

## **VI. CONCLUSIONS**



## VI. CONCLUSIONS

- 1.- L'activitat del factor de transcripció PBF depèn de la presència del domini Dof intacte de la proteïna.
- 2.- El domini activador de PBF es localitza a la regió C-terminal de la proteïna i en aquesta funció es troben implicats tant el domini ric en asparagina com els dominis rics en serina, susceptibles de ser regulats per fosforilació.
- 3.- Hem clonat el gen *ZmGAMYB* a partir de RNA total d'endosperma de blat de moro a 15 DAP. Aquest gen codifica per un factor de tipus Myb R2R3, mGAMYB, que presenta una identitat propera al 70% i una similitud superior al 98% amb la resta de factors GAMYB de cereals descrits fins al moment.
- 4.- El gen *ZmGAMYB* s'expressa a endosperma de blat de moro de forma restringida i lligada al desenvolupament del gra, des de 8 fins a 30 DAP, amb un pic de màxima expressió entre 12 i 15 DAP.
- 5.- GAMYB de blat de moro, igual que el seu ortòleg d'ordi, és un activador transcripcional del gen  $\gamma Z$  en experiments d'expressió transitòria d'endospermes de blat de moro.
- 6.- El factor mGAMYB s'uneix de forma específica a la caixa AACA present a la regió proximal del promotor del gen  $\gamma Z$  en experiments de retard en gel i la seva unió *in vitro* és afectada per la presència d'altres elements reguladors propers a la caixa AACA. Extractes nuclears de blat de moro de 12 DAP mostren una activitat d'unió específica a la mateixa caixa AACA, que concorda amb la presència de mGAMYB en aquests extractes.
- 7.- Experiments d'immunohistoquímica sobre grans de blat de moro a 15 i 20 DAP amb un anticòs policlonal determinen la presència del factor mGAMYB principalment a les dues o tres primeres capes de l'endosperma de blat de moro (aleurona i regió subaleurona) amb una localització preferentment nuclear però també citoplasmàtica. Aquest perfil concorda amb el patró d'expressió del gen de la  $\gamma$ -zeïna i amb el fet que GAMYB en sigui un regulador transcripcional.

## Conclusions

8.- Hem clonat *ZmFUSCA3*, un possible gen homòleg al gen *FUSCA3* d'*Arabidopsis thaliana* a partir d'RNA total d'endosperma de blat de moro a 15 DAP. Aquest gen codifica per una proteïna (ZmFUSCA3) que presenta un domini d'unió a DNA de tipus B3 a la seva regió central i és el segon factor de tipus B3 clonat a blat de moro després de VP1. Aquest factor presenta una identitat del 30% i una similitud del 38% amb *FUSCA3* d'*Arabidopsis thaliana* i una identitat del 64% i una similitud del 70% amb un factor putatiu anomenat com a homòleg a *FUSCA3* al genoma d'*Oryza sativa*.

9.- El factor ZmFUSCA3 recombinant és capaç d'unir-se a la caixa RY present a la regió proximal del promotor del gen de la  $\gamma$ -zeïna, però de forma poc específica, suggerint que la seqüència CATGC present a la regió proximal del gen  $\gamma Z$  no és suficient per conferir especificitat d'unió al factor.

10.- El gen *ZmFUSCA3* s'expressa fortament a embrió entre 15 i 30 DAP, amb un pic de màxima expressió a 18-20 DAP. La presència del factor a embrió de blat de moro es detecta des de 15 fins a 20 DAP, però l'anticòs policlonal contra la proteïna ZmFUSCA3 que hem generat no és capaç de detectar la proteïna a endosperma en cap moment del desenvolupament. El seu patró d'expressió concorda amb que sigui un regulador de processos lligats al desenvolupament de l'embrió de blat de moro i no pas un regulador gènic de proteïnes de reserva d'endosperma.

11.- Hem detectat també la presència del transcrit pel gen *ZmFUSCA3* a endosperma de blat de moro, des de 8 fins a 30 DAP, però no arribem a detectar acumulació del factor a endosperma, suggerint uns nivells de proteïna molt baixos en aquest teixit. Conseqüentment, el factor ZmFUSCA3 no és capaç d'activar l'expressió del gen  $\gamma Z$  en experiments d'expressió transitòria a endosperma de blat de moro.

12.- Experiments d'immunohistoquímica sobre gra de blat de moro a 15 i 20 DAP determinen la intensa presència del factor *FUSCA3* a la capa aleurona i a l'escutel de l'embrió, on es localitza a tot el citoplasma, però queda exclòs del nucli. En molt menor grau, es detecta també marcatge a les dues primeres capes cel·lulars de la regió subaleurona de l'endosperma, on la proteïna es localitza principalment a nucli i, en menor grau, a citoplasma. Aquesta distribució suggereix que l'activitat transcripcional de *ZmFUSCA3* depèn d'un estímul que faci que la proteïna es transloqui al nucli, on pugui regular els seus gens diana.

## *Conclusions*