i la germinació de l'embrió no és sempre clara.

A la majoria de dicotiledònies, l'endosperma es desenvolupa només parcialment i és consumit per l'embrió en creixement. Al pèsol, l'endosperma arriba només a l'estadi sincitial (Marinos, 1970) i a la família de les *Orchidaceae* ni tan sols arriba a aquesta fase. Quan la llavor madura, l'endosperma és una estructura en degeneració de la que no depèn l'embrió, que ja ha desenvolupat els cotilèdons com a òrgans propis de reserva. Per tant, sembla que el paper de l'endosperma queda restringit al període de desenvolupament de l'embrió dins de la llavor. A arabidopsis, però, l'endosperma juga un paper central en el control del subministrament de nutrients a l'embrió (Hirner i col., 1998).

A monocotiledònies, i en concret als cereals, l'endosperma és un teixit que es manté fins al final de la maduració del gra. Per això es pensa que actua com a teixit de suport durant l'embriogènesi i també durant la germinació (Jones i Jacobsen, 1991; Lopes i Larkins, 1993; West i col., 1998). Tot i que encara no s'ha concretat el paper de l'endosperma en la maduració del gra a nivell molecular, el seu paper durant l'embriogènesi està força ben definit. A blat de moro, els mutants *dek* (*defective kernel*) presenten afectació tant a nivell d'endosperma com d'embrió (Kowles i col., 1992). Es postula també que donat que no hi ha feixos vasculars que penetrin a l'endosperma, les cèl·lules de transferència de l'endosperma podrien funcionar com a pont entre els teixits materns i l'embrió (Hueros i col., 1999; Thompson i col., 2001).

L'embrió de blat de moro no té teixits importants de reserva, com tenen les dicotiledònies, per això, l'endosperma és l'única font d'energia, nitrogen, sofre i minerals fins que l'embrió esdevingui fotocompetent. Hi ha una certa controvèrsia sobre si l'endosperma de blat de moro és un teixit fisiològicament mort en el moment de la germinació o si manté una certa funcionalitat. De fet, la presència en el gra de teixits com l'aleurona i l'escutel, especialitzats en la funció digestiva, s'ha considerat un indicatiu de que l'endosperma és una estructura inert en el moment de la germinació (Subbarao i col., 1998; Maugenest i col., 1999; Hayashi i col., 2000; Gomez-Cadenas i col., 2001).

L'origen de l'endosperma

L'origen evolutiu de l'endosperma és encara controvertit (revisat a Friedman (1998; 2001)). A principis del segle passat, Sargant (1900) va hipotetitzar que l'endosperma procedia d'un embrió que ha degenerat i és incapaç de generar una nova planta. El procés evolutiu pel qual s'addiciona un segon nucli femení el portarà a convertir-se en teixit de reserva de la llavor. El descobriment d'un procés de doble fertilització a *Ephedra trifurca* (espècie a mig

camí entre les angiospermes i les gimnospermes) dona suport a la primera part de la hipòtesi de Sargant, tot i que el segon embrió no dona lloc a un teixit de reserva sinó que és viable, i competeix amb l'altre embrió pels nutrients durant el seu desenvolupament (Friedman, 1990; 1992). Altres autors atribueixen la formació de l'endosperma a la seva particular dotació genètica (Scott i col., 1998). De fet, el que sembla crític per al correcte desenvolupament de la llavor no és el nivell de ploïda sinó la contribució de cadascun dels pares. Així, una relació 2:1 entre els genomes matern i patern és necessària per a l'apropiat desenvolupament de l'endosperma i, en conseqüència per al correcte desenvolupament de la llavor (Lin, 1984).

L'endosperma dels cereals

L'endosperma dels cereals està constituït per 4 tipus cel·lulars (figura 2): l'aleurona (que a blat de moro està constituïda per una monocapa de cèl·lules que cobreix la pràctica totalitat del perímetre de l'endosperma), l'endosperma ric en midó, les cèl·lules de transferència i les cèl·lules que envolten l'embrió (Lid i col., 2002). Cadascun d'ells té una estructura diferenciada i un paper fisiològic determinat en el desenvolupament d'aquest teixit de reserva (Lopes i Larkins, 1993). La major part de l'endosperma està format per cèl·lules de reserva que sintetitzen midó i proteïnes de reserva que serviran per mantenir el creixement de la plàntula després de la germinació. Les cèl·lules de l'aleurona juguen un paper important tant durant la maduració de la llavor, acumulant lípids i proteïnes de reserva, com durant la germinació, contribuint activament a la mobilització de les reserves emmagatzemades a l'endosperma (Walbot, 1994). Durant el desenvolupament del gra, les cèl·lules de l'endosperma ric en midó van morint, sotmeses a un procés de mort cel·lular programada (MCP), que afectarà a la pràctica totalitat del teixit, amb l'única excepció de la capa aleurona que es manté viva a la llavor madura. Aquesta MCP va acompanyada per un increment en l'activitat nucleasa i degradació internucleosomal del DNA nuclear (de forma similar a l'apoptosi animal) i està mediada per etilè i àcid abscísic (Young i Gallie, 2000).

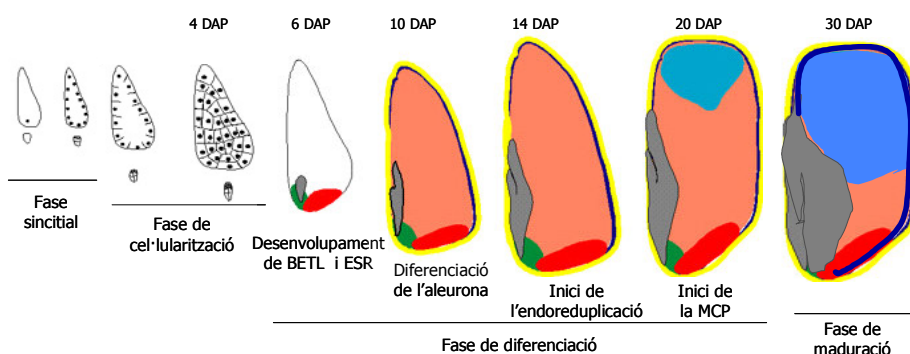


Figura 2. Tipus cel·lulars i fases del desenvolupament de l'endosperma a blat de moro.

Distribució temporal de les fases de desenvolupament de l'endosperma: sincitial, cel·lularització, diferenciació i maduració. Els diferents dominis es marquen en colors: aleurona en blau fosc, endosperma ric en midó en rosa, cèl·lules de transferència en vermell (BETL), cèl·lules que envolten l'embrió (ESR) en verd, i embrió en gris. En blau clar s'indica la progressió de la MCP al domini ric en midó.

Fases del desenvolupament de l'endosperma a blat de moro

En cereals, com a molts altres grups tant de monocotiledònies com de dicotiledònies, l'endosperma segueix un desenvolupament nuclear: la mitosi del nucli primari de l'endosperma té lloc sense posterior citocinesi, donant lloc a una cèl·lula multinucleada. A continuació, té lloc el procés de cel·lularització fins que totes les cèl·lules de l'endosperma són uninucleades. Així, el desenvolupament de l'endosperma dels cereals passa per 4 etapes (figura 2): sincitial, cel·lularització, diferenciació i maduració (Olsen, 2001).

En concret, a blat de moro, el nucli triploide de l'endosperma experimenta divisions ràpides i sincronitzades durant diversos dies després de la fertilització, donant lloc a una cèl·lula primària de l'endosperma de tipus sincitial (multinuclear) (Kowles i Phillips, 1988). La fase de cel·lularització comença 3-5 dies després de la pol·linització (DAP), que té lloc el mateix dia que la fertilització, i progressa de forma centrípeta fins que tot l'endosperma esdevé cel·lular i cada cèl·lula és uninuclear (figura 2). De 5 a 12 DAP, l'endosperma creix molt ràpidament, degut a processos de divisió i expansió cel·lular. La divisió cel·lular a la regió central de l'endosperma s'atura cap a 12 DAP, però continua a les regions perifèriques. De forma subsegüent, les cèl·lules de l'interior de l'endosperma augmenten de mida mentre que les més externes es diferencien en capa aleurona (Kyle i Styles, 1977). Després d'haver cessat la divisió cel·lular a la zona central de l'endosperma, la replicació del DNA nuclear segueix un procés conegut com **endoreduplicació**, que dóna lloc a un important increment del volum nuclear així com del contingut en DNA, que té el seu pic a 16-18 DAP (Phillips, 1993). La divisió cel·lular remanent a l'endosperma cessa seguint la forma d'una onada, que s'inicia a la zona més propera a l'àpex del gra i progressa cap a la base i cap a la perifèria, fins que tota la divisió cel·lular (amb excepció de la capa d'aleurona) s'ha acabat, cap a 20-25 DAP (Duvick, 1961).

El període entre 12 i 15 DAP marca la transició de l'endosperma entre la diferenciació i la maduració, quan es comença a acumular material sec. Durant aquest període, s'incrementa ràpidament l'expressió dels enzims necessaris per a la síntesi del midó i les proteïnes de reserva (Giroux i col., 1994) i aquesta etapa d'ompliment del gra continua fins que es completa la mort de l'endosperma. La deposició de midó segueix el mateix patró que l'observat pel desenvolupament cel·lular, de forma que la síntesi s'inicia al centre de l'endosperma i s'estén primer cap a la perifèria i després cap a la base del gra (Lopes i Larkins, 1993). Excepte les cèl·lules més centrals de l'endosperma, la resta de cèl·lules del teixit queden plenes de midó quan s'arriba a la maduresa del gra (figura 3); és per això que aquesta regió és definida com a domini ric en midó (Larkins i Hurkman, 1978; Kowles i Phillips, 1988). La síntesi de proteïnes de reserva s'inicia a l'endosperma a 15 DAP i segueix el mateix patró que el desenvolupament cel·lular i la deposició del midó, estenent-se cap a la perifèria del gra. La deposició de proteïnes és especialment intensa a les cèl·lules de la

subaleurona i a l'aleurona, que conté a més un elevat nivell de lípids però molt poc midó (Morrison i col., 1984).

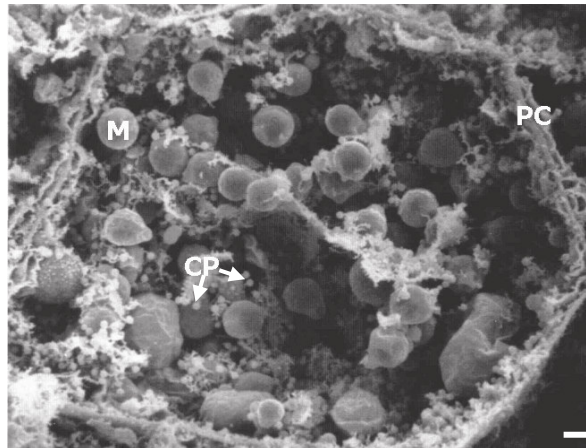


Figura 3. Imatge d'una cèl·lula d'endosperma de blat de moro. La fotografia mostra una cèl·lula d'endosperma de blat de moro observada al microscopi electrònic d'escombratge, on destaca l'abundància de grànuls de midó (M) i cossos proteics (CP). S'indica la posició de la paret cel·lular (PC). Barra = 5 μ M. Adaptada de Lopes (1993).

La maduració tardana involucra l'aturada dels processos de biosíntesi, la inducció de la dessecació i, finalment, la quiescència. La reducció de l'activitat metabòlica té lloc, en part, degut a la pèrdua d'aigua (Kermode i Bewley, 1989; Comai i Harada, 1990). De forma coordinada a la progressió en la fase de maduració, l'endosperma dels cereals experimenta un procés de MCP que involucra tot el teixit, deixant només sense afectar la capa d'aleurona, que segueix viva i viable fins a la maduresa del gra (Kowles i Phillips, 1988; Lopes i Larkins, 1993; Young i Gallie, 2000). La MCP de l'endosperma representa el punt final del seu desenvolupament i la regulació d'aquest programa és crítica per a la viabilitat de la llavor ja que la mort del domini ric en midó de l'endosperma és necessària per facilitar l'accés de les hidrolases secretades per l'aleurona i l'escutel durant la germinació cap a l'endosperma, però ha de tenir lloc després de la síntesi de substàncies de reserva (Young i Gallie, 2000).

1.2. Embriogènesi: etapes del desenvolupament

Els processos de doble fecundació de les angiospermes genera, a part de l'endosperma, el zigot diploide, que segueix un procés de divisions cel·lulars per donar lloc a l'embrió: després d'una primera sèrie de divisions cel·lulars l'embrió adquireix una estructura globular amb simetria radial. A continuació, desenvolupa una simetria bilateral que, fruit d'un programa morfogènètic predeterminat, el portarà a l'elaboració de dos meristems apicals (radicular i caulinar) als pols oposats de l'eix embrionari. Al final d'aquest període l'embrió inicia una fase de maduració que inclou l'acúmulo de productes de reserva i aquesta transició es correlaciona amb l'increment en els nivells d'ABA i l'adquisició de tolerància a la dessecació (Goldberg i col., 1989; West i Harada, 1993). Les diferents espècies presenten variacions pel

que fa als temps de generació, així com al grau de desenvolupament de l'embrió al finalitzar el període embriònic. A la figura 4 s'esquematitza aquest procés a *Arabidopsis thaliana*.

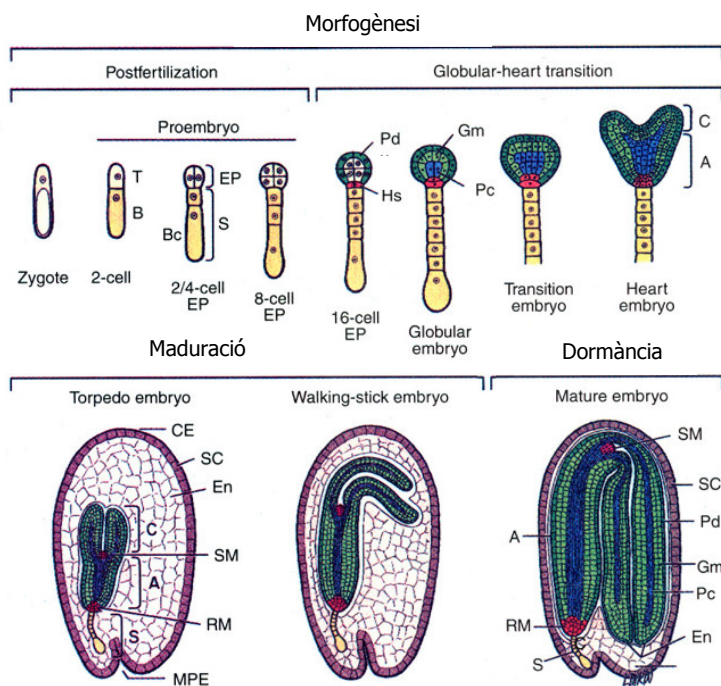


Figura 4. Visió general de l'embriogènesi a *A. thaliana*. Esquema dels estadis del desenvolupament embriònic a arabidopsis. Abreviacions: **T**, cèl·lula terminal; **B**, cèl·lula basal; **EP**, embrió propi; **S**, suspensor; **Bc**, cèl·lula basal del suspensor; **Pd**, protoderma; **Hs**, hipòfisi; **Pc**, procàmbium; **Gm**, meristem principal; **C**, cotiledó; **A**, eix; **MPE**, micropylar end; **CE**, chalazal end; **SC**, coberta de la llavor; **En**, endosperma; **SM**, meristem apical; i **RM**, meristem radicular. Adaptat de Goldberg (1994).

L'embriogènesi a blat de moro (figura 5) té com a resultat la formació d'un embrió envoltat de l'escutel (o cotiledó modificat) i l'eix embriònic, una estructura ben diferenciada que és, en realitat, una planta en miniatura (Clark i Sheridan, 1991).

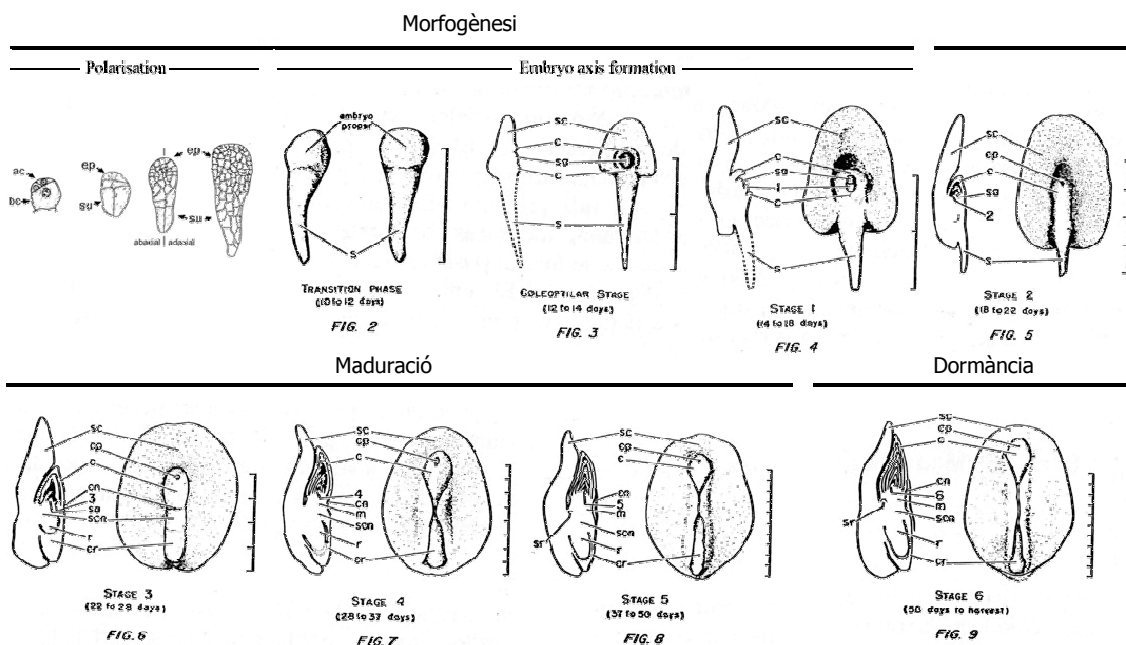


Figura 5. Estadis de l'embriogènesi a *Zea mays*. Esquema que representa els estadis del desenvolupament de l'embrió de blat de moro, mostrant seccions longitudinals (esquerra) i visions frontals (dreta). Abreviacions: **1-6**, fulles en l'ordre en que es formen; **c**, coleòptil; **cn**, node coleoptilar; **cp**, porus coleoptilar; **cr**, coleorriza; **m**, mesocòtil; **r**, arrel; **s**, suspensor; **sa**, meristem apical; **sc**, escutel; **scn**, node escutelar; **sr**, arrel lateral. Adaptat d'Abbe i Stein (1954).

Fases del desenvolupament de l'embrió a blat de moro

El desenvolupament de l'embrió de blat de moro va ser dividit en estadis morfològics per Abbe i Stein (1954) i, posteriorment, estudis genètics dels mutants *dek* (*defective kernel*) i *emp* (*empty pericarp*), que presenten deficiències tant a endosperma com a embrió, i dels mutants *emb* (*embryo-specific*) ha permès estudiar el paper de diferents gens implicats en aquest procés (Neuffer i Sheridan, 1980; Clark i Sheridan, 1991; Scanlon i col., 1994).

Durant el primer estadi (proembrió, 4-8 DAP) es formen el suspensor i l'embrió propi. La divisió de l'embrió propi per donar lloc a l'eix embrionari i l'escutel té lloc a l'estadi de transició (8-10 DAP). Seguidament, a l'estadi coleoptilar (10-12 DAP), apareix el coleòptil que envolta i protegeix la plúmula. En aquest estadi i en l'estadi 1 (12-14 DAP), l'escutel augmenta de mida fruit de la divisió i expansió cel·lular i es diferencia el sistema vascular, que unirà l'escutel a l'eix embrionari (Clark, 1996). A l'estadi 1 es diferencia la primera fulla primordial i cap al final d'aquest estadi s'inicia el procés de deposició de midó i proteïnes de reserva, que involucra també processos de MCP (Young i Gallie, 2000). A partir d'aquest moment, el suspensor (teixit que transporta nutrients des dels teixits materns cap a embrió durant les primeres etapes de l'embriogènesi) inicia el seu procés de MCP, un cop s'ha diferenciat el sistema vascular (Giuliani i col., 2002). A l'estadi 2 (14-16 DAP) es diferencia la segona fulla primordial i l'escutel adquireix una aparença parenquimatososa, degut a l'acúmul de productes de reserva (figura 5). Paral·lelament, aquest teixit inicia un procés de MCP, que deixarà només viable la primera cap de l'escutel (epiteli escutelar), que serà el lloc on s'expressaran molts dels gens implicats en la fase de maduració (Giuliani i col., 2002).

Com a resum final, a la figura 6 es mostra un esquema dels principals processos que tenen lloc al gra de blat de moro durant el seu desenvolupament (Goldberg i col., 1989).

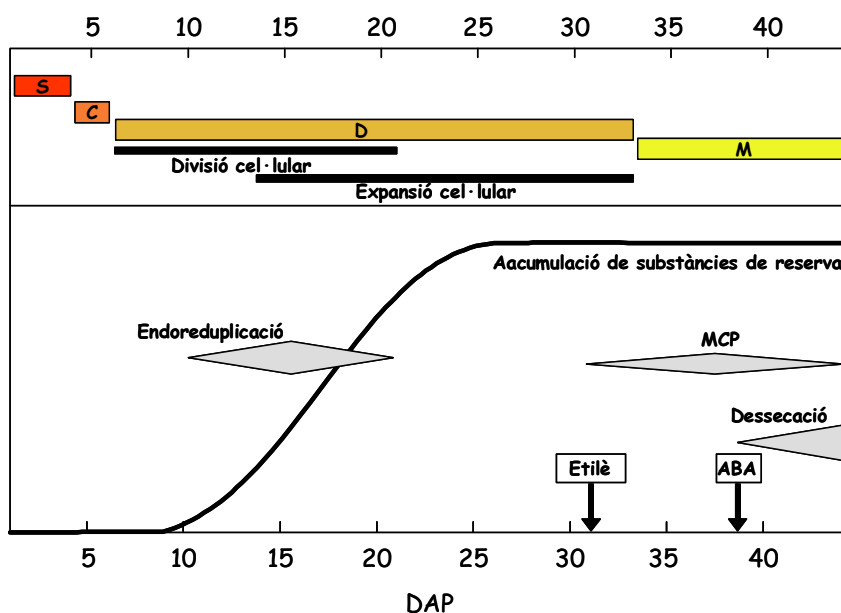


Figura 6. Principals processos fisiològics del desenvolupament del gra de blat de moro.

Esquema de les etapes que se succeeixen durant el desenvolupament del gra de blat de moro: (S) sincital, (C) cel·lularització, (D) diferenciació, (M) maduració. Dies després de pol·linització (DAP), mort cel·lular programada (MCP). Adaptat de Goldberg, 1989.

1.3. Les proteïnes de reserva de la llavor en cereals

Els cereals són el principal cultiu a nivell mundial (FAO, 1999) i blat, blat de moro i arròs, acaparen el 70% de la producció total de cereals. A més, tot i que el gra dels cereals conté molta menys proteïna que la llavor de les lleguminoses, són els cereals els que proporcionen la major part de proteïna per a consum humà. Es per això que s'han dirigit molts esforços al seu estudi, tant per entendre millor la seva relació amb el desenvolupament específic de la llavor com per millorar-ne la seva aplicació alimentària i industrial (Lopes i Larkins, 1993).

De les proteïnes presents al gra dels cereals, si ens fixem només en aquelles amb funció exclusivament de reserva, podem diferenciar dos grans grups de proteïnes de reserva: les globulines i les prolamines; les primeres es troben a la llavor tant de dicotiledònies com de monocotiledònies, mentre que les segones són exclusives de la llavor de les gramínies.

Les **globulines** són, en principi, proteïnes solubles en solucions salines que s'acumulen en diferents teixits de la llavor. A cereals com arròs i civada les globulines són les proteïnes de reserva majoritàries i s'acumulen a l'endosperma. Aquestes són considerades globulines de tipus 12S, tot i que a arròs no són solubles en solucions salines.

Globulines de tipus 7S, solubles en solucions salines i homòlogues a les globulines de llegums i altres dicotiledònies, s'acumulen principalment a l'embrió i l'aleurona d'espècies com blat de moro, blat, arròs i civada (revisat per Shewry (2002)). Aquestes proteïnes constitueixen només el 10% de pes total del gra i sovint són eliminades en el procés de refinament de l'arròs o el blat. En canvi, a blat de moro, el contingut proteic i oleic de l'embrió té un cert interès nutritiu.

Les **prolamines** són les proteïnes majoritàries de l'endosperma dels cereals (excepte a arròs i civada) i es caracteritzen per ser riques en prolina i glutamina (d'aquí el nom) i per la seva solubilitat en solucions alcohòliques. La seva estructura és molt més variable que la de les globulines, però la majoria d'elles presenten blocs repetitius d'uns pocs aminoàcids, que són responsables de la variabilitat en els seus continguts aminoacídics.

A blat de moro, on han estat àmpliament estudiades, les prolamines reben el nom de **zeïnes** i representen el 60% de la proteïna present a l'endosperma (Kodrzycki i col., 1989). Aquestes proteïnes s'han classificat en base a la seva mobilitat electroforètica en 4 grups: α -zeïnes (de 22 i 19 kDa), β -zeïnes (14 kDa), γ -zeïnes (50, 27 i 16 kDa) i δ -zeïnes (18 i 10 kDa). La síntesi de les zeïnes té lloc al reticle endoplasmàtic de les cèl·lules de l'endosperma de forma lligada al desenvolupament del gra (Pérez-Grau i col., 1986), entre els 10 i els 40 DAP. Posteriorment, s'acumulen en unes vesícules denses derivades del reticle anomenades cossos proteics (Galili i col., 1993). La caracterització de diversos mutants afectats en l'acumulació de zeïnes (com *opaque-2* o *floury-2*) ha permès estudiar els mecanismes que en regulen l'expressió i la seva acumulació (Schmidt i col., 1987; Cord Neto i col., 1995).

2. Regulació de l'expressió gènica en gens de llavor

La regulació de l'expressió gènica a nivell transcripcional està implicada en múltiples processos de vital importància pels organismes, com el control del cicle cel·lular, l'equilibri metabòlic i les respostes ambientals. Així, el desenvolupament es basa, en últim terme, en la capacitat de la cèl·lula per aconseguir una expressió diferencial dels seus gens en el moment i el lloc adequat (Scott, 2000).

Perquè la transcripció tingui lloc es requereixen un elevat nombre de factors proteics diferents, entre els que es troben factors implicats en la remodelació de la cromatina i el desenrotllament del DNA, proteïnes que formen el complex iniciador de la transcripció i el complex de la RNA polimerasa II. Però, a més de tots aquests elements, existeixen una sèrie de factors que controlen l'activitat transcripcional dels promotors dels gens: els factors de transcripció (Stracke i col., 2001).

Com a factor de transcripció entenem, en general, aquelles proteïnes que s'uneixen a seqüències específiques del DNA i que, mitjançant aquesta unió a seqüències reguladores de l'expressió gènica, controlen la freqüència d'iniciació de la transcripció dels seus gens diana. Aquestes proteïnes tenen una estructura modular en dominis i poden actuar com a activadors, repressors o ambdues coses. En base al seu domini d'unió al DNA, els factors de transcripció s'ha classificat en diferents famílies (Luscombe i col., 2000).

La seqüenciació completa dels genomes d'animals (*Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*) així com de plantes (*Arabidopsis thaliana*) i fongs (*Saccharomyces cerevisiae*) ha permès realitzar estudis comparatius dels reguladors transcripcionals als 3 regnes (Riechmann i col., 2000) i ha evidenciat les interrelacions establertes entre les diferents famílies de factors de transcripció. Durant l'evolució, l'intercanvi de dominis entre aquestes proteïnes ha donat lloc a una important diversificació que ha permès l'evolució dels mecanismes de regulació transcripcional (figura 7). Però les plantes han evolucionat també independentment, donant lloc a famílies de factors de transcripció específiques i amplificant unes famílies en detriment de la resta. Així, mentre les proteïnes que coordinen àtoms de Zn representen més del 50% dels factors de transcripció de *Drosophila*, *C. elegans* i llevat, a *Arabidopsis* només representen el 22%. I cap família de factors de transcripció s'ha amplificat de forma aparent per sobre de la resta. De fet, les famílies més abundants a *Arabidopsis* són AP2/EREBP (APETALA2/*ethylene responsiveness element binding protein*), MYBs i bHLH (*basic helix-loop-helix*), i representen cadascuna d'elles només el 9% del total (Riechmann i col., 2000).

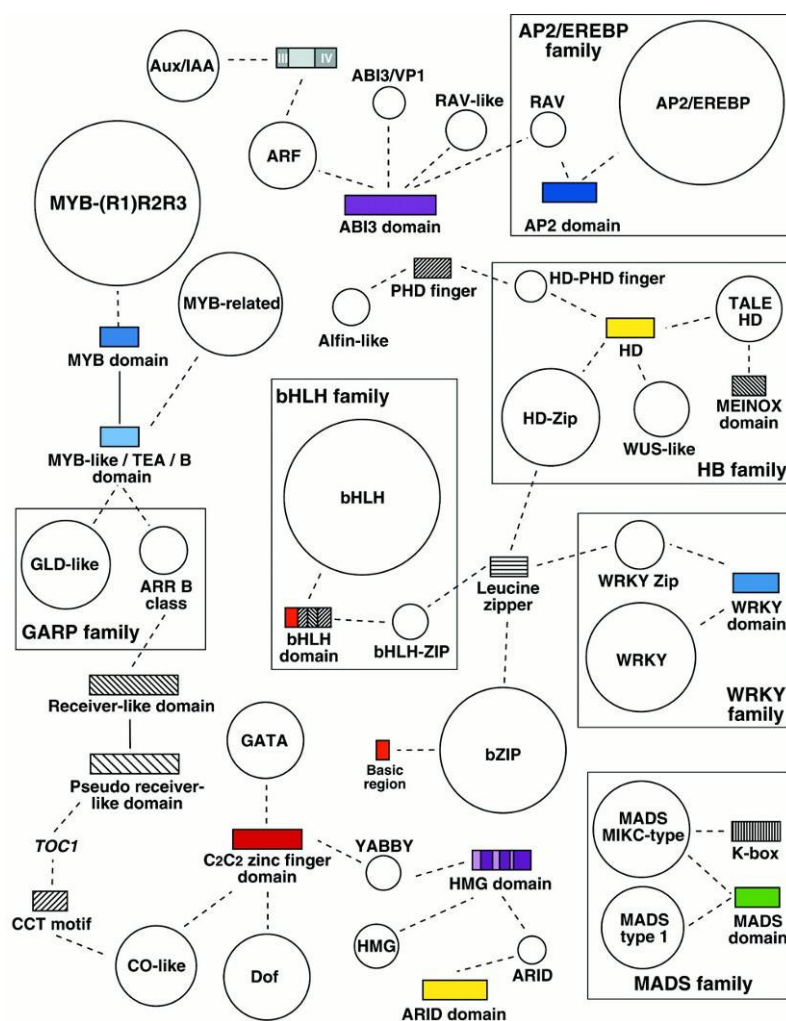


Figura 7. Famílies de factors de transcripció a *A. thaliana*. Es mostren els intercanvis de dominis entre les diferents famílies de factors de transcripció. En color es mostren els dominis d'unió a DNA i en blanc i negre altres dominis (normalment d'interacció proteïna-proteïna). La mida de cada cercle és proporcional al nombre de factors de transcripció de cada família trobats a *A. thaliana* (adaptat de Riechmann, 2000).

Factors de transcripció i elements reguladors en gens de proteïnes de reserva

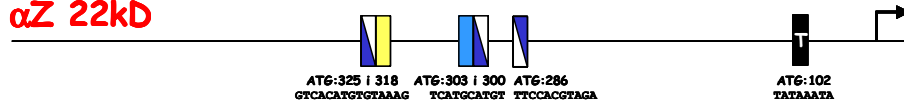
Un dels processos més ben regulats del desenvolupament de la planta és el procés pel qual s'obtenen llavors capaces de generar un nou organisme després d'una etapa d'aturada metabòlica (dormància de la llavor). L'èxit d'aquest procés depèn, en gran mesura, de la correcta acumulació de substàncies de reserva a la llavor, que siguin capaces de nodrir l'embrió en germinació abans aquest no esdevingui fotocompetent. Així, l'acumulació de substàncies de reserva a la llavor és un procés finament regulat i fortament lligat al desenvolupament de la llavor.

S'han dirigit intensos estudis a l'elucidació dels mecanismes implicats en la regulació de l'expressió de gens específics de llavor. Fruit d'aquest estudi s'han pogut identificar múltiples seqüències reguladores (elements en *cis*) presents a les regions promotores dels gens que

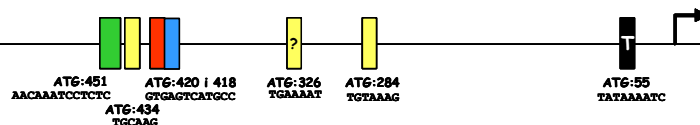
codifiquen per proteïnes de reserva tant a monocotiledònies com a dicotiledònies (revisat per Vicente-Carbajosa i col, 2005). A la figura 8 s'esquematitzen les regions promotores dels gens d'algunes proteïnes de reserva de cereals (el nostre model d'estudi) i d'*Arabidopsis*, per la seva rellevància com a organisme model, mostrant els principals elements en *cis* que es comentaran més endavant.

Zeïnes

α Z 22kD



γ Z



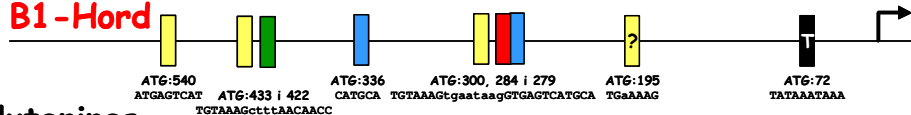
Prolamines

B1-Glu



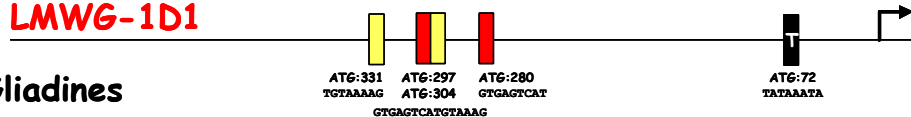
Hordeïnes

B1-Hord



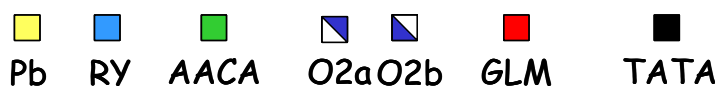
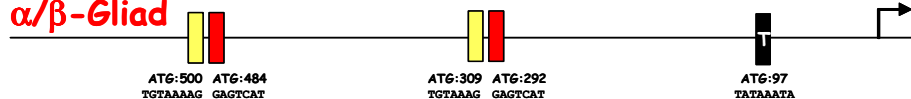
Glutenines

LMWG-1D1



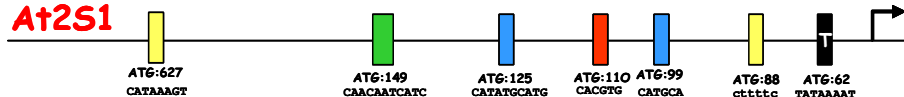
Gliadines

α/β -Gliad



At albúmines

A+2S1



At globulines

CRC3

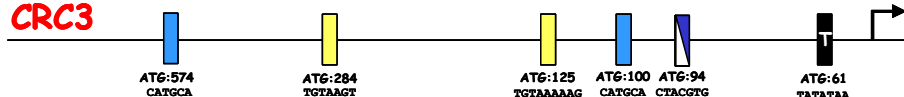


Figura 8. Elements en *cis* conservats en promotors de gens de proteïnes de reserva de cereals i *Arabidopsis thaliana*. Representació esquemàtica de les seqüències reguladores dels promotors de gens de proteïnes de reserva d'endosperma de blat de moro (zeïnes), arròs (prolamines), ordi (hordeïnes) i blat (glutenines i gliadines) i de llavor d'*Arabidopsis*. Per cada element regulador s'indica la seqüència de nucleòtids i la distància respecte l'inici de traducció (ATG).

Aquesta representació posa de manifest la conservació a nivell de promotor, però existeix també una important conservació pel que fa als factors de transcripció implicats en la regulació a través d'aquests elements en *cis*. Entre els factors de transcripció relacionats amb l'expressió de gens de proteïnes de reserva de llavor destaquem els factors tipus bZip, tipus Dof, tipus Myb i tipus B3. A continuació es descriuen les característiques principals dels representants de cada família així com les seqüències reguladores a les que s'uneixen.

2.1. Factors de tipus bZip

2.1.1. Generalitats

Els factors de transcripció de tipus bZip (*basic leucine zipper*) o cremallera de leucines es caracteritzen per la presència d'un domini bipartit format per una seqüència altament conservada, rica en aminoàcids bàsics, seguida d'una altra seqüència amb estructura d'hèlix α , en la que es repeteix una leucina o un aminoàcid hidrofòbic petit cada 7 aminoàcids (Kouzarides i Ziff, 1988; Turner i Utjian, 1989). La seqüència bàsica és l'encarregada d'interaccionar amb el DNA, mentre l'hèlix α dimeritza amb altres proteïnes que presentin el mateix domini (figura 9). La dimerització entre dues hèlixes α d'aquest tipus té lloc per la seva cara hidrofòbica, que és on es disposen totes les leucines o aminoàcids hidrofòbics (Landschulz i col., 1988). Aquesta dimerització, que es produeix abans d'unir-se al DNA, explica les característiques palindròmiques de les seqüències reconegudes per aquest tipus de factors de transcripció. A més, des del punt de vista de la regulació, la dimerització amplia combinatorialment les possibilitats de regular l'expressió gènica i permet explicar com un nombre limitat de factors de transcripció i motius d'unió al DNA poden generar el complex patró d'expressió requerit durant el desenvolupament (Abel, 1989).

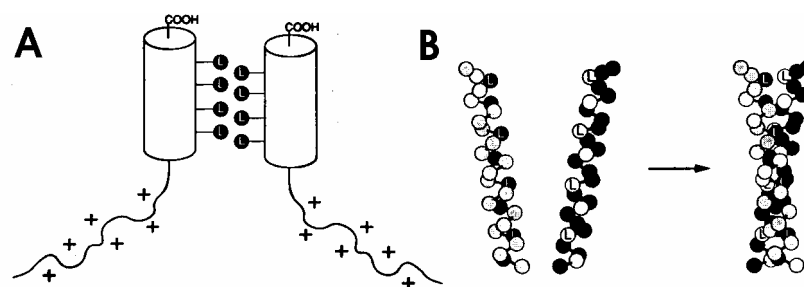


Figura 9. Procés de dimerització entre factors de transcripció de tipus bZip. **A.** Esquema dels dominis típics dels factors de transcripció de tipus bZip: el domini bàsic (+) s'encarrega de la interacció amb el DNA; el domini de dimerització es representa com un cilindre amb les leucines (L) en la mateixa orientació. **B.** Hèlix α amfipàtica formada pel domini de dimerització, que interacciona amb el mateix domini d'una altra bZip, intercalant els residus de leucina (adaptat d'Abel i col. 1989).

2.1.2. Factors bZip de cereals i les seves dianes de reconeixement

A les espècies millor caracteritzades com blat de moro, ordi i arròs, trobem tant bZiPs d'expressió específica d'endosperma com bZiPs d'expressió ubíqua. Sembla lògic que la funció de les primeres sigui l'activació de l'expressió durant el desenvolupament, mentre que

les altres podrien estar relacionades amb processos més generals, com la modulació de l'expressió en resposta a la disponibilitat de nitrogen (Müller i Knudsen, 1993; Müller i col., 1997). A la figura **10** es mostra un dendrograma de totes les bZip relacionades amb l'expressió dels gens de proteïnes de reserva d'endosperma a cereals. Totes aquestes bZiPs presenten una elevada similitud a nivell del domini d'unió al DNA (superior al 72%), motiu pel qual es creu que són gens relacionats evolutivament.

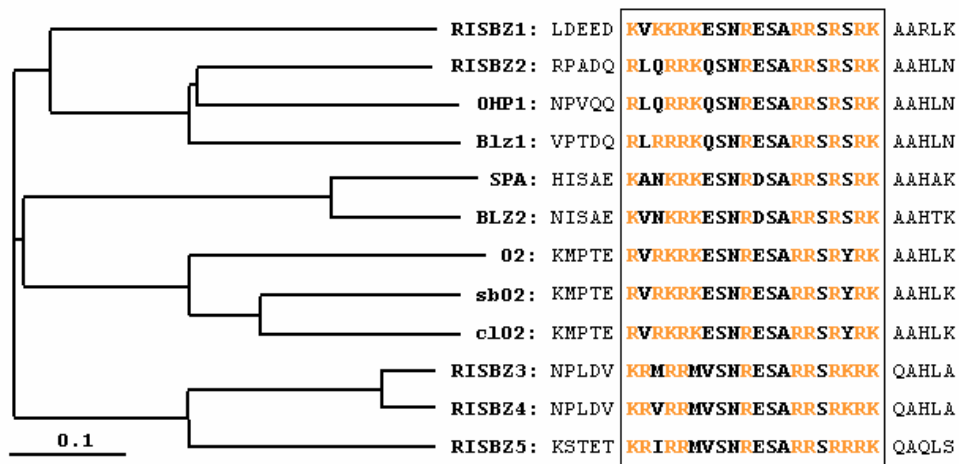


Figura 10. Anàlisi filogenètic de les bZIP relacionades amb l'expressió de gens de proteïnes de reserva de cereals. Dendrograma filogenètic obtingut a partir de la seqüència aminoacídica de proteïnes bZip amb el programa CLUSTAL X en que es mostra el grau de proximitat evolutiva entre aquest tipus de proteïnes. A la dreta s'emmarca el domini bàsic d'interacció amb el DNA, on destaca l'elevada conservació, sobretot en la posició ocupada pels aminoàcids bàsics (en taronja). Adaptat d'Onodera i col. (2001).

En les regions promotores dels gens de proteïnes de reserva de cereals s'han descrit 2 tipus de motiu reconeguts per factors de tipus bZip: el motiu *opac2* i els motius *GCN4-like*.

El motiu **opac2** (o2) s'ha definit sempre en base a un nucli palindròmic central format pels 4 nucleòtids **ACGT**, que és característic dels elements en *cis* que són reconeguts per factors de transcripció de tipus **bzip** (o cremallera de leucines), com es mostra a la figura **11**. La primera seqüència identificada com a diana del factor O2 va ser descrita al promotor del gen de l' α -zeïna de 22kDa (Schmidt i col., 1992).

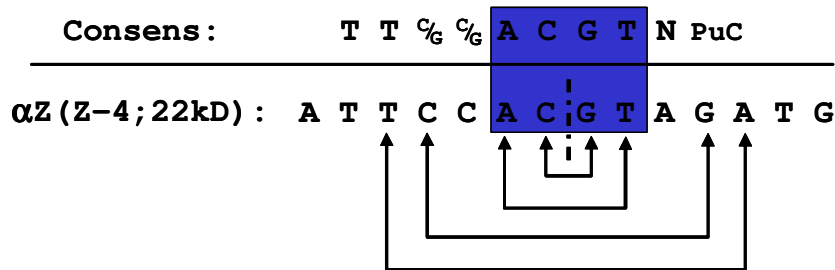


Figura 11. Seqüència consens pels motius o2. Es mostra la seqüència del motiu o2(-286 respecte al inici de traducció) de l' α Z(Z-4) de 22 kDa així com el consens definit per aquest factor. El marcat caràcter palindròmic d'aquesta seqüència s'assenyala sobre el motiu o2 del gen α Z(Z-4).

El motiu **GLM** (de *GCN4-like motif*) ha estat definit per homologia al motiu GCN4 de llevat (Hill i col., 1986) i a l'element AP1 de mamífers (Piette i col., 1988) i s'ha trobat sobretot en promotors dels gens de prolamines amb dominis repetitius rics en prolina com les B- i C-hordeïnes (Brandt i col., 1985; Forde i col., 1985; Entwistle i col., 1991), les α/β gliadines (Sumner-Smith i col., 1985; Wu i col., 1998), les ω -secalines (Hull, 1991), la LMW-glutenina (Hammond-Kosack i col., 1993) i la γ -zeïna (Marzábal i col., 1998). L'establiment del consens per a aquest motiu (figura 12) ha estat confirmat per assaigs de retard en gel (Wu i col., 1998) i, de forma similar al motiu *opac2*, destaca pel seu marcat caràcter palindròmic.

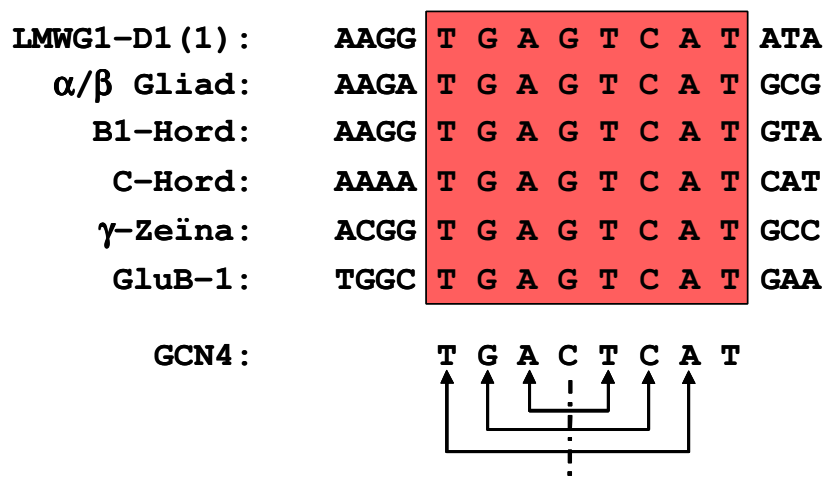


Figura 12. Comparació de la seqüència dels motius *GCN4-like*. A la figura es mostra la seqüència de 7 motius GLM de promotors de gens de proteïnes de reserva de cereals: GLM(-280) de la LMW Glutenina-1D1; GLM(-292) de l' α/β Gliadina; GLM(-274) de la B1-Hordeïna; GLM(-296) de la C-Hordeïna; GLM(-419) de la γ -Zeïna; GLM(-202) de la Glutelina-B1. Els nucleòtids que respecten el consens del motiu GCN4 es marquen amb un caixa vermella. La posició indicada fa referència a la distància al inici de traducció.

2.1.3. Factors *bZiPs* d'expressió específica a endosperma

Opac-2(O2)

El factor **Opac-2** va ser el primer factor de transcripció implicat en l'expressió de gens relacionats amb el desenvolupament de l'endosperma que es va clonar. La caracterització del mutant *o2* de blat de moro va mostrar una reducció de l'expressió dels gens de les α - i β -zeïnes o l'albúmina b-32 i va permetre el clonatge d'O2 mitjançant la tècnica *transposon tagging* (Schmidt i col., 1987). Posteriorment s'han anat descrivint nous gens activats per O2 a través dels motius *o2* presents en els seus promotors com les α -zeïnes de 19 i 22 kD, les β -zeïnes, l'albúmina b-32 i la proteïna de reserva 2S (Lohmer i col., 1991; Schmidt i col., 1992; Ueda i col., 1992; Vincentz i col., 1997). Opac-2, s'expressa exclusivament a endosperma a partir de 10 DAP, coincidint amb l'inici de la síntesi d'aquestes proteïnes de reserva. Més recentment s'ha descobert que l'expressió d'O2 i la seva activitat estan sotmeses al ritme circadià, suggerint alhora que els gens regulats per aquest factor presentin també variacions circadianes (Ciceri i col., 1997; 1999).

Posteriorment s'han clonat i caracteritzat els gens ortòlegs a O2 en *Shorghum* (sbO2) i *Coix* (cO2) (Pirovano i col., 1994; Vettore i col., 1998), que són idèntics al factor de blat de moro a nivell del seu domini bàsic. S'ha demostrat l'activació de les α -coixines per cO2 en assaigs funcionals en cèl·lules de tabac (Vettore i col., 1998) i, tot i que no s'han realitzat el mateix tipus d'experiments amb les β -coixines, l'activació transcripcional d'aquestes prolamines pel factor O2 de blat de moro (Cord Neto i col., 1995), suggereix que cO2 també serà capaç d'induir la seva expressió. Pel que fa a sbO2, s'ha demostrat la seva capacitat d'activació sobre el gen de la b-32 de blat de moro (Pirovano i col., 1994), però encara no s'ha analitzat el seu efecte sobre l'expressió dels gens de les kafirines.

Blz2, SPA i RISBZ1

A blat (SPA), ordi (Blz2) i arròs (RISBZ1) també s'han clonat bZiPs d'expressió específica a endosperma i implicades en l'expressió de prolamines (Albani i col., 1997; Oñate i col., 1999; Onodera i col., 2001). Són tots ells factors de transcripció amb una similitud a O2 superior al 70% en el domini d'unió al DNA, però que interaccionen amb motius de tipus GLM. Les petites diferències observades en aquest domini podrien explicar la preferència d'aquests factors de transcripció per un motiu GLM o o2, tot i que no es pot descartar l'existència d'una certa activitat creuada (Holdsworth i col., 1995; Wu i col., 1998).

Hi ha nombroses evidències que relacionen aquests 3 factors amb l'activació de l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes de reserva: en experiments d'expressió transitòria, SPA i Blz2 activen l'expressió dels gens LMWG-1D1 i B-hordeïna, respectivament, a través dels motius GLM. RISBZ1 activa més de 100 cops l'expressió d'un gen marcador sota control d'un promotor mínim fusionat a un pentàmer del motiu GLM (Onodera i col., 2001).

A arròs s'ha descrit una altra bZIP (RISBZ5) d'expressió específica a la llavor (Izawa i col., 1994), que presenta menor similitud a O2 i encara no s'ha determinat el tipus de gens que és capaç de regular. Estudis d'especificitat d'unió han revelat que té tendència a unir seqüències que contenen el motiu ACGT.

2.2. Factors de tipus Dit de Zinc

2.2.1. Generalitats dels Dits de zinc

El domini dit de zinc és una estructura molt comú, present a moltes de les proteïnes de la cèl·lula. La ubiqüitat d'aquest domini s'explica per la seva versatilitat, que li permet interaccionar amb un ampli espectre de molècules, com DNA, RNA, híbrids DNA:RNA i proteïnes. De fet, les proteïnes que amb aquest domini tenen funcions en les hi ha implicada alguna etapa de reconeixement molecular. A la figura **13** s'esquematitza l'estructura d'un típic domini dit de zinc, on es pot veure com 4 cisteïnes s'uneixen a un àtom de Zn per enllaços de coordinació. L'estructura terciària d'aquest domini ha estat resolta, per exemple pel factor de transcripció Sp1, en la que s'ha pogut reconèixer l'estructura tipus *β -hairpin*

seguida d'una hèlix α plegada al voltant de l'àtom de Zn (Narayan i col., 1997). Aquesta hèlix és l'estructura encarregada d'interaccionar amb el DNA a través del solc major. En general, les proteïnes tipus dit de Zn es classifiquen segons la naturalesa (cisteïna o histidina) i la distància entre els residus que quelen l'àtom de Zn.

2.2.2. Proteïnes Dof

Les proteïnes Dof (*DNA-binding with one finger*) són factors de transcripció exclusius de plantes, que es defineixen en funció d'un domini d'unió al DNA de 52 aminoàcids, constituït per un únic dit de zinc (figura 13). Tenint en compte la posició que ocupen els aminoàcids quelants ($CX_2CX_{21}CX_2C$), és el dit de Zn més gran que s'ha caracteritzat fins al moment.

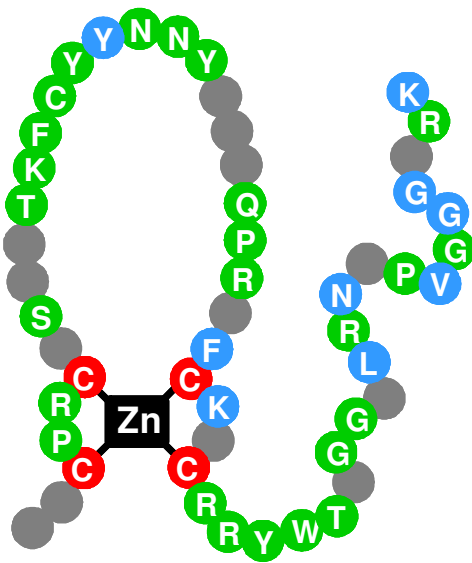


Figura 13. Estructura del domini Dof. Estructura proposada pel dit de Zn present en aquest domini (adaptada a partir de Yanagisawa, 2004). Les 4 Cys conservades que coordinen l'àtom de Zn es marquen en vermell. Els residus conservats a totes les DOfs es marquen en verd, els residus moderadament conservats es marquen en blau i els residus no conservats s'indiquen en gris.

El domini Dof d'aquestes proteïnes és l'encarregat d'interaccionar amb el DNA, però, al igual que els dits de Zn en general, aquest domini també es troba involucrat en interaccions proteïna-proteïna. S'han descrit múltiples exemples d'interacció que involucren proteïnes Dof, com la interacció entre el domini Dof de PBF i el factor de tipus bZip (Zhang i col., 1995; Vicente-Carbajosa i col., 1997), o la interacció de Dof1 de blat de moro amb ell mateix, amb Dof2 i inclús amb HMG1 (*High Mobility Group of proteins*) a través del domini Dof (Yanagisawa, 1997), tot i que no es coneix encara els sentit fisiològic de moltes d'aquestes interaccions.

Fora del domini Dof, el grau de similitud entre els membres d'aquesta família disminueix considerablement (figura 14), però sembla que l'extrem C-terminal de la proteïna formaria un segon domini independent del domini Dof encarregat de l'activació transcripcional (Yanagisawa, 2002). Les seqüències concretes involucrades en aquesta funció estan encara per determinar.

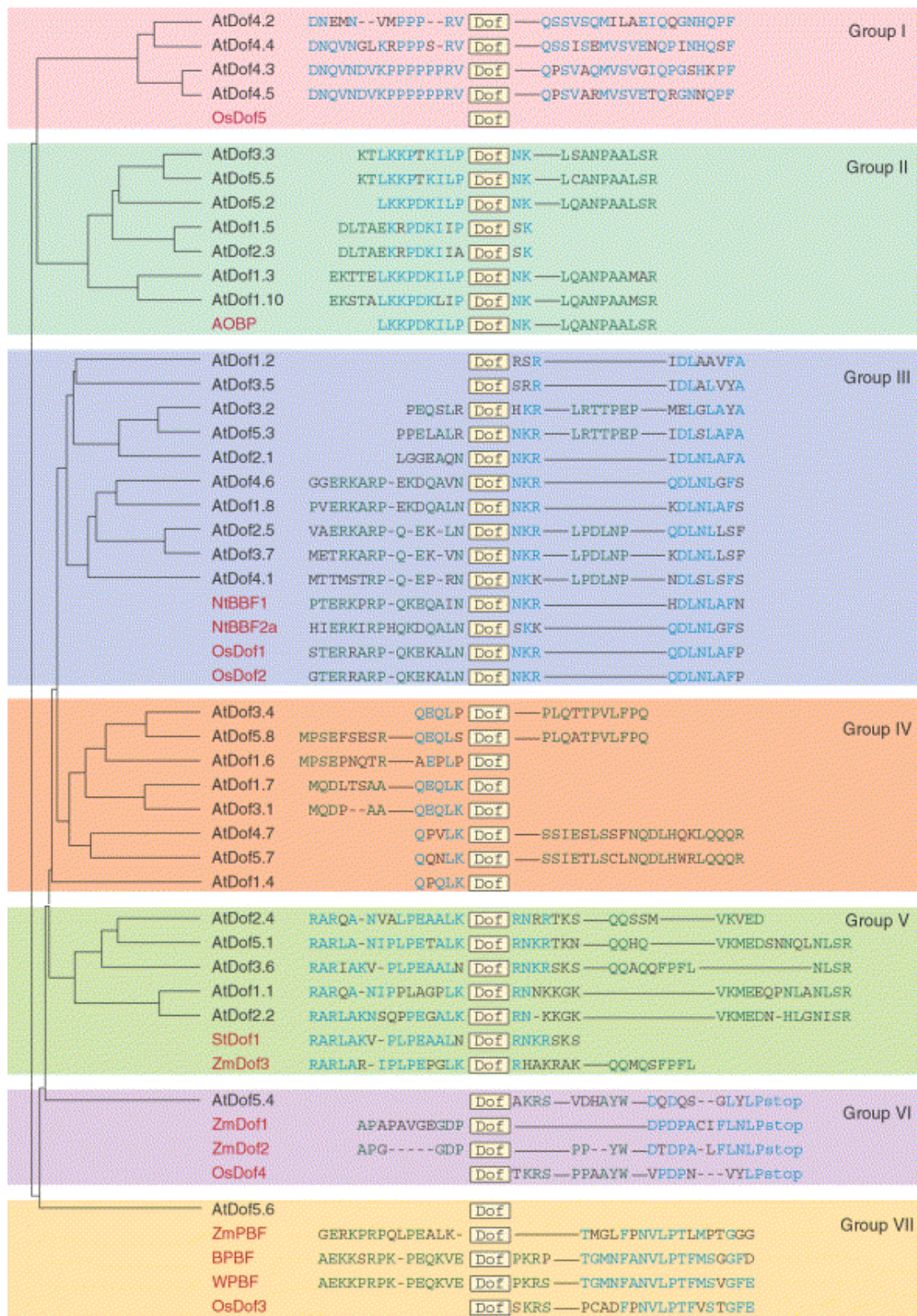


Figura 14. Alineament filogenètic entre diferents DOFs. Agrupació de les diferents proteïnes tipus Dof d'arabidopsis (At), tabac (Nt), blat (W), blat de moro (Zm), arròs (Os), patata (St) i AOBP1 de carbassa en base a la conservació de seqüència fora del domini Dof. En blau es marquen els residus conservats dins del subgrup i en verd els residus conservats només entre alguns dels membres del subgrup (adaptada a partir de Yanagisawa, 2002).

En conjunt, les proteïnes tipus Dof formen una família reduïda de factors de transcripció específics de plantes: s'estima que a *Arabidopsis thaliana* no hi ha més de 45 membres (Riechmann i col., 2000) i que a arròs n'hi hauria uns 30 (Lijavetzky i col., 2003); i que els seus membres estan implicats en la regulació de múltiples processos com la fotosíntesi, l'acumulació de proteïnes de reserva, el metabolisme del carboni o la resposta a hormones o estrès (Yanagisawa, 2002; 2004).

2.2.3. Diances de reconeixement pels factors de tipus Dof: Prolamin-box (Pb)

El domini Dof és l'encarregat de la interacció amb el DNA i s'ha pogut observar com aquesta interacció té lloc preferentment amb seqüències que contenen el motiu 5'-AAAG-3' o la corresponent versió complementària i invertida 5'-CTTT-3' (revisat per Yanagisawa, 2002; 2004).

Seqüències del tipus AAAG van ser identificades inicialment com un element present en la regió promotora dels gens de moltes prolamines al voltant de la posició -300 respecte al inici de transcripció (Boronat i col., 1986; Thompson i Larkins, 1989; Yoshihara i col., 1996). Aquest element es coneix com motiu **Pb** (*Prolamin-box*) o **EM** (*Endosperm Motif*) ja que és un dels motius més àmpliament distribuïts en els promotors dels gens de prolamines, que s'expressen durant el desenvolupament de l'endosperma. Posteriorment, la seva presència s'ha descrit en altres posicions i sovint en més d'una còpia en un mateix promotor (Brown i col., 1986; Colot i col., 1987; DeRose i col., 1989; Müller i Knudsen, 1993; Ottoboni i col., 1993), com es mostra a la figura **15**.

Existeixen certs indicis de que els motius Pb puguin ser les diances dels factors de transcripció encarregats de coordinar l'acumulació de les proteïnes de reserva amb el desenvolupament del gra: experiments de *foot-printing* sobre el promotor de la glutenina LMWD1 de blat indiquen que és el primer lloc que s'omple al iniciar-se l'activitat transcripcional del seu promotor, cap a 10 DAP (Hammond-Kosack i col., 1993) i que és l'únic element en *cis* dels descrits que es troba exclusivament en promotors específics d'endosperma. A la figura **15** es mostra una comparació de seqüència dels motius Pb per als que s'ha demostrat la funcionalitat en assaigs d'activitat. A partir dels alineaments d'aquestes i altres seqüències, Ueda i col. (1994) van proposar com a consens la seqüència de 7 nucleòtids **TGTAAG**. Diversos estudis d'unió *in vitro* a aquests elements han demostrat que la seqüència **AAAG** juga un paper essencial en la funcionalitat d'aquest motiu (Vicente-Carbajosa i col., 1997; Mena i col., 1998).

LMWG-1D1 (Pb1) :	CA	T	G	T	-	A	A	A	G	TT
LMWG-1D1 (Pb2) :	GT	T	G	T	A	A	A	A	G	TG
B-Hor :	CA	T	G	T	-	A	A	A	G	TG
γ ZPb1 :	CG	T	G	T	-	A	A	A	G	TA
α Z22KD :	TG	T	G	T	-	A	A	A	G	GT

Figura 15. Comparació de la seqüència dels motius Pb identificats en els promotors dels gens d'algunes prolamines. Comparació de la seqüència dels 5 motius Pb pels quals s'ha demostrat la

funcionalitat en promotors de proteïnes de reserva de cereals en assaigs funcionals d'expressió transitòria. Dins de la caixa groga s'han emmarcat els nucleòtids conservats en aquests elements. De dalt a baix les seqüències corresponen a: Pb1(-303) de la LMWG-1D1, Pb2(-338) de la LMWG-1D1, Pb(-300) de la B-hordeïna, Pb (-352) de la γ -zeïna i Pb(-330) de l' α -zeïna. La posició indicada per a cada motiu fa referència a la distància respecte a l'inici de traducció.

2.2.4. Factors de tipus Dof implicats en l'expressió dels gens de prolamines a cereals: Prolamin Binding Factors (PBF)

En base a la presència de la seqüència AAAG en el motiu Pb, que se sabia que era reconeguda per proteïnes amb domini Dof, es va aïllar el factor **PBF** (*Prolamin Binding Factor*) a partir de llibreries d'endosperma de blat de moro 18 DAP (Vicente-Carbajosa i col., 1997). *ZmPBF* és un gen específic d'endosperma, el patró d'expressió del qual durant el desenvolupament del gra coincideix amb l'inici de l'acumulació de proteïnes de reserva. A més, s'ha demostrat també, que *in vitro* reconeix de forma específica el motiu Pb de l'element bifactorial present al promotor del gen 22Z-4 (α -zeïna). Posteriorment s'han identificat també els ortòlegs de PBF a ordi (bPBF) i blat (wPBF), que presenten una gran similitud de seqüència a nivell del domini Dof, tot i que no en la resta de la seqüència. A ordi s'ha demostrat que la bPBF és un potent activador de l'expressió de les b-hordeïnes i la seva activitat té lloc a través de la caixa Pb present a l'element bifactorial present en el seu promotor (Mena i col., 1998). I pel que fa a PBF a blat de moro (mPBF), s'ha demostrat la seva capacitat activadora del gen de la γ -zeïna, que té lloc també a través de la caixa Pb present a l'element bifactorial present en el seu promotor (Marzábal, 2002).

2.3. Factors de tipus Myb

El primer factor de tipus Myb identificat va ser el codificat per l'oncogèn *v-Myb* derivat del virus de la mieloblastosi aviar (Klempnauer i col., 1982). Estudis de comparació de seqüències han evidenciat que l'origen d'aquest gen es troba en un gen present a vertebrats, que hauria mutat i passat a formar part del virus (Weston, 1998). Molts vertebrats contenen gens relacionats amb *v-Myb* i se n'han identificat de similars a insectes,

plantes, fongs i molses (Lipsick, 1996). Les proteïnes codificades per aquests gens estan involucrades en el control de la proliferació i diferenciació de múltiples tipus cel·lulars i totes elles contenen el domini Myb d'unió al DNA.

2.3.1. El domini Myb

Les proteïnes tipus Myb es caracteritzen per compartir un domini d'unió a DNA, que és el caràcter que defineix la família de factors de transcripció. Aquest domini Myb sol estar format per 2 o 3 repeticions imperfectes d'uns 50 aminoàcids, anomenats R1, R2 i R3, que contenen 3 residus de triptòfan, en posicions conservades (separats entre ells uns 19 aa), i que s'estructuren en 3 hèlices α , organitzades de forma similar als dominis *helix-turn-helix* (figura 16). La interacció amb el DNA té lloc a través de la tercera hèlix de les repeticions R2 i R3 i la unió és dependent de l'estat *redox* de la proteïna, de forma que per establir la unió és necessària un excés d'agents reductors. L'estructura tridimensional d'aquests dos dominis interaccionant amb el DNA ha estat resolta (Ogata i col., 1994), tal i com es mostra a la figura següent.

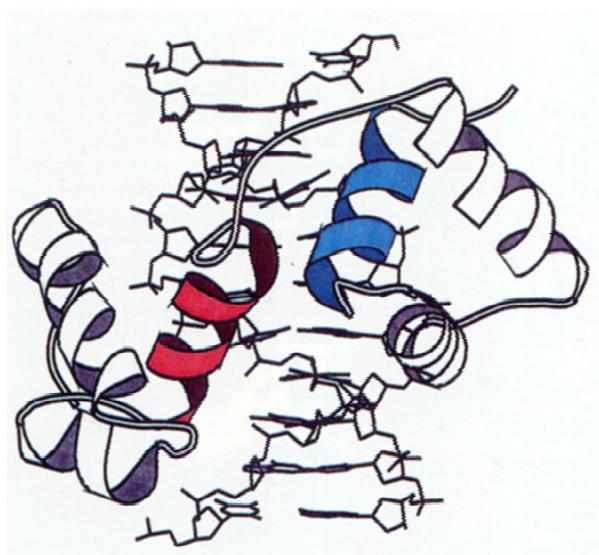


Figura 16. Estructura del domini Myb.

Estructura del domini mínim d'interacció amb el DNA de c-Myb, indicant en vermell i blau les hèlix α de les repeticions R2 i R3 implicades en la interacció amb el DNA (adaptat d'Ogata, 1994).

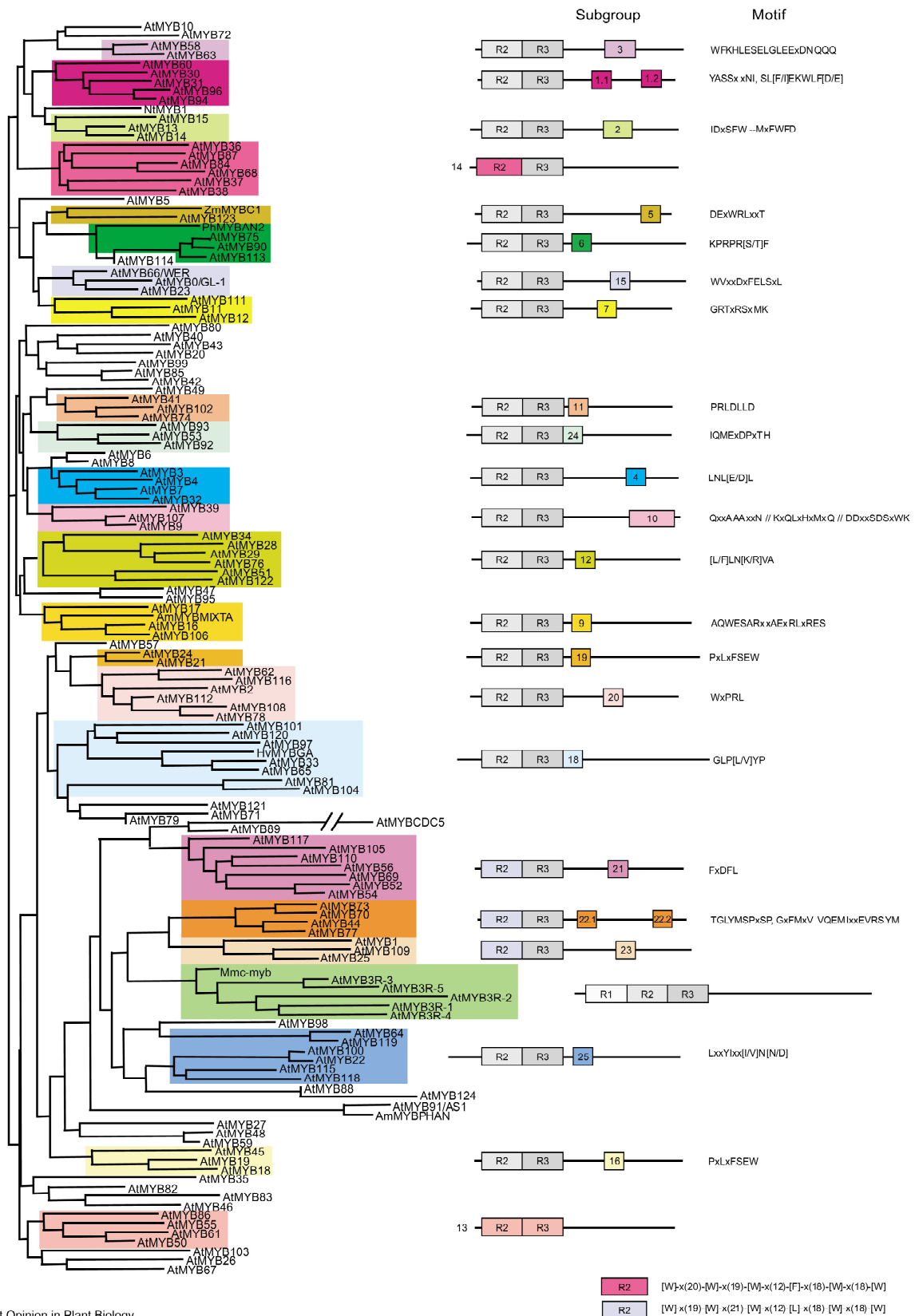
2.3.2. Generalitats dels factors de tipus Myb de plantes

El primer factor de tipus Myb clonat a plantes va ser C1 (Paz-Ares i col., 1987), que regula l'acumulació de pigments derivats de flavonoides a blat de moro. La presència d'aquest tipus de proteïnes tan a animals com a plantes venia a indicar que ambdós regnes compartien alguns sistemes de regulació de l'expressió gènica. Les formes de c-Myb de vertebrats s'han relacionat amb control de cicle cel·lular, proliferació i desenvolupament, contenen tres repeticions del domini Myb (R1R2R3) i, en conjunt, constitueixen un nombre discret de factors de transcripció. En canvi, a plantes es troben àmpliament distribuïdes i s'han relacionat amb funcions de proliferació i morfologia cel·lular, però també amb metabolisme secundari o resposta a hormones, en funcions clarament específiques de

plantes (revisat per Martin i Paz-Ares (1997)). L'elevada diversitat dels MYBs de plantes sembla que respon, doncs, a la diversitat funcional que presenten les plantes, respecte els animals. La majoria de MYBs de plantes contenen només les repeticions R2R3 (MYBs R₂R₃).

L'origen evolutiu del nombre de repeticions dels factors MYB és controvertit. Sembla clar que tots els MYBs deriven d'un procés de múltiples duplicacions gèniques a partir del domini Myb original i que l'evolució cap a factors amb 3 repeticions (MYB3R) va ocórrer abans de la separació evolutiva d'animals i plantes (Jiang i col., 2004). Aquesta hipòtesi està suportada pel fet que s'han trobat MYB3R tant a animals com a plantes i aquests MYBs presenten elevada homologia tant a nivell estructural com funcional en ambdós regnes: tenen residus de Trp en les posicions conservades de les 3 repeticions i funcions relacionades amb proliferació i diferenciació (Braun i Grotewold, 1999). Probablement el nombre discret és degut a pressió evolutiva negativa, ja que petits canvis degeneren sovint en neoplàsia, amb els conseqüents efectes deleteris (Rosinski i Atchley, 1998). Posteriorment la família de MYBs R2R3 de plantes s'hauria diversificat per fer front a funcions pròpies de plantes i s'hauria perdut a animals. L'evolució a plantes passa per múltiples duplicacions abans de la separació entre monocotiledònies i dicotiledònies i l'adquisició de característiques estructurals pròpies, com el canvi del primer Trp de R3 per un residu hidrofòbic o addició d'una Leu a la regió entre R2 i R3 (Dias i col., 2003). Posteriorment, una duplicació força recent hauria produït una important amplificació a cereals (Rabinowicz i col., 1999).

Les amplificacions per duplicació han donat lloc a una important diversificació funcional dels MYBs R2R3 a plantes, generant una de les famílies de factors de transcripció més abundants de plantes: a *Arabidopsis thaliana* s'han identificat més de 120 gens (Riechmann i col., 2000), més de 40 a *Petunia hybrida* (Avila i col., 1993) i més de 80 a blat de moro (Rabinowicz i col., 1999). Aquesta diversificació ha donat lloc a proteïnes amb dominis C-terminals molt diversos (Dias i col., 2003). Tot i així, en els MYBs R2R3 d'*Arabidopsis* es poden establir 22 subgrups en base a la conservació de seqüències fora del domini Myb (Kranz i col., 1998), com es mostra a la figura **17**. Per la majoria de subgrups, però, encara no s'ha pogut relacionar aquesta conservació estructural amb una conservació funcional. De fet, establir paral·lelismes entre seqüència C-terminal i funció és difícil, ja que s'ha caracteritzat la funció de molt pocs MYBs de plantes (Stracke i col., 2001), però s'han descrit tant activadors com repressors (Jin i col., 2000).



Current Opinion in Plant Biology

Figura 17. Alineament de les proteïnes MYB d'*A.thaliana*. Comparació dels MYBs d'arabidopsis amb Mybs bàsics d'altres espècies i establiment de subgrups per conservació de seqüència a nivell del domini C-terminal (adaptat d'Stracke (2001)).

2.3.3. Dianes de reconeixement pels factors de tipus Myb: caixes AACAA

L'establiment d'una seqüència consens vàlida per a una família de factors de transcripció tan àmplia com els Myb R2R3 de plantes és difícil, però l'estudi de diversos factors així com de les seves dianes ha permès establir algunes seqüències de reconeixement pròpies dels Mybs R2R3. L'ampli estudi a que ha estat sotmesa la ruta biosintètica dels flavonoides va permetre identificar els possibles gens diana dels factors reguladors de tipus Myb P i C1, així com els elements en *cis* als que s'uneixen en el promotor del gen A1 (Grotewold i col., 1994). Així, el consens d'unió per P es va establir com a CCT/AACC, que difereix força de la seqüència C/TAACGG reconeguda pels Mybs animals (Weston, 1992). Així, doncs, sembla que les seqüències de DNA que són capaces de reconèixer els MYBs de plantes i els MYBs animals difereixen sensiblement entre elles (Williams i Grotewold, 1997), degut a les substitucions d'aminoàcids en R2 i R3.

Paral·lelament, la identificació de nous Mybs implicats en la biosíntesi d'antocians a *Petunia* va permetre establir la seqüència TAACAACT com a consens del factor PhMyb3, d'expressió específica a pètals (Avila i col., 1993; Solano i col., 1995).

Amb aquestes dades, Gubler i col. es van basar en la relativa homologia de seqüència entre la regió central del GARE (figura 18) present al promotor del gen d'una α -amilasa d'ordi i la seqüència reconeguda pels R2R3 MYBs de plantes per clonar un factor Myb capaç de respondre a gibberel·lines (GA). Aquest factor, anomenat GAMYB, era capaç de transactivar l'expressió del gen de l' α -amilasa a partir del seu promotor en cèl·lules d'aleurona d'ordi (Gubler i col., 1995). Així, el consens per GAMYB s'establia com a TAACAA/GANTCT/CGG.

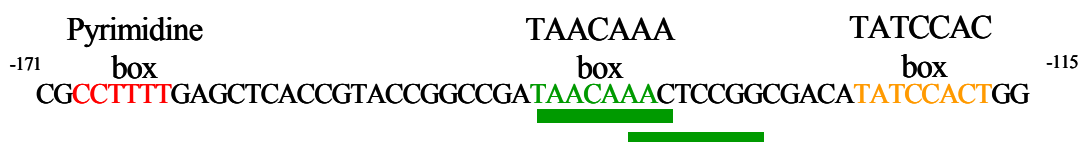


Figura 18. Llocs d'unió putatius per factors MYB al GARC (*GA Responsive Complex*) del promotor de l' α -amilasa d'alt PI d'ordi. Esquema del promotor a la regió del GARC, mostrant els 3 elements en *cis* identificats: una *Pyrimidine box*, l'element de resposta a GA (GARE) i la caixa TATC (o GATA). Els llocs putatius d'unió de factors Myb al GARE s'indiquen subratllats. La numeració dels nucleòtids es dona en referència a l'origen de transcripció (adaptat de Gubler i col. (1995)).

L'element **AACA** localitzat bàsicament en els promotors de les glutelins d'arròs (Takaiwa i col., 1996) també presenta certa similitud amb l'element GARE dels promotors dels gens d' α -amilases de cereals. Aquest fet, unit a l'establiment de les seqüències de reconeixement de HvGAMYB i PhMyb3 feia pensar en els factors de tipus MYB com a candidats a regular l'expressió de prolamines de cereals a través del motius AACA. Aquest element, junt amb un motiu GLM proper, és capaç d'activar la transcripció de forma específica a endosperma de plantes transgèniques de tabac (Yoshihara i Takaiwa, 1996) i la seva importància per a

l'activitat transcripcional de les prolamines d'arròs s'ha demostrat tant a nivell quantitatiu com qualitatiu (Wu i col., 2000). La presència d'aquest element s'ha descrit també en altres promotors de gens de prolamines en altres cereals (figura 19), com les B-hordeïnes a ordi (Díaz i col., 2002) o la γ -zeïna a blat de moro (Marzábal i col., 1998).

GluA-1: ATT	A A C A A A C T C T A T C	TTA	(-80/-61)	
GluB-1: TGC	A A C A A A C T	A T A T C	ACC	(-76/-57)
GluB-1: TGC	A A C A A A C T	A C A T C	ACC	(-258/-246)
B-Hor: TCA	A A C A A A C	A A A G A A	GAG	(-110/-96)
γZ-27: TCA	A A C A A A	T C C T C	TGT	(-450/-438)
AACA:	A A C A A A C T C T	A T C		
GARE: T	A A C A A A N T C T	G G		

Figura 19. Comparació dels motius AACA en els promotors dels gens de les glutelins d'arròs, la B-hordeïna d'ordi i la γ -zeïna de blat de moro. Comparació de la seqüència dels motius AACA proximals que es troben en els promotors dels gens dels dos grups de glutelins d'arròs, la B-hordeïna d'ordi i la γ -zeïna de blat de moro. La seqüència consens AACA indicada a sota correspon a la proposada per Takaiwa i col. (1996). També s'inclou la seqüència de l'element de resposta a àcid gibberèl·lic (GARE), emmarcant les coincidències amb el motiu AACA. Els nucleòtids que respecten el consens pel motiu AACA s'emmarquen en una caixa verda. La posició indicada fa referència a la distància a l'inici de traducció.

2.3.4. Factors de tipus Myb implicats en l'expressió de gens de prolamines a cereals

OsmYB5

Suzuki i col. van abordar el clonatge de gens tipus Myb que poguessin estar implicats en la regulació gènica de les glutelins d'arròs. Així, a partir d'una llibreria de cDNA de gra d'arròs van aïllar 5 clons que codificaven per factors de tipus Myb (Suzuki i col., 1997a). OsMyb1-4 mostraven homologia amb els gens C1 i P de blat de moro, que reconeixen seqüències del tipus PyAAC(G/T)G. Així doncs, no semblaven implicats en la regulació a través de l'element AACA dels promotors de glutelins. En canvi, OsMYB5 presentava un 80% de similitud amb HvGAMYB (Gubler i col., 1995) i PhMyb3 (Avila i col., 1993; Solano i col., 1995), que codifiquen per factors que reconeixien seqüències amb l'element central del motiu AACA: TAACAA/GANT (figura 19). El factor Osmyb5 s'unia a la caixa AACA, definint el seu lloc d'unió com AAC—A (Suzuki i col., 1998)

El gen *OsmYb5* s'expressa a tots els teixits de la planta analitzats, però actua com a repressor de l'expressió dels gens de les glutelins en teixits diferents de la llavor a través de la caixa AACA. En experiments de co-transformació de protoplasts derivats d'escutel, OsMYB5 no va ser capaç d'activar l'expressió del promotor GluB1, suggerint que requereix la

interacció amb altres factors per a transactivar l'expressió gènica de les glutel·lines a través de la caixa AACA (Suzuki i col., 1998).

HvGAMYB

Gubler i col. van clonar el factor GAMYB d'ordi (bGAMYB), caracteritzant-lo com a factor de resposta a gibberel·lines a aleurona, que era capaç de transactivar l'expressió de l' α -amilasa a partir del promotor del seu gen (Gubler i col., 1995). Així mateix, van establir la seqüència consens a la que HvGAMYB era capaç d'unir-se com TAACAA/GANTCT/CGG.

El gen *HvGAMYB* s'expressa a gra d'ordi durant el seu desenvolupament i la seva presència es detecta a tots els teixits analitzats (endosperma, aleurona, nucel·la, embrió i eixos vasculars), però no a teixits vegetatius ni a embrió madur (Díaz i col., 2002). S'ha descrit, a més, com a regulador positiu de l'expressió gènica de proteïnes de reserva a través de la caixa AACA present en el promotor de la B-hordeïna (Díaz i col., 2002). Díaz i col. demostren la unió específica de bGAMYB a l'element AACA present en el promotor de la B-hordeïna així com la seva capacitat activadora sobre el mateix promotor en experiments d'expressió transitòria. Així mateix, descriuen la interacció de la proteïna bGAMYB amb bPBF (l'ortòleg a PBF d'ordi) per a la formació dels complex transcripcionalment actiu que regula l'expressió de la B-hordeïna.

Malgrat la presència d'elements AACA en promotors dels gens de prolamines d'altres cereals (figura 15) i la descripció de gens homòlegs a GAMYB en altres cereals com arròs (Gubler i col., 1997), civada (Rollason i col., 1999) i blat (Chen i col., 2001), així com els seus possibles homòlegs a *Arabidopsis thaliana* (Gocal i col., 2001; Millar i Gubler, 2005), no s'ha descrit la regulació de cap altre gen de proteïnes de reserva per factors de tipus GAMYB.

2.4. Factors de tipus B3

2.4.1. El domini B3

El domini B3 va ser definit per primer cop com a domini d'unió a DNA conservat entre VP1 (McCarty i col., 1991) i ABI3 (Giraudat i col., 1992). El gen *ABI3* codifica per un factor de transcripció ortòleg al gen *VP1* de blat de moro (Giraudat i col., 1992), que s'expressa de forma abundant durant l'embriogènesi i que deixa d'expressar-se després de la germinació (Parcy i col., 1994). El fenotip del mutants *vp1* de blat de moro és similar al dels mutants *abi3*, que produeixen llavors intolerants a dessecació i insensibles a ABA (McCarty i col., 1991). Els ortòlegs ABI3/VP1 contenen 4 dominis conservats (A, B1, B2 i B3, veure figura 20). El domini B3 de VP1 s'ha descrit com a domini críptic d'unió a DNA a través d'una repetició RY de l'element Sph present al promotor del gen *C1* de blat de moro (Suzuki i col., 1997a) i s'ha establert que el motiu repetitiu RY es requereix per a l'activació transcripcional per ABI3 a *Arabidopsis* (Reidt i col., 2000). D'altra banda, s'ha suggerit que el domini B2

d'ABI3 estigui implicat en la regulació de l'expressió dels gens *At2S2*, *AtEm* i *AtEm6* (Bies-Etheve i col., 1999).

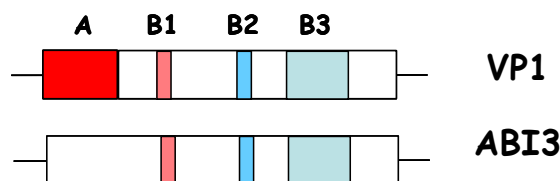


Figura 20. Dominis de les proteïnes ABI3/VP1. ABI3 i VP1 contenen 4 dominis conservats denominats A (en vermell), B1 (en rosa), B2 (en blau) i B3 (en verd). El domini N-terminal A és ric en residus àcids. El domini bàsic B1 és necessari per a la interacció física amb factors de transcripció de tipus bZIP. El domini B2 conté una putativa senyal de localització nuclear. El domini B3 es troba altament conservat (adaptat de Luerksen i col., 1998).

L'estructura del domini B3 ha estat recentment resolta per al factor RAV1 d'arabidopsis (Yamasaki i col., 2004). Yamasaki i col. proposen, a més, un model de plegament tridimensional similar per als factors ARF1 i ABI3 en base a l'homologia de seqüència entre els dominis B3 (figura 21). Aquests resultats són avalats per la recent descripció de l'estructura tridimensional d'un altre factor de transcripció putatiu de tipus B3 d'arabidopsis (Waltner i col., 2005).

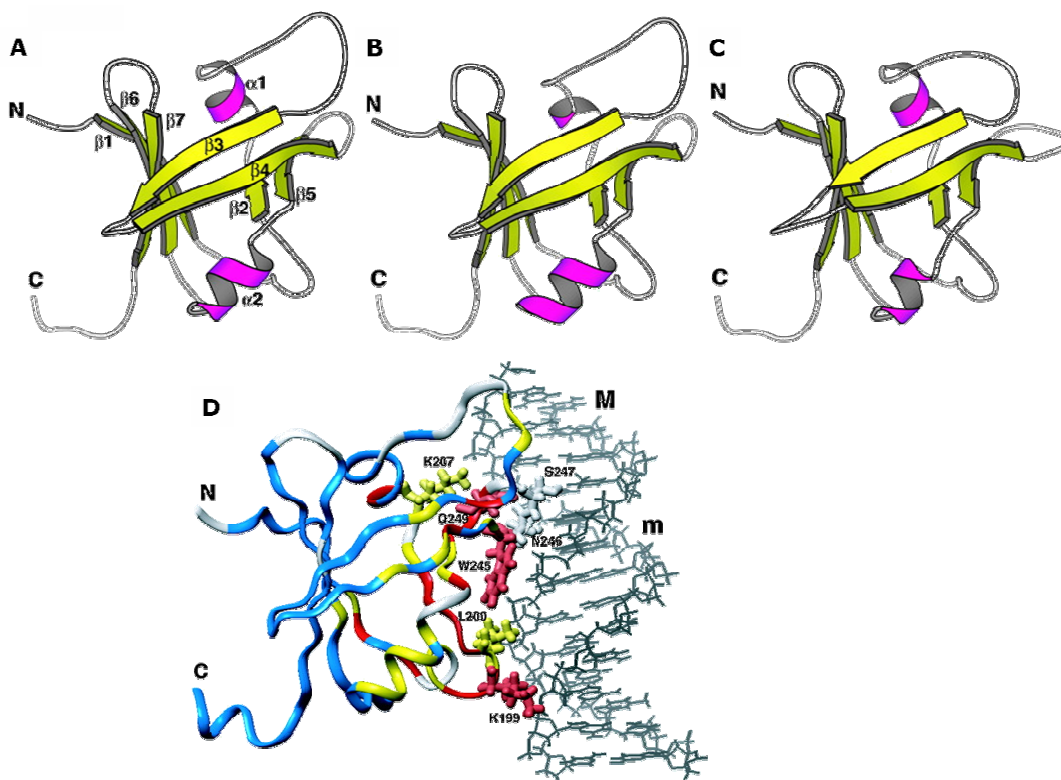


Figura 21. Estructura del domini B3 dels factor RAV1, ARF1 i ABI3 d'arabidopsis i model d'interacció amb el DNA. Estructura del domini B3 d'unió a DNA de RAV1 (A), ARF1 (B) i ABI3 (C), amb 7 fulles plegades β (en groc) estructurades com a barril- β i 2 hèlix α (en fúscia) localitzades als extrems del barril- β . **D.** Model que prediu la conformació adoptada per RAV1 en la interacció amb el DNA, mostrant els residus implicats en el reconeixement molecular (adaptat de Yamasaki, 2004).

2.4.2. Factors de transcripció que contenen dominis B3

A arabidopsis s'han trobat fins a 42 proteïnes que codifiquen per factors de transcripció que contenen el domini B3 conservat de VP1 i ABI3 i les cerques recents a les bases de dades generen més de 300 proteïnes putatives amb aquest tipus de dominis (Bateman i col., 2004). Totes aquestes proteïnes formen la superfamília de factors que contenen dominis B3 i s'han relacionat amb múltiples funcions cel·lulars.

La conservació a nivell de domini B3 entre tots els factors que el contenen és força elevada (figura 22), però la similitud tant a nivell de seqüència com estructural es perd ràpidament fora d'aquest domini.

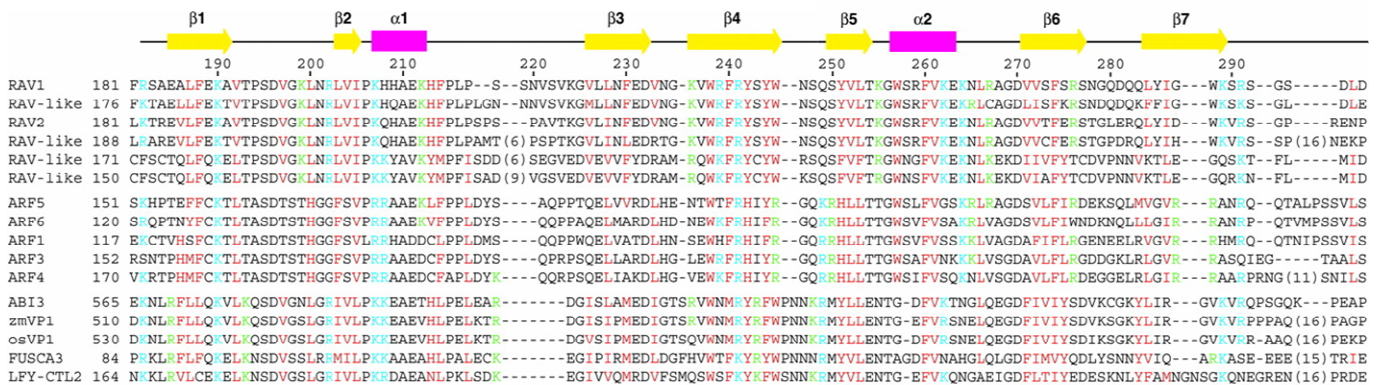


Figura 22. Alineament de dominis B3 de factors RAVs, ARFs i amb major homologia a ABI3/VP1. Alineament de seqüències de 6 factors tipus RAV i 6 factors ARF d'*A.thaliana* amb les seqüències dels factors AtABI3, ZmVP1 OsVP1 i els relacionats AtFUS3 i AtLEC2. Es mostren les diferents regions implicades en la formació de l'estructura tridimensional proposada per al domini B3 amb el mateix codi de colors adoptat en la figura 21. Adaptat de Yamasaki, 2004.

Així, els membres d'aquesta superfamília a s'agrupen en diferents subgrups en base a la seva relació a nivell funcional: el format per proteïnes amb més homologia a ABI3 i VP1, que inclou també els factors FUS3, LEC2 i HSI (Tsukagoshi i col., 2005), el format pels factors tipus RAV (*Related to ABI3/VP1* (Kagaya i col., 1999)), el format pels factors ARF (*Auxin Related Factors* (Ulmasov i col., 1997)) o el format pels factors AtREM (*Reproductive Meristem*), que inclou els factors amb un domini B3 més divergent (Franco-Zorrilla i col., 2002). Alguns d'aquests factors contenen, a més del domini B3, altres dominis conservats, com RAV, que conté un domini AP2/ERF addicional d'unió al DNA, o ARF, que conté dominis de resposta a auxines. Aquesta diversificació funcional correlaciona amb la similitud entre els seus dominis B3 (figura 23).

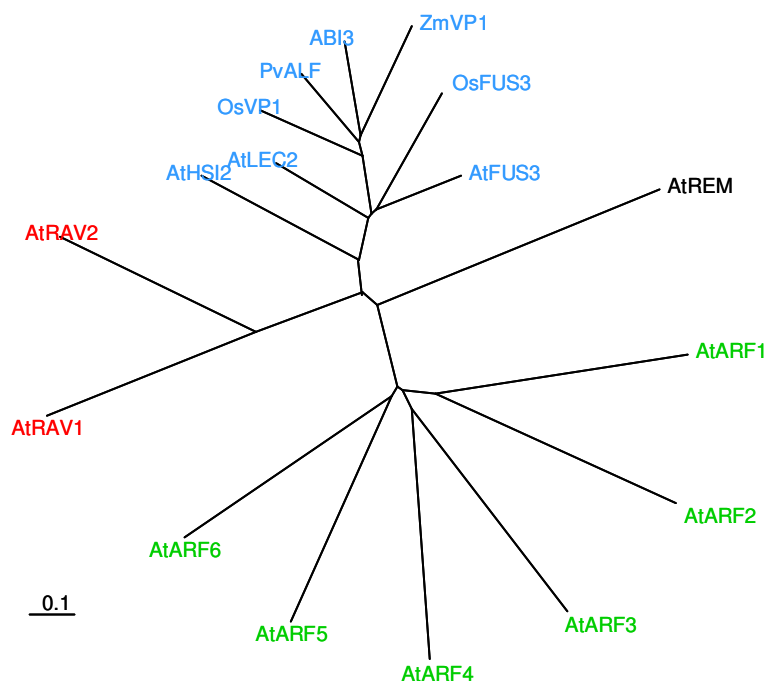


Figura 23. Arbre filogenètic de factors amb dominis B3 conservats. Agrupament filogenètic dels dominis B3 de diferents factors, en el que s'aprecia com dominis B3 propers corresponen a factors de transcripció amb funcions relacionades. En verd es marquen els factors ARF, en vermell els factors tipus RAV, en blau els factors amb més homologia a ABI3 i VP1 i en negre AtREM, que no s'alinea en cap grup.

2.4.3. Dianes de reconeixement pels factors B3 específics de llavor: els motius RY

L'establiment dels motius **RY** com a consens pels factors B3 propers a ABI3/VP1 es basa en amplis estudis filogenètics i funcionals realitzats tant a monocotiledònies com a dicotiledònies (Forde i col., 1985; Hoffman i Donaldson, 1985; Dickinson i col., 1988). Aquests motius són diana directa tant del grup VP1/ABI3 (que inclou els seus homòlegs a múltiples espècies vegetals) com dels factors propers FUS3 i LEC2. Així mateix, l'elevada homologia estructural i de seqüència a nivell de domini B3 suggereix que les seqüències de DNA reconegudes pels diferents factors B3 tinguin també certa homologia. Així, es pot establir un consens pels factors ABI3/VP1 i RAV1 com CAC/TG/CC/TA/G i un consens similar per RAV1 i ARFs com C/TA/GC/TCTG/C (Yamasaki i col., 2004).

Els motius RY van ser descrits per primer cop com a elements implicats en la regulació dels gens que codifiquen per lectines a llavor de *Phaseolus vulgaris* (Hoffman i Donaldson, 1985). Aquests elements són repeticions alternades de purines (R) i pirimidines (Y) que es troben a uns 300 bp a 3' de l'inici de transcripció de gens específics de llavor de llegums (Hoffman i Donaldson, 1985; Voelker i col., 1986; Dickinson i col., 1988) i també de cereals (Forde i col., 1985). Aquests motius presenten elevada similitud amb l'element Sph, implicat en la regulació dels gens *Em* i *C1* de blat de moro a través del regulador transcripcional VP1 (Vasil i col., 1995). La seqüència consens per a aquests elements es va establir en base a assaigs funcionals sobre els promotors DLEC2 i PHsβ amb el factor PvALF (homòleg a VP1 i

ABI3 a *Phaseolus vulgaris*) com CATGC (Bobb i col., 1997). L'elevada conservació d'aquest element (figura 24) i del motiu Sph en promotors de gens tant de dicotiledònies (lleguminoses) com de monocotiledònies (cereals) indica la conservació de mecanismes de regulació de l'expressió gènica en l'etapa de maduració de la llavor (revisat per Wohlfarth (1998) i Shewry (2002)). Aquest tipus de motius s'han trobat també en les regions promotores de gens de proteïnes de tipus LEA de cereals, com ZmRab17 o OsRab16 (Baumlein i col., 1992) i també en els promotors d'oleosines (Braybrook i col., 2006).

At2SAlb (1) :	ACTC	C A T G C A	A G	TCT	(-99/-92)
GmGly4 :	TAGC	C A T G C A	A G	GTG	(-95/-88)
PsLegA :	TAAC	C A T G C A	A G	ATG	(-109/-102)
PsLegB :	TAGC	C A T G C A	A G	CTG	(-109/-102)
γ-Zeïna :	GAGT	C A T G C	C G A	GAT	(-413/-406)
B-Hor :	GAGT	C A T G C A T	A	CCA	(-269/-262)

Consens RY :

Figura 24. Comparació dels motius RY presents en gens de proteïnes de reserva específiques de llavor. Comparació de la seqüència dels motius RY que es troben en els promotors de l'albumina 2S d'*Arabidopsis*, la glicinina 4 de *Glycine max*, les legumines A i B de *Pisum sativum*, la γ -zeïna de blat de moro i la B-hordeïna d'ordi. La seqüència consens per RY indicada a sota correspon a la proposada per Dickinson i col. (1988). Els nucleòtids que respecten el consens pel motiu RY s'emmarquen en una caixa blava. La posició indicada fa referència a la distància a l'inici de traducció.

Estudis d'expressió transitòria en protoplasts han demostrat la funcionalitat de l'associació entre el motiu RY i factors de transcripció de tipus B3, com PvALF, ABI3 i FUS3 (Bobb i col., 1997; Ezcurra i col., 2000; Reidt i col., 2000; Monke i col., 2004). A més, el domini B3 aïllat del factor VP1 és capaç d'unir-se de forma específica a l'element Sph/RY TCCATGCAT involucrat en la inducció del gen C1 de blat de moro a través de VP1 (Suzuki i col., 1997b).

2.4.4. Factors B3 implicats en l'expressió gènica de proteïnes de reserva de llavor

Estudis genètics a *Arabidopsis thaliana* han permès identificar una sèrie de mutants afectats en la fase de maduració de la llavor. Aquests mutants han rebut el nom de *leafy cotyledon* perquè els seus cotiledons presenten caràcters propis de fulla, com la presència de tricomes (Meinke i col., 1994). A més, aquests mutants acumulen quantitats reduïdes de certes proteïnes de reserva a la llavor, són intolerants a la dessecació i mostren un cert grau de viviparitat. S'han descrit 3 reguladors transcripcionals relacionats amb aquest fenotip: *LEC1*, *LEC2* i *FUS3*. *LEC1* codifica fer un factor de tipus HAP3 (Lotan i col., 1998), mentre que *LEC2* i *FUS3* codifiquen per factors de tipus B3 (Luerksen i col., 1998; Stone i col., 2001).

AtFUSCA3 (o FUS3), el factor codificat per *FUS3*, és un factor de transcripció que conté un domini B3 amb elevada similitud al que presenten els gens ortòlegs ABI3 i VP1, però al que li manca la regió N-terminal (figura 25). S'ha descrit que el motiu repetitiu RY està sota regulació de l'activador transcripcional FUS3 (revisat per Wohlfarth (1998)) i s'ha demostrat que la repetició RY és diana directa del domini B3 de FUS3 (Reidt i col., 2000). El factor LEC2, en canvi, s'ha descrit com a regulador de l'expressió d'oleosines a aràbidopsis, a més d'estar involucrat en la regulació de proteïnes de reserva (Braybrook i col., 2006).

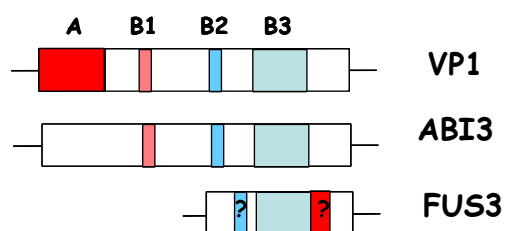


Figura 25. Conservació estructural entre les proteïnes ABI3/VP1 i FUSCA3. ABI3 i VP1 contenen 4 dominis conservats denominats A (en vermell), B1 (en rosa), B2 (en blau) i B3 (en verd). FUS3 és una versió truncada d'ABI3/VP1, que conté només el domini B3, un domini B2 incomplet i un putatiu domini activador a C-terminal. Adaptat de Luerksen i col., 1998.

Tot i que ABI3 i FUS3 actuen com a reguladors transcripcionals de forma cooperativa a través del motiu RY, també funcionen de forma independent controlant l'expressió dels gens de proteïnes de reserva de llavor. Això suggereix que altres dominis, a part del ja descrit B3, són importants en la funció d'aquests factors. Una de les principals diferències entre ABI3 i FUS3 és el seu paper diferencial en la resposta a ABA de la llavor. El factor de transcripció TRAB1 d'arròs, que s'uneix a l'element ABRE interacciona amb la regió N-terminal de OsVP1, l'ortòleg a VP1 d'arròs, de forma depenent a ABA (Hobo i col., 1999). És interessant destacar que el gen *ABI5* d'aràbidopsis codifica per un factor de transcripció de tipus bZIP similar a TRAB1 d'arròs (Finkelstein i Lynch, 2000) i sembla que s'uneix a l'element ABRE *in vitro* (Lopez-Molina i col., 2001). Així, sembla que el domini N-terminal d'ABI3 (els dominis A i B1), que li manca a FUS3, és important per a l'activació transcripcional mediada per ABA (Reidt i col., 2000).

La cerca a les bases de dades ha permès identificar un gen putatiu d'arròs amb homologia a *FUS3* d'*A. thaliana*, però fins al moment no s'ha descrit cap factor que homòleg a *FUS3* o *LEC2* en cereals, que pugui regular l'expressió de gens de productes de reserva en cereals.

Introducció