

Identificación de QTL para dormición y análisis molecular de la interacción ABA-GAs en cariopses de sorgo granífero

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Agropecuarias

Renata Cantoro

Lic. En Ciencias Biológicas – Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Universidad de Río Cuarto – Año de egreso 2007

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET y Cátedra de Cultivos Industriales
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Roberto Luis Benech Arnold

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Dr. Doctor of Philosophy (University of Southampton)
Título de posgrado (Universidad)

Co-director

María Verónica Rodríguez

Lic. En Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)
Dr. En Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Ruth Heinz

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)
Dr. En Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Roberto Luis Benech Arnold

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor of Philosophy (University of Southampton)

JURADO

Ruth Amelia Heinz

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)
Dra. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Fernando Carrari

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Oscar Lorenzo Sánchez

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Salamanca)
Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Salamanca)

Fecha de defensa de la tesis: 13 de MARZO de 2014

A mis padres y hermanos
A Guille

Agradecimientos

A Vero, porque durante estos años he aprendido mucho de vos, no solo en lo científico sino también en lo personal. Estuviste cada vez que lo necesité para guiar los experimentos, discutir resultados, o dar una mano con lo que necesitara. Gracias por haberme hecho ejercitar el sentido común, el espíritu crítico y por sobre todas las cosas por enseñarme a que nada es tan terrible.

A Roberto, gracias por haberme dado la posibilidad de formar parte de tu grupo de trabajo y por haber dirigido esta tesis. Gracias por la libertad que me diste para trabajar y por tu constante optimismo.

A Ruth por ser parte del comité de tesis, por haberme brindado un espacio en tu grupo de trabajo y por tu calidad humana.

A Luis, gracias por tu gran ayuda en todo momento, tu paciencia y tu humildad. Espero algún día poder retribuir toda la ayuda que me diste durante estos años.

A mis papas, por su cariño infinito, por haberme enseñado que lo más importante en la vida es hacer lo que a uno le gusta y lo hace feliz. Gracias por la libertad que siempre me dieron.

A Guille. Esta tesis es tan tuya como mía. Estuviste presente desde sus comienzos. Gracias por tu amor incondicional y tu paciencia. Gracias por el soporte del último año de tesis, por ayudarme a estar bien cuando las cosas no salían como esperaba. Gracias por tu gran sentido del humor que todo lo mejora. Gracias por quererme tanto y hacer que cada día te quiera más.

A mis hermanos, a mi cuñada y a mis sobrinos, porque aun en la distancia fueron parte del “aguante” durante los años del doctorado, cada fin de semana de mates, asado, charlas y juegos compartidos los guardo en el corazón.

A Norma, Jorge y Gerardo por su ayuda invaluable en los ensayos y análisis de QTL.

A Carlitos, por tu valioso aporte en esta tesis, por tu generosidad y tu gran capacidad para generar y discutir nuevas ideas.

A Mirta y Silvina, por su ayuda técnica incondicional en los muestreos de embriones.

A Rodrigo Sieria por compartir tus conocimientos de EMSA y a Ángeles Zorreguieta por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio.

A Maxi Sánchez y Ana Distéfano, por su ayuda en la expresión de proteínas.

Al CSIRO-Canberra, a la Fundación Crawford, a Frank Gubler y a Jean Finnegan, por haber hecho posible mis estadías en Australia durante el transcurso del doctorado.

Al CONICET por haberme becado y haber posibilitado que realice esta tesis, y a la FAUBA por haberme brindado un lugar de trabajo.

A los jurados, por haberse tomado el tiempo de leer la tesis y hacer valiosos aportes.

A mis compañeros de laboratorio (Vero, Guille, Gabi, Paula, Nati y Cristian) por ponerle buena onda a largos días de trabajo y por estar siempre que necesité ayuda durante el doctorado.

A todos los miembros de las cátedras de cultivos industriales y fisiología vegetal, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo tareas docentes durante estos años, acompañada de excelentes docentes y personas.

A todos los integrantes de cereales y producción vegetal, porque siempre me sentí como un integrante más, a pesar de no haberlo sido formalmente. Gracias por los almuerzos, festejos, charlas y viajes compartidos.

A todos los compañeros y amigos que he cosechado durante estos años en la FAUBA. No los nombro de a uno porque seguro me olvido de alguien, ustedes saben cuánto los quiero.

A mis amigas cordobesas, esas que nunca entendieron muy bien que hacía los fines de semana “contando semillitas germinadas”, gracias por ponerle buena onda a estos años de doctorado.

¡Muchas gracias a todos!

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones derivadas de la tesis doctoral:

Cantoro R, Crocco CD, Benech-Arnold RL, Rodríguez MV. 2013. *In vitro* binding of *Sorghum bicolor* transcription factors ABI4 and ABI5 to a conserved region of a GA 2-OXIDASE promoter: possible role of this interaction in the expression of seed dormancy. *Journal of Experimental Botany*. 64(18), 5721–5735.

Publicaciones relacionadas a la tesis doctoral:

Rodríguez MV, Mendiondo GM, **Cantoro R**, Auge G, Luna V, Masciarelli O, Benech-Arnold RL. 2012. Seed dormancy and GA metabolism in Sorghum. *Plant & cell Physiology*. 53 (1): 64-80.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	4
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
CAPITULO 1	23
Introducción general: revisión de antecedentes y presentación del problema	23
Resumen.....	23
1.1. Introducción	24
1.1.1. Dormición y germinación	24
1.1.2. Dormición y brotado pre-cosecha en cultivos de cereales	26
1.1.3. Regulación hormonal de la dormición: Ácido abscisico	26
1.1.4. Regulación hormonal de la dormición: Giberelinas y la relación ABA/GAs... ..	28
1.1.5. Naturaleza cuantitativa del carácter dormición.....	29
1.1.6. Marcadores moleculares y poblaciones de mapeo	29
1.1.7. Análisis de QTL.....	30
1.1.8. Caracterización de la dormición de granos de sorgo granífero.....	30
1.2. Objetivos	33
1.2.1. Objetivo general:.....	33
1.2.2. Objetivos específicos:	33
1.3. Hipótesis de trabajo.....	34
CAPITULO 2	37
Identificación de QTL vinculados al carácter dormición en una población segregante de <i>Sorghum bicolor</i>	37
Resumen.....	37
2.1. Introducción	38
2.2. Materiales y métodos	40
2.2.1. Población de mapeo	40
2.2.2. Evaluación de la dormición de semillas en la población de mapeo (fenotipificación).....	41
2.2.3. Búsqueda de polimorfismo en genes candidatos para dormición	42
2.2.4. Análisis de marcadores microsátélites (genotipificación)	42
2.2.5. Construcción de mapa de ligamiento o mapa genético	43
2.2.6. Análisis de QTL.....	44
2.2.6.1. CIM	44
2.2.6.2. MTM.....	45
2.2.7. Análisis <i>in silico</i> de las regiones del genoma comprendidas por los QTL detectados.....	46
2.3. Resultados	47
2.3.1. Evaluación fenotípica.....	47
2.3.2. Identificación de polimorfismos en genes candidatos para dormición	49
2.3.3. Análisis de marcadores moleculares y construcción de mapa de ligamiento ..	50
2.3.4. Identificación de QTL.....	51
2.3.4.1. Mapeo por intervalos compuestos.....	51
2.3.4.2. Mapeo de caracteres múltiples	54
2.3.5. Análisis <i>in silico</i> de los QTL detectados.....	56

2.4. Discusión.....	57
CAPITULO 3	65
Posible regulación del catabolismo de las giberelinas por el ABA durante la expresión de la dormición: ABI5 y ABI4 de sorgo se unen <i>in vitro</i> al promotor de un gen <i>GA2-oxidasa</i>	65
Resumen.....	65
3.1. Introducción	66
3.2. Materiales y métodos	70
3.2.1. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>SbGA2ox3</i>	70
3.2.2. Ensayos de retardo en gel o Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)...	70
3.2.3. Material vegetal, extracción de RNA y clonado de <i>SbABI4</i> y <i>SbABI5</i>	70
3.2.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>SbABI4</i> y <i>SbABI5</i> ..	71
3.2.5. Obtención de extracto proteico total de <i>E. coli</i> (control negativo)	72
3.2.6. Construcción de la sonda de <i>SbGA2ox3</i>	72
3.2.7. Obtención de la sonda competidoras (específica y no específica), sondas mutadas y sonda control.....	72
3.2.8. Ensayos de retardo en gel.....	72
3.2.9. Identificación de secuencias de <i>GA2ox</i> y análisis filogenético	73
3.3. Resultados	74
3.3.1. Análisis <i>in silico</i> de la región regulatoria del gen <i>SbGA2ox3</i>	74
3.3.2. <i>SbABI4</i> y <i>SbABI5</i> se unen al promotor de <i>SbGA2ox3 in vitro</i>	76
3.3.3. <i>SbABI4</i> y <i>SbABI5</i> no se unen <i>in vitro</i> al <i>SbGA2ox3</i> de forma simultánea.	80
3.3.4. El “Complejo de respuesta al ABA” o ABRC se encuentra en el promotor de otros genes <i>GA2ox</i> de monocotiledóneas	81
3.4. Discusión.....	85
CAPITULO 4	91
Discusión General	91
Resumen.....	91
4.1. Contexto de la problemática abordada	92
4.2. Dos aproximaciones con un mismo objetivo	93
4.3. Bases genéticas de la dormición en sorgo.....	95
4.4. Interacción entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs.....	96
4.5. Implicancias para futuras investigaciones.....	97
4.5.1. Corroboración de los QTL identificados y mapeo fino de los mismos.....	97
4.2.5. <i>Cross-talk</i> entre señalización del ABA-catabolismo de GAs	98
4.6. Aplicaciones futuras.....	99
4.7. Modelo integrado de los resultados obtenidos	99
BIBLIOGRAFÍA	102
APÉNDICE	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Análisis de la varianza para datos fenotípicos (IG) de granos maduros (45 DPA), en Manfredi. F.V.: fuente de variación; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrado medio; V_E : varianza ambiental; V_G : varianza genotípica; V_r : varianza de las repeticiones; g: número de familias F_3 ; r: número de repeticiones (3).	49
Tabla 2.2. Resumen de los QTL detectados para dormición, detallando GL: grupo de ligamiento; LR máx.: valor de LR máximo; LOD-2(i.): posición LOD-2 hacia la izquierda; LOD-2(d.): posición LOD-2 hacia la derecha; intervalo: intervalo entre marcadores SSR; Pos. LR máx.: posición del LR máximo; R^2 : proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL; a: efectos aditivos y d: desvío por dominancia.....	56
Tabla 2.3. QTL detectados, intervalo dentro del cual se encontraron comprendidos, tamaño del intervalo en pares de bases (pb), tamaño del intervalo en cM, y cantidad de genes incluidos en cada caso.....	57
Tabla suplementaria 2.1. Genes candidatos vinculados al metabolismo de las giberelinas o a la señalización del ABA. Se muestran los códigos de identificación y ubicación en el genoma para cada uno de ellos.....	112
Tabla suplementaria 2.2. Marcadores microsatélites utilizados para la construcción del mapa de ligamiento. Se muestra el código tal como se informó en la tesis, el código público correspondiente y los primers utilizados para su amplificación.	113
Tabla suplementaria 2.3. Análisis <i>in silico</i> de las regiones genómicas comprendidas por los QTL identificados. Se detalla para cada QTL (<i>qDOR-5</i> , <i>qDOR-9</i> y <i>qDOR-10</i>) el código de identificación de cada gen incluido y su anotación. En el caso de genes con función desconocida, se los identificó con la palabra “No” en la columna de anotación.	127
Tabla suplementaria 3.1. Sondas utilizadas en los ensayos de EMSA. Se indica nombre, característica, largo y secuencia de cada sonda.....	139
Tabla suplementaria 3.2. Nombre y código de identificación de proteínas GA2ox para 8 especies. Se indica además la base de datos correspondiente.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales componentes de la vía de señalización del ABA. El ABA ingresa a la célula a través de un transportador, y una vez dentro del citoplasma, se une al receptor PYR/PYL. El complejo ABA-receptor inhibe la acción de proteínas PP2C (como ABI1 y ABI2), que estaban bloqueando a las SnRK2 (como PKABA). Las SnRK2 fosforilan y de ese modo activan a factores de transcripción como VP1/ABI3, ABI4 o ABI5, que son los responsables de regular la expresión de genes de respuesta al ABA. 28

Figura 1.2. Índice de germinación para granos enteros (círculos) y embriones aislados (triángulos) de los genotipos IS9530 (símbolos llenos) y RedlandB2 (símbolos vacíos), medidos a 25°C en distintos momentos del desarrollo. MF: Madurez fisiológica; MC: madurez de cosecha. 31

Figura 2.1. Esquema integrado de la metodología empleada para llevar a cabo el análisis de QTL. Se indican las líneas parentales utilizadas para la construcción de la población (IS9530 y RedlandB2), la generación genotipificada y las fenotipificada, los grupos de datos fenotípicos obtenidos, marcadores moleculares utilizados (SSR), metodologías de análisis de QTL empleadas (CIM y MTM), los ambientes y campañas en donde se realizaron los ensayos. El símbolo @ implica autofecundación de las plantas. 46

Figura 2.2. Evolución de la temperatura media diaria (°C; línea negra), radiación solar media diaria incidente (MJ m^{-2} ; línea gris) y precipitaciones diarias (mm; barras) para el ciclo de cultivo de las generaciones F₂ (Castelar, 2008/09) y F₃ (Manfredi, 2009/10). La barra gris representa el período comprendido entre antesis (floración) y los muestreos realizados en cada campaña (34 DPA y 45 DPA en Castelar y 45 DPA en Manfredi), que se indican con una flecha. 48

Figura 2.3. Distribución de frecuencias de Índices de germinación (IG) para distintas generaciones y ambientes. A, IG de individuos F₂, semillas cosechadas 34 días post antesis (DPA) en Castelar (Buenos Aires). B, IG de individuos F₂, semillas cosechadas 45 DPA en Castelar (Buenos Aires). C, IG de familias F₃, semillas cosechadas 45 DPA en Manfredi (Córdoba). En todos los casos las flechas indican los IG para las líneas parentales (IS9530 y RedlandB2) medidos en esos mismos ambientes. 49

Figura 2.4. Mapa de ligamiento para una población F_{2:3} de sorgo granífero derivada del cruzamiento de las líneas IS9530 y RedlandB2, construido a partir del análisis de segregación de 77 microsatélites (SSR). Las distancias entre marcadores (en cM) se indican a la izquierda de cada grupo de ligamiento y los nombres de los marcadores hacia la derecha. 51

Figura 2.5. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG1 (F₂, 34 DPA, Castelar). El valor de LR crítico estimado a partir del test de permutación para

este grupo de datos fue de 39.83, quedando excluido del gráfico debido a su magnitud..... 52

Figura 2.6. A. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG2 (F₂, Castelar). El valor de LR crítico (18.43) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del mapa genético..... 53

Figura 2.7. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG3 (F₃, Manfredi). El valor de LR crítico (17.14) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, valores de aditividad correspondientes a cada posición del mapa genético. 54

Figura 2.8. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo de caracteres múltiples (MTM). En gris claro, resultados para datos fenotípicos IG2 (F₂, Castelar); en gris oscuro resultados para datos IG3 (F₃, Manfredi) y en negro, resultados del análisis conjunto de datos fenotípicos IG2 e IG3 (“joint trait”). Los valores de LR crítico se indican en cada caso con una línea recta del color correspondiente (IG2: 19.1; IG3: 18.7 y “joint-trait”: 25.8). Debajo, valores de aditividad para cada posición del mapa genético. 55

Figura 3.1. Coordinación temporal entre elementos de la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs, en granos de sorgo incubados. A, Nivel de transcriptos de los genes *SbABI4*, *SbABI5* y *SbGA2ox3* en embriones, durante la incubación de granos inmaduros a 20°C de RedlandB2 (símbolos llenos) e IS9530 (símbolos vacíos). Las barras indican el error estándar de la media. Debajo de *SbABI5* se muestra la acumulación de proteína *SbABI5* (detectada por western blot) durante la incubación de los granos, para ambas líneas. B, Evolución del porcentaje de germinación (círculos) y el contenido de GA₄ en embriones (triángulos) durante la incubación de semillas inmaduras a 20°C de RedlandB2 (símbolos llenos) e IS9530 (símbolos vacíos). La franja gris indica la coincidencia temporal para todos los componentes. Resultados tomados de Rodríguez et al. (2012; 2009). 69

Figura 3.2. Secuencia de la región 5´regulatoria putativa para *SbGA2ox3* que comprende 2000 bp río arriba del ATG (+1 Met). La numeración es relativa a la primer base de la metionina de inicio. Los motivos potenciales de regulación transcripcional ABRE, CE, DRE, RY, MYB y E-box/MYC están subrayados y nombrados debajo. El fragmento de 242 pb biotinilado que se utilizó como sonda en los ensayos de retardo en gel (EMSA) está resaltado en gris..... 75

Figura 3.3. Capacidad de unión al ADN de las proteínas recombinantes de *S. bicolor* ABI4 y ABI5 (rABI4 y rABI5). Los experimentos de EMSA fueron realizados con 40 ng de un fragmento de 242 pb (-505 a -263 pb) como sonda biotinilada, correspondiente al promotor de *SbGA2ox3* y concentraciones crecientes de proteínas recombinantes rABI4 y rABI5. Los complejos

detectados, la posición del origen y la sonda libre están indicados. A, Patrón de bandas retardadas para rABI4. La cantidad de proteína en cada reacción fue la siguiente: línea 1, sin proteína; línea 2, 0.045 µg; línea 3, 0.075 µg; línea 4, 0.15 µg; línea 5, 0.225 µg; línea 6, 0.3 µg. B, Patrón de bandas retardadas para rABI5. La cantidad de proteína en cada reacción fue la siguiente: línea 1, sin proteína; línea 2, 0.03 µg; línea 3, 0.06 µg; línea 4, 0.15 µg; línea 5, 0.3 µg; línea 6, 0.375 µg; línea 7, 0.47 µg; línea 8, 0.6 µg. 77

Figura 3.4. Especificidad de los complejos detectados para rABI4 y rABI5. A y B, Ensayos de de competencias para rABI4 y rABI5, realizados con un fragmento de 242 pb de *SbGA2ox3* (-505 a -263 pb) como sonda biotinilada. Para todas las posiciones se usaron 40 ng de sonda biotinilada y 0.225 µg de rABI4 (A) o 0.375 µg de rABI5 (B). Para las competencias específicas, la cantidad de ADN competidor no marcado (fragmento *SbGA2ox3* sin marcar) en cada reacción fue la siguiente: calle 1, sin competidor; calle 2, 200 ng; calle 3, 600 ng. Para las competencias no específicas, la cantidad de de competidor no marcado (fragmento de *SbGAMyb* de 183 pb) fue la siguiente: calle 4, sin competidor; calle 5, 200 ng; calle 6, 600 ng. C y D, EMSAs controles para rABI4 (C) y rABI5 (D) llevados a cabo con concentraciones crecientes de extracto proteico de cultivos de *E. coli* (transformados con vector pET24a vacío) y 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3*. Tanto para C como para D, la cantidad de extracto proteico en cada calle fue la siguiente: calle 2, 10.74 µg; calle 3, 14.32 µg; calle 4, 17.9 µg; calle 5, 21.48 µg; calle 6, 25.06 µg. La calle 1 muestra los controles positivos de incubación con 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3* y 0.225 µg de rABI4 (C) y 0.375 µg de rABI5 (D). 78

Figura 3.5. Capacidad de unión de rABI4 y rABI5 a la sonda biotinilada del promotor de *AtEm6*. A, Secuencia de la sonda biotinilada *AtEm6* (186 pb). Las posiciones están expresadas relativas a la primer base de la metionina inicial (ATG). Se indican los motivos ACGT para ABREs putativos (líneas sólidas) y CE-like (líneas punteadas). B, Patrón de retardos para rABI4. Se incubaron 40 ng de sonda biotinilada *AtEm6* con 0.225 µg de rABI4. C, Patrón de retardos para rABI5. Se incubaron 40 ng de sonda biotinilada *AtEm6* con 0.375 µg de rABI5. En todos los casos, los complejos detectados, el origen de la corrida y la sonda libre están indicados. 79

Figura 3.6. Capacidad de unión de rABI4 y rABI5 a sondas *SbGA2ox3* “wild type” y mutadas. A, Secuencia de las sondas a, b y c indicando los elementos CE y ABRE: sonda a, ABRE y CE sin mutar; sonda b, ABRE mutado y sonda c, CE mutado y sin ABRE incluido. Los asteriscos en las sondas b y c indican las bases y elementos mutados. El largo total de las sondas fue el siguiente: a, 131 pb; b, 131 pb y c, 114 pb. B, Ensayos de retardo en gel (EMSA) llevados a cabo con rABI4 y las sondas *SbGA2ox3* a, b y c. Para todas las calles, se utilizaron 40 ng de sonda biotinilada y la cantidad de proteína rABI4 fue la siguiente: calle 1, 3 y 5, sin proteína; calles 2, 4 y 6, 0.225 µg. C, EMSA realizado con rABI5 y las sondas a, b y c. Para todas las calles, se utilizaron 40 ng de sonda biotinilada y las cantidades de rABI5 fueron las siguientes: calle 1, 3 y 5, sin proteína; calles 2, 4 y 6, 0.375 µg. 80

Figura 3.7. Ensayos de retardo en gel (EMSA) llevados a cabo con co-incubaciones de rABI4 y rABI5 con 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3*. Las

cantidades de proteína en las reacciones fueron las siguientes: calle 1, sin proteína; calle 2, 0.225 µg de rABI4; calle 3, 0.375 µg de rABI5; calle 4, 0.225 µg de rABI4 y 0.375 µg de rABI5. 81

Figura 3.8. Análisis comparativo de los promotores de GA2oxs. A, Relaciones filogenéticas para el grupo I de GA2oxs. Las 28 proteínas GA2oxs fueron agrupadas en 4 subgrupos: D: dicotiledóneas; M1: monocotiledóneas 1; M2: monocotiledóneas 2 y M3: monocotiledóneas 3. At: *Arabidopsis thaliana*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Pt: *Populus trichocarpa*; Sb: *Sorghum bicolor*; Vv: *Vitis vinifera*; Zm: *Zea mayz*. Se muestran los valores de bootstrap y la escala indica el número de cambios por posición por unidad de largo de rama. Los códigos de identificación de las secuencias están listados en la Tabla suplementaria 3.2. B, Plots comparativos multi especie entre el promotor de *SbGA2ox3* y los promotores de las GA2oxs de cada grupo (D, M1, M2 y M3); obtenidos con la herramienta EARS. La línea punteada horizontal indica el p valor de corte (0.0001), sugiriendo que únicamente en el caso de M3 se detectaron 2 picos significativos. 83

Figura 3.9. Alineamiento de las secuencias correspondientes al pico 2 de los miembros M3 (*SbGA2ox3*, *OsGA2ox3*, *OsGA2ox4*, *BdGA2ox5* y *BdGA2ox8*). Las regiones conservadas están resaltadas en gris: ABRE (CACGTC) y CE (CACCG). El software MEME (Bailey and Elkan, 1994) fue utilizado para encontrar los motivos comunes en los promotores de los miembros del subgrupo M3. Debajo de cada región conservada se muestran los logos para los motivos CE y ABRE. 84

Figura 4.1. Modelo donde se muestran los distintos abordajes y los componentes resultantes, que tendrían un rol en la expresión de la dormición en cariopses de sorgo. En los recuadros de doble línea se indican los mecanismos puntuales evaluados en esta tesis. Los recuadros con fondo gris claro contienen los componentes fisiológicos que mejor explican las diferencias en dormición en sorgo (metabolismo de GAs y señalización del ABA) Los óvalos negros representan genes (o proteínas) candidatos evaluados y cuya expresión se correlacionó con el nivel de dormición en ambas líneas de sorgo. Los signos de interrogación señalan vínculos o mecanismos que fueron sugeridos en esta tesis, pero aún resta ponerlos a prueba. Para ver una explicación detallada del modelo, ver la sección 4.7 del presente capítulo. 101

Figura suplementaria 2.1. Alineamiento de las primeras 360 pb del gen *ABI5*, para los genotipos IS9530 y RedlandB2. En la posición +40 (a partir del ATG) se observa un InDel de 6 pb. 115

Figura suplementaria 2.2. Posición física de los “primers” utilizados para amplificar cada uno de los SSR incluidos en el mapa genético. Para cada marcador se muestra la posición física a lo largo del genoma de sorgo de los primer “forward” y “reverse” utilizados para amplificar cada marcador. Los casos en que se informa la ubicación de un único “primer” se deben a falta de información en la secuencia de referencia del genoma de sorgo (*i.e.* posiciones con algunas bases desconocidas). Se indican los cromosomas en forma consecutiva y dentro de cada uno de ellos los marcadores en su correspondiente orden físico y genético. 115

Figura suplementaria 2.3. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 5, para el análisis CIM, con los datos fenotípicos IG2. El valor de LR crítico (18.4) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma. 124

Figura suplementaria 2.4. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 9, para el análisis CIM, con los datos fenotípicos IG3. El valor de LR crítico (18.4) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma. 125

Figura suplementaria 2.5. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 9, para el análisis MTM, con los datos IG2 (gris claro) e IG3 (gris oscuro) y “joint trait” (negro). El valor de LR crítico se indica para cada caso con una línea horizontal del color correspondiente. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma..... 125

Figura suplementaria 2.6. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 10, para el análisis MTM, con los datos IG2 (gris claro) e IG3 (gris oscuro) y “joint trait” (negro). El valor de LR crítico se indica para cada caso con una línea horizontal del color correspondiente. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma..... 126

Figura suplementaria 2.7. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 4, para el análisis MTM, con los datos IG2 e IG3 (“joint trait”). El valor de LR crítico en este caso fue de 25.8. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma..... 126

Figura suplementaria 3.1. Contexto genómico para el gen *SbGA2ox3*. Se muestra la ubicación, polaridad y distancia (en pb) de los genes próximos a *SbGA2ox3* (Sobic.003G300800). 141

Figura suplementaria 3.2. Relaciones filogenéticas para proteínas GA2oxs. Las GA3oxs y GA20oxs de *Arabidopsis thaliana* fueron incluidas para poder comparar con un grupo externo. Las secuencias completas de las proteínas fueron alineadas usando Clustal WC (Thompson et al. 1997). Se utilizó MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) para construir un árbol filogenético por inferencia bayesiana, con 1.500.000 generaciones. Se indican los valores de brostrap. Las GA2oxs se dividieron en tres grupos diferentes: I, II y III. Los miembros de los grupos I y II catabolizan C19-GAs, mientras que los del grupo III catabolizan C20-GAs. At: *Arabidopsis thaliana*; Bd: *Brachypodium*

distachyon; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Pt: *Populus trichocarpa*; Sb: *Sorghum bicolor*; Vv: *Vitis vinifera*; Zm: *Zea mayz*. 142

Figura suplementaria 3.3. Alineamiento de la secuencia de la sonda *SbGA2ox3* para los genotipos de *Sorghum bicolor* IS9530 y RedlandB2. Las secuencias se alinearon completamente con el software Clustal W (Thompson et al., 1997). 143

Figura suplementaria 3.4. Arquitectura de dominios de las proteínas GA2oxs de monocotiledóneas del grupo I. Se muestra la similitud en composición y ubicación de los dominios. La *SbGa2ox4* aparece como una versión truncada de la *SbGA2ox3*..... 143

Figura suplementaria 3.5. Comparaciones entre los promotores de cada uno de los miembros del grupo M3 (*BdGA2ox5*, *BdGA2ox8*, *OsGA2ox3* y *OsGA2ox4*) y el promotor de *SbGA2ox3*, realizadas con la herramienta EARS. La línea punteada indica el p valor de corte (0.0001), sugiriendo la existencia de los picos significativos 1 y 2 en todos los casos. 144

ABREVIATURAS

Sigla/Abreviatura	Significado
ABA	Ácido abscísico
ABI1	ABA-INSENSITIVE 1
ABI2	ABA-INSENSITIVE 2
ABI3	ABA-INSENSITIVE 3
ABI4	ABA-INSENSITIVE 4
ABI5	ABA-INSENSITIVE 5
ABRC	Complejo de respuesta al ABA
ABRE	Elemento de respuesta al ABA
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
BPC	Brotado pre-cosecha
CE	Elemento de acople
CIM	Mapeo por intervalos compuesto
DArTs	Diversity array technology
DPA	Días post antesis
EKAH	Ent-kaurenoico hidroxilasa
EKO	Ent-kaureno oxidasa
EMSA	Ensayos de retardo en gel
GA20ox	GA 20-OXIDASA
GA2ox	GA 2-OXIDASA
GA3ox	GA 3-OXIDASA
GAs	Giberelinas
GxE	Interacción genotipo por ambiente
IG	Índice germinación
LR	Likelihood ratio
LOD	Logarithm of odds
MARS	Selección asistida por marcadores recurrente
MAS	Selección asistida por marcadores
MF	Madurez fisiológica
MTM	Mapeo de caracteres múltiples
NIL	Líneas casi isogénicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
phyB	Fitocromo B
PKABA	ABA-RESPONSIVE PROTEIN KINASE
QTL	Loci de caracteres cuantitativos
RAPD	Polimorfismo de amplificación aleatoria de ADN
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RIL	Líneas endocriadas recombinantes
SNP	Polimorfismo de único nucleótido

SSR

Simple sequence repeat

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE QTL PARA DORMICIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ABA-GAs EN CARIOPSES DE SORGO GRANÍFERO

El objetivo de esta tesis fue contribuir a la dilucidación de los mecanismos moleculares y genéticos que participan en la expresión de la dormición de semillas de cereales, utilizando *Sorghum bicolor* (L.) Moench como sistema modelo. Para ello se utilizaron dos aproximaciones complementarias: la identificación de QTL para el carácter dormición y la evaluación de la ocurrencia de interacciones *in vitro* entre componentes de la señalización del ácido abscísico (ABA) y el catabolismo de las giberelinas (GAs), candidatos a tener un rol importante durante la expresión de la dormición en granos de sorgo inmaduros (i.e. antes de madurez fisiológica). Los resultados obtenidos permitieron identificar tres QTL (*qDOR-5*; *qDOR-9* y *qDOR-10*) que explican una proporción de la variabilidad que se observa en el patrón de expresión de dormición de granos de sorgo maduros (i.e. después de madurez fisiológica). Un análisis *in silico* de las secuencias abarcadas por estos QTL mostró que ninguno ellos incluye genes considerados como candidatos para dormición de sorgo. En ese sentido, esta tesis aportó nuevas regiones genómicas que contienen genes hasta ahora desconocidos, que serían importantes en la expresión del carácter dormición en granos maduros. Por otra parte, los análisis de unión *in vitro* realizados mostraron que las proteínas SbABI4 y SbABI5 (componentes de la señalización del ABA) pueden interactuar de manera específica con el ABRC (complejo de respuesta al ABA) del promotor del gen *SbGA2ox3*, responsable de la degradación de giberelinas activas. Este mecanismo de *cross-talk* ABA-GAs podría ser uno de los responsables del mantenimiento de la dormición en cariopses inmaduros resistentes al brotado pre-cosecha. Más aún, el ABRC del promotor de *SbGA2ox3*, involucrado en las interacciones, se encontró además en los promotores de genes *GA2ox* de otras especies monocotiledóneas como *Brachypodium* y arroz (*Oryza sativa*), pero no así en las dicotiledóneas analizadas, sugiriendo que el *cross-talk* ABA-GAs podría tener lugar en otras especies además de sorgo. Los resultados de esta tesis en forma conjunta aportaron nuevas evidencias acerca del rol preponderante que tienen ciertas regiones del genoma o genes puntuales en la expresión de la dormición tanto en granos maduros como inmaduros de sorgo granífero.

Palabras clave: sorgo granífero; *Sorghum bicolor*; dormición; QTL; ácido abscísico; giberelinas; SbABI4; SbABI5; *SbGA2ox3*.

ABSTRACT**DORMANCY QTL IDENTIFICATION AND MOLECULAR ANALYSIS OF ABA-GAs INTERACTION IN GRAIN SORGHUM CARYOPSES**

The aim of this thesis was to contribute to the current knowledge on the molecular and genetic mechanisms underlying seed dormancy expression in cereals, using *Sorghum bicolor* (L.) Moench as a model system. Two complement approaches were used: QTL identification for seed dormancy and the evaluation of *in vitro* interactions between abscisic acid (ABA) signaling components and gibberellins (GAs) catabolism, candidates to have a role during immature (i.e. before physiological maturity) sorghum seed dormancy expression. The obtained results allowed the identification of three QTL (*qDOR-5*; *qDOR-9* y *qDOR-10*) that explain part of the variability observed in the expression of sorghum dormancy in mature caryopses (i.e. after physiological maturity). *In silico* analysis of the sequences covered by these QTL, showed that they do not include any of the genes considered as candidates for sorghum seed dormancy. In this sense, this thesis provided new genomic regions that contain unknown genes that would be important for dormancy expression. On the other hand, *in vitro* binding analysis showed that SbABI4 and SbABI5 proteins (ABA signaling components) are capable of interacting in a specific manner with the ABA response complex (ABRC) located in the promoter of *SbGA2ox3*, which is responsible for gibberellins inactivation. This ABA-GAs *cross-talk* could be responsible for dormancy maintenance in immature sorghum caryopses resistant to pre-harvest sprouting. Moreover, ABRC identified in the *SbGA2ox3* promoter involved in the bindings, was also found in other monocot species *GA2ox* promoters, such as Brachypodium and rice, but was not identified in the analyzed dicots, suggesting that the proposed ABA-GAs *cross-talk* could take place in other species apart from sorghum. Taken together, the results of this thesis provided new evidences about the predominant role that certain genomic regions or particular genes have in seed dormancy expression in both mature and immature grain sorghum caryopses.

Key words: grain sorghum, *Sorghum bicolor*, seed dormancy, QTL, abscisic acid, gibberellins, SbABI4, SbABI5, *SbGA2ox3*.

CAPITULO 1

Introducción general: revisión de antecedentes y presentación del problema

CAPITULO 1

Introducción general: revisión de antecedentes y presentación del problema

Resumen

En este capítulo se ofrece una revisión de los antecedentes que conducen a la presentación de la problemática que se aborda en esta tesis. En primer lugar se exponen conceptos generales vinculados a la dormición y germinación de semillas, para luego hacer hincapié en las características que adquiere la dormición y el brotado pre-cosecha en los cereales. A continuación se avanza en la regulación hormonal del carácter, con particular énfasis en el rol que tienen la señalización del ABA, el metabolismo de las GAs y la relación ABA/GAs en la expresión de la dormición. Seguidamente se ofrecen conceptos y antecedentes relacionados a la naturaleza cuantitativa del carácter dormición y las herramientas disponibles para caracterizar la estructura genética subyacente. El tramo final de este capítulo está dedicado a la presentación del sorgo granífero como especie modelo para el estudio de la dormición en los cereales. En ese contexto, se repasan los antecedentes disponibles relacionados a las bases fisiológicas, moleculares y genéticas de la dormición en granos de sorgo granífero. Finalmente se plantean los objetivos e hipótesis de esta tesis.

1.1. Introducción

1.1.1. Dormición y germinación

Una semilla dormida es aquella que no tiene la capacidad de germinar cuando es incubada en condiciones ambientales que de otro modo (en ausencia de dormición) serían favorables para su germinación (Baskin y Baskin, 2004). Al igual que en las yemas vegetativas con dormición, la dormición de semillas se caracteriza por un arresto temporario del crecimiento y el desarrollo, y es un carácter que se ha adquirido a través de la evolución por la habilidad que otorga a las plantas de sobrevivir en ambientes adversos. Teniendo en cuenta que la germinación es un proceso crítico e irreversible en la vida de una planta, la dormición restringe la ocurrencia de la germinación a ambientes que serán más favorables para el desarrollo de la plántula (Hilhorst, 1997). En plantas silvestres de ambientes templados, la dormición de semillas es un hecho frecuente, ya que impide la germinación en una estación inadecuada, reduce la competencia intraespecífica y le otorga a las especies la oportunidad de sobrevivir catástrofes naturales y reducir el riesgo de una muerte prematura, considerándose por ello un carácter adaptativo que se ha seleccionado naturalmente a través del tiempo (Finkelstein et al., 2008). Se han propuesto diversas clasificaciones para describir la dormición de semillas. Según el momento en que se impone o adquiere la dormición, se puede distinguir a la *dormición primaria* (i.e. la que se desarrolla durante la maduración de la semilla en la planta madre) de la *dormición secundaria* (i.e. la que adquiere una semilla madura después de haber percibido condiciones ambientales que inducen la entrada en dormición). A su vez, Baskin y Baskin (2004) propusieron diferentes tipos de dormición de acuerdo a su origen: morfológica (inmadurez del embrión), física (impermeabilidad de las cubiertas) o fisiológica, pudiendo también encontrarse combinaciones de estas clases.

Dentro de las plantas vasculares, la dormición de tipo fisiológica es la más abundante, encontrándose tanto en gimnospermas como en angiospermas. La mayoría de las especies modelo que se utilizan para realizar estudios de dormición (*Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Nicotiana* spp, *Lycopersicon esculentum* y muchos cereales) presentan dormición fisiológica (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Este tipo de dormición se caracteriza por la participación de reguladores del crecimiento (hormonas) sobre el potencial de crecimiento del embrión y/o sobre la resistencia de los tejidos que se oponen a este crecimiento. En aquellas semillas que presentan dormición, este bloqueo a la germinación se establece durante el desarrollo de las mismas, mientras se encuentran unidas a la planta madre (dormición primaria). La dormición fisiológica puede ser de dos tipos: impuesta al embrión (el embrión no es capaz de germinar aún siendo aislado del resto de la semilla) o impuesta por las cubiertas (la semilla entera no germina, pero el embrión aislado del resto de la semilla sí lo hace) y algunas especies incluso puede poseer una combinación de estos dos tipos de dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Ambos tipos de dormición fisiológica son igualmente comunes y no parece haber una preferencia por un tipo específico dentro de familias o géneros (Baskin y Baskin, 1998). Independientemente del tipo de dormición de la que se trate, luego de alcanzar la madurez fisiológica (momento en el que se corta la conexión vascular con la planta madre), las semillas comienzan a perder la dormición con distinta velocidad, dependiendo principalmente del genotipo y

en menor medida de factores ambientales (Benech Arnold et al., 1991; Rodríguez et al., 2001). La dormición se mide de manera indirecta a través de la ausencia de germinación en semillas viables, cuando se les brindan condiciones apropiadas de temperatura y humedad para la germinación de esa especie. La dormición puede afectar tanto la tasa de germinación como el porcentaje final de semillas germinadas, por lo que es conveniente utilizar medidas como el índice de germinación (IG) que tiene en cuenta el número de semillas germinadas por día en relación al total de semillas, pero que a la vez pondera con valores crecientes a aquellas que germinan más temprano (Walker-Simmons, 1987). A excepción de algunas semillas que presentan dormición absoluta y que no germinan a ninguna temperatura, lo más común es que la dormición se exprese a determinadas temperaturas. En ese contexto, la dormición es una condición relativa más que absoluta: a medida que la dormición disminuye, el rango de temperaturas permisivas para la germinación se amplía hasta un máximo y de manera contraria, cuando se induce la dormición, el rango de temperaturas en el cual la germinación puede ocurrir se estrecha. De ese modo, en especies anuales de verano, como algunos cereales (por ejemplo sorgo granífero), la dormición no se expresa a temperaturas elevadas de incubación (30°C) y sí se expresa a temperaturas menores a 10°C; por el contrario, en especies anuales invernales (como algunos cereales de invierno: trigo, cebada) la dormición no se expresa a temperaturas bajas de incubación (10°C) y sí se expresa a temperaturas más altas.

El peso fresco de una semilla aumenta a partir del ingreso de agua, y lo hace siguiendo un patrón trifásico. En una primer etapa (fase I), cuando la semilla entra en contacto con el agua del suelo, ocurre un ingreso de agua más o menos rápido a la semilla, producto de la gran diferencia entre el potencial agua del medio exterior y el de la semilla (cuyo principal componente es el potencial mátrico), y este flujo es modulado por la resistencia de los tejidos. La fase II de imbibición o fase *lag*, se caracteriza por la ausencia de ingreso de agua, debido al equilibrio alcanzado entre los potenciales agua del medio y la semilla. Durante esta fase ocurren los eventos que prepararán a la semilla para la emergencia de la radícula en caso de semillas no dormidas: se reactiva el metabolismo energético, se ponen en funcionamiento mecanismos de reparación de mitocondrias y ADN, se sintetizan nuevas proteínas, se pone en marcha la relajación de las paredes celulares, el ablandamiento localizado del endosperma (en el caso de algunas semillas) y comienza la hidrólisis de reservas. Durante la fase III se observa un nuevo incremento en el ingreso de agua a la semilla que coincide con la elongación de la radícula. Esta nueva entrada de agua a la semilla está relacionada a una caída en el potencial agua de las células del eje embrionario, provocada por la relajación de sus paredes celulares. La extrusión de la radícula por fuera de las cubiertas seminales es el indicador de que la germinación se ha completado y todo lo que ocurra después de este momento se considera un evento "post-germinativo". La duración de cada una de las fases de imbibición dependerá de características inherentes a la semilla y de las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo la hidratación.

Las semillas que presentan dormición alcanzan la fase II de imbibición, pero a diferencia de las semillas sin dormición, no ingresan a la fase III, permaneciendo en fase II por tiempo indefinido. Por lo tanto, en semillas dormidas se previene la emergencia de la radícula en una estructura que está hidratada y con metabolismo activo, incluyendo una actividad transcripcional importante. Estudios comparativos de semillas dormidas y no dormidas de *Arabidopsis* muestran que hay un gran número de genes cuya transcripción está asociada al estado de dormición, principalmente genes vinculados a respuestas a estrés. Por el contrario, genes involucrados en modificaciones de la pared celular y en la removilización de reservas se expresan principalmente en semillas sin dormición (Cadman et al., 2006).

1.1.2. Dormición y brotado pre-cosecha en cultivos de cereales

Los embriones de semillas de cereales tienen la capacidad de germinar desde muy temprano en el desarrollo (15 a 20 días después de la polinización) si son aislados de las cubiertas y se incuban en agua (Walker-Simmons, 1987). Sin embargo, el grano entero alcanza su completa capacidad para germinar mucho más tarde que el embrión. Esta dormición impuesta por las cubiertas (endosperma y pericarpo) es la barrera que previene la germinación en los cereales y su duración dependerá del genotipo y de las condiciones ambientales reinantes durante la maduración del grano y en etapas posteriores. La duración de esta dormición impuesta por las cubiertas determinará el momento en que el grano adquiere capacidad para germinar. En este contexto, en los cereales la dormición puede significar un problema: si es persistente puede hacer fracasar la siembra o la utilización industrial de la semilla en caso de que la misma requiera de su germinación (i.e. maltería); si la salida de la dormición es demasiado anticipada, expondría al grano a sufrir brotado pre-cosecha (BPC). En ese sentido, muchas especies domesticadas han sido seleccionadas para una germinación rápida y uniforme, seguida de un rápido establecimiento de las plántulas y elevados rindes. En muchos genotipos eso se ha logrado a través de una salida anticipada de la dormición, generando precisamente que ocurra BPC, considerado como la germinación anticipada de las semillas cuando todavía se encuentran en la planta madre.

El fenómeno de BPC se ha evidenciado en varios cereales como trigo, sorgo, cebada, avena y centeno, en años en los que en la última etapa de maduración de los granos a campo prevalecen condiciones adecuadas de temperatura y elevada humedad. El BPC tiene consecuencias económicas importantes: i) reducción o pérdida de la viabilidad de la semilla cuando se pierde la resistencia a la desecación (el crecimiento del embrión ha ido más allá del “punto de no retorno”); ii) disminución de la calidad del grano debido a la hidrólisis de hidratos de carbono que puede crear un ambiente propicio al ataque por hongos (Castor y Frederiksen, 1977); iii) reducciones en el rendimiento, debido a una disminución del peso de grano y iv) una reducción en la longevidad de las semillas cuando la germinación no ha alcanzado el “punto de no retorno”, lo que determina un menor tiempo durante el cual esas semillas puedan ser almacenadas sin que el lote sufra una reducción significativa de su viabilidad (Hofmann y Steiner, 1994). En algunos cereales como trigo, se ha puesto mucho esfuerzo a nivel mundial en las últimas décadas en reducir el BPC a través de programas de mejoramiento. Sin embargo, el problema del BPC en muchas especies cultivadas sigue sin resolverse, debido principalmente a la complejidad biológica que conlleva el carácter, al importante impacto que tiene el ambiente sobre su expresión y a la ausencia de un marcador morfológico simple que esté asociado al nivel de dormición de las semillas.

1.1.3. Regulación hormonal de la dormición: Ácido abscísico

Se encuentra ampliamente documentado que el ácido abscísico (ABA) cumple un rol fundamental en la imposición y el mantenimiento de la dormición en especies que poseen dormición de tipo fisiológica (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008; Nambara et al., 2010). En la mayoría de las semillas estudiadas, los niveles de ABA se incrementan durante la primer mitad del desarrollo de la semilla y descienden durante la maduración tardía, acompañando el descenso del contenido hídrico de la semilla. Estudios realizados con mutantes deficientes en ABA de *Arabidopsis* (Karssen et al., 1983) y tomate (Groot y Karssen, 1992), han demostrado que defectos en

la síntesis de este regulador del crecimiento durante el desarrollo de las semillas resultan en la formación de semillas carentes de dormición. Estos resultados sugieren que la imposición de la dormición requiere de adecuados niveles endógenos de ABA durante el desarrollo de las semillas y la deficiencia de ABA durante esta etapa está asociada con la ausencia de dormición primaria en la semilla madura (Nambara y Marion-Poll, 2003).

Por otra parte, es conocido que los distintos patrones de salida de la dormición en varias especies de cereales están asociados, en buena medida, con la sensibilidad que presentan los embriones al efecto inhibitorio del ABA (Walker-Simmons, 1987; Benech-Arnold et al., 1999). A pesar de que no se tiene un panorama completo de la señalización del ABA en semillas, estudios genéticos y moleculares han permitido identificar numerosos genes involucrados en respuestas al ABA. Recientemente se identificó una familia de genes (PYR/PYL/RCAR) cuyas proteínas actúan como receptores del ABA (Park et al., 2009), y se han mostrado numerosas evidencias genéticas que respaldan estos resultados. Por otra parte, el estudio de mutantes con defectos en la dormición y la germinación permitió identificar varios genes involucrados en la señalización del ABA. Entre ellos, varios mutantes ABA-insensibles (*abi*) fueron seleccionados por su reducida dormición o su germinación acelerada en presencia de ABA (Koornneef et al., 1984; Finkelstein, 1994). Estudios realizados con mutantes *aba-insensitive abi3*, *abi4* y *abi5* mostraron defectos en varios aspectos de la maduración de sus semillas pero no parecen tener alteradas las respuestas vegetativas al ABA (Koornneef et al., 1984; Finkelstein y Somerville, 1990; Ooms et al., 1993; Finkelstein, 1994; Parcy et al., 1994). Ello indica que los productos de estos genes tendrían funciones específicas en semillas. En ese sentido, las semillas de los mutantes *abi3*, *abi4* y *abi5* son defectuosas en la acumulación de reservas y se caracterizan además por tener germinación resistente al ABA. El análisis de estos mutantes reveló que únicamente las semillas de mutantes *abi3* poseen dormición reducida, mientras que las de los mutantes *abi4* y *abi5* no tienen la dormición afectada (Finkelstein, 1994). Sin embargo, las proteínas ABI4 y ABI5 tienen un rol fundamental en la maduración de la semilla y en la inhibición de la germinación por parte del ABA (Penfield et al., 2006). Los genes ABI3, ABI4 y ABI5 codifican para factores de transcripción de tipo B2/B3, AP2 y bZIP respectivamente. Se ha informado que estos 3 elementos podrían actuar de manera conjunta y sinérgica en la activación de promotores de genes de respuesta al ABA (Himmelbach et al., 2003). Por otra parte, los mutantes *abi1* y *abi2* identificados por Koornneef et al. (1984) muestran efectos pleiotrópicos que afectan la sensibilidad al ABA tanto en semillas como en tejidos vegetativos. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas fosfatasa del tipo 2C (PP2C) y una pérdida de la función *ABI1* o *ABI2* genera una respuesta aumentada al ABA, indicando que estas dos proteínas actúan como reguladores negativos de la señalización del ABA (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Johnson et al. (2002) identificaron al gen *PKABA* como otro componente de la señalización del ABA. *PKABA* es una serin/treonin kinasa identificada por primera vez en trigo y la transcripción de su gen es regulada positivamente por el ABA. *PKABA* fosforila elementos de respuesta al ABA (ABF) que a su vez activarán genes de respuesta al ABA. En la figura 1 se muestra un esquema de la vía de señalización del ABA tal como se la entiende en la actualidad.

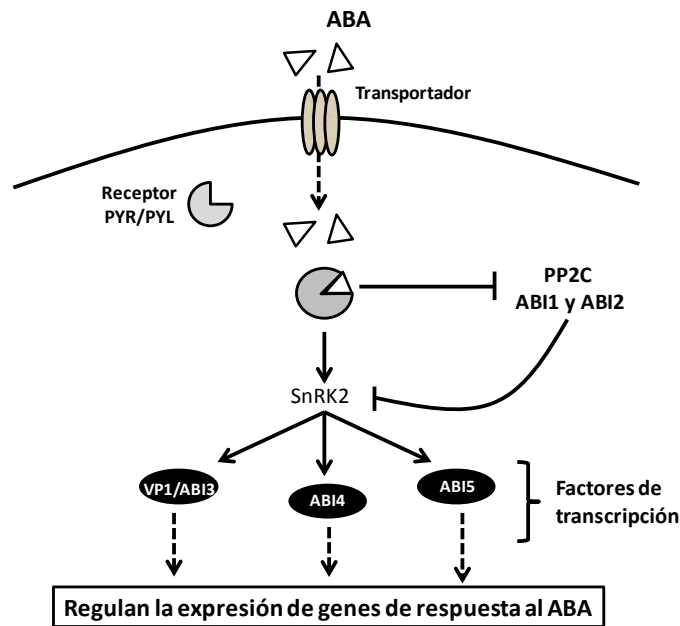


Figura 1.1. Principales componentes de la vía de señalización del ABA. El ABA ingresa a la célula a través de un transportador, y una vez dentro del citoplasma, se une al receptor PYR/PYL. El complejo ABA-receptor inhibe la acción de proteínas PP2C (como ABI1 y ABI2), que estaban bloqueando a las SnRK2 (como PKABA). Las SnRK2 fosforilan y de ese modo activan a factores de transcripción como VP1/ABI3, ABI4 o ABI5, que son los responsables de regular la expresión de genes de respuesta al ABA.

1.1.4. Regulación hormonal de la dormición: Giberelinas y la relación ABA/GAs

Fuertes evidencias sugieren que las giberelinas (GAs) son un requerimiento obligado para la germinación: mutantes de tomate (*gib1*) y *Arabidopsis* (*gal*) deficientes en giberelinas requieren GAs exógenas para completar la germinación (Koornneef y Van der Veen, 1980; Groot y Karssen, 1987). Las GAs actúan específicamente promoviendo el potencial de crecimiento del embrión y mediando el ablandamiento de los tejidos que lo rodean (Bewley, 1997). En consistencia con esta idea, el mayor incremento de GAs durante la germinación se evidencia justo antes de la protrusión de la radícula. En ese sentido, hasta hace algunas décadas se pensaba que la acción del ABA y las GAs era temporalmente distinta, mientras que el ABA inducía la dormición durante la maduración de la semilla, las GAs promovían la germinación. Sin embargo, hoy en día se sabe que el ABA está involucrado además en el mantenimiento de la dormición durante la imbibición de las semillas y que las GAs actúan de manera antagónica al ABA durante el desarrollo de los granos, especialmente en la inducción de la dormición (Steinbach et al., 1997; White et al., 2000). Estudios realizados con mutantes de maíz deficientes e insensibles al ABA y también con inhibidores de la síntesis de ABA o GAs en sorgo muestran que es precisamente el balance hormonal ABA/GAs (y no la acción de cada hormona por separado) lo que determina la imposición y el mantenimiento de la dormición (Steinbach et al., 1995; White et al., 2000). Además, la transición de semillas dormidas a no dormidas se caracteriza por una disminución en la sensibilidad al ABA y un incremento en la sensibilidad a las GAs (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La interacción entre el ABA y las GAs se podría dar en distintos niveles. Por ejemplo en el mutante de *Arabidopsis gal* el ABA es sintetizado en mayor cantidad y es menos degradado, comparado con el genotipo salvaje y cuando se le agregan GAs, se

observa lo contrario (Oh et al., 2007). Por otro lado, Seo et al. (2006) mostraron que en el mutante de *Arabidopsis aba2-2* la síntesis de GAs se veía incrementada. Resultados como estos sugieren que el ABA y las GAs se regulan de manera antagónica a través del control de la transcripción de sus genes de metabolismo. En ese sentido, Cadman et al. (2006) informaron que las semillas de *Arabidopsis* (Cvi) dormidas se caracterizan por la transcripción de genes que poseen en sus regiones promotoras elementos ABRE (*ABA responsive element*) y genes que codifican para factores de transcripción que unen a estos elementos ABRE. Asimismo, se ha informado que las GAs regulan negativamente genes que contienen secuencias ABRE en sus promotores, durante la imbibición de semillas de *Arabidopsis* no dormidas (Ogawa et al., 2003). Sin embargo, a pesar de que se han sugerido interacciones entre el ABA y las GAs, la primer y única evidencia de un contacto directo entre un factor de transcripción de la vía de señalización del ABA (*AtABI5*) y la región promotora de dos genes de metabolismo de GAs (*AtGA3ox1* y *AtGA3ox2*) ha sido sugerida recientemente por Lee et al., (2012). Hasta el momento, no se han informado otras interacciones de este tipo, que aporten evidencias de los mecanismos que operan en la relación antagónica ABA-GAs durante la expresión de la dormición.

1.1.5. Naturaleza cuantitativa del carácter dormición

La dormición de semillas es un carácter muy complejo, debido en primer lugar a su complicada composición genética. Las semillas están constituidas por tres estructuras con orígenes diferentes, el embrión y el endosperma de origen cigótico, y las cubiertas que provienen de tejidos maternos. Es precisamente la acción conjunta de estas tres estructuras y la expresión de sus genes, lo que determina el patrón de dormición y germinación que tendrán esas semillas. En segundo lugar, factores ambientales como la temperatura tienen un importante efecto sobre la dormición, pudiendo operar durante el desarrollo de las semillas en la planta madre, durante el almacenamiento o durante la imbibición de las mismas. En ese contexto, el gran número de genes involucrados en la expresión de la dormición y el importante efecto que tiene el ambiente sobre este carácter hacen de la dormición un rasgo típicamente cuantitativo en numerosas especies. El término cuantitativo hace referencia a un fenotipo que no exhibe la herencia mendeliana clásica recesiva o dominante atribuible a un único locus, sino que su expresión depende de la acción combinada de muchos genes al mismo tiempo (Lander y Schork, 1994). Las regiones dentro de los genomas que contienen genes asociados a un carácter cuantitativo particular se conocen como “loci de caracteres cuantitativos” o QTL.

1.1.6. Marcadores moleculares y poblaciones de mapeo

Debido a que los efectos de los QTL individuales son muy pequeños para ser identificados por su segregación, su identificación se puede realizar con la ayuda de marcadores moleculares que sí exhiben segregación mendeliana clásica. Los marcadores moleculares son secuencias de ADN variables que se originan a partir de diferentes clases de mutaciones en el ADN (sustituciones, inserciones o deleciones), errores en la replicación o repeticiones en tandem. Estos marcadores son neutros desde el punto de vista de la selección porque no se ven afectados por factores ambientales ni por el estadio de desarrollo de la planta. Mediante el uso de marcadores moleculares es posible construir un mapa de ligamiento o mapa genético para una población de mapeo, que provenga de reproducción sexual. El mapa de ligamiento indica la posición relativa de

los marcadores a lo largo de los cromosomas y para su construcción se debe diseñar una población de mapeo, cuyas líneas parentales difieran en el carácter de interés, pudiendo ser líneas puras o no, dependiendo de las posibilidades que brinde la especie. Dentro de la variedad de poblaciones de mapeo, las generaciones $F_{2:3}$ logran un elevado grado de diversidad, proveniente de los eventos de recombinación que ocurren en el ADN de los pares de cromosomas durante la formación de gametas (meiosis) y por ello pueden ser utilizadas como poblaciones de mapeo.

1.1.7. Análisis de QTL

El análisis de QTL se basa en detectar una asociación entre el fenotipo de los individuos de una población de mapeo y su genotipo (marcadores). La existencia de diferencia significativa en los valores promedios del carácter cuantitativo en cuestión entre los individuos con distintos genotipos para el locus del marcador analizado, indica que el marcador está ligado a un QTL que controla el carácter. Cuanto más próximo esté un marcador de un QTL, menor será la chance de que ocurra recombinación entre ellos y por lo tanto el QTL y el marcador serán heredados juntos en la progenie. Los análisis de QTL permiten generar información genética complementaria a otros tipos de enfoques, como el análisis de mutantes o la aproximación de genes candidatos. En ese sentido, de manera paralela a la caracterización fisiológica y molecular de la dormición en muchas especies, en los últimos años se han identificado además QTL vinculados a dormición en numerosas poblaciones de mapeo generadas en distintas especies (Lin et al., 1998; Alonso-Blanco et al., 2003; Bentsink et al., 2006; Hori et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Sugimoto et al., 2010). En algunos de estos casos, se ha logrado identificar los genes responsables de esos QTL a través de mapeos de alta resolución, seguidos de una caracterización funcional de las proteínas sintetizadas a partir de esos genes.

1.1.8. Caracterización de la dormición de granos de sorgo granífero

El sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], es un cereal de verano y pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas, subfamilia panicoideas, tribu andropogóneas. Desarrolla una inflorescencia terminal en forma de panoja, constituida por espiguillas dispuestas de a pares: una fértil (sésil) y una estéril (pedicelada). Las flores son perfectas o diclinas y cuando son fecundadas originan durante su período de llenado, granos de tipo cariópse con un elevado porcentaje de endosperma (aproximadamente 85%). A pesar de su origen tropical, el sorgo granífero se cultiva ampliamente en zonas de climas templados y se adapta a condiciones a un mínimo de 250 mm de lluvia durante su ciclo, siendo el óptimo entre 400 y 550 mm. Debido a las características de su sistema radicular (fibroso, alcanza profundidades de hasta 1,2 mts., con elevado número de raíces nodales y una absorción muy eficiente) aporta una generosa cantidad de materia orgánica al suelo y ayuda a recuperar su estructura. Durante la última década, el sorgo granífero ha cobrado gran importancia económica para el sistema agrícola argentino, sobre todo en zonas marginales en donde cereales como el maíz no pueden ser cultivados debido a su gran demanda hídrica. Durante la campaña 2012/2013 se sembraron en Argentina 1,1 millones de hectáreas de sorgo granífero y en los últimos años la producción se ha estabilizado en niveles superiores a los 3 millones de toneladas. Si bien Argentina no tiene una participación significativa en el total del mercado mundial de sorgo porque la mayor parte de la producción se utiliza para consumo interno en alimentación animal, es el segundo exportador después de Estados Unidos. Este cereal posee diversos usos entre los que se encuentran el uso

industrial (harinas y bebidas), en la alimentación animal (para producción de carne y leche), en la producción de combustibles (bioetanol) y en la fabricación de adhesivos, papeles y cosméticos, entre otros.

El sorgo granífero, como muchos otros cereales, muestra gran variabilidad intraespecífica en el patrón de salida de la dormición y la respuesta de brotado pre-cosecha, existiendo genotipos susceptibles y resistentes al BPC. En Argentina, una de las principales limitantes para la producción de sorgo es el BPC, ya que la maduración del grano transcurre durante fines del verano o inicios del otoño cuando prevalecen condiciones lluviosas. Debido a la creciente relevancia de este cultivo no solo en el sistema productivo argentino sino a nivel mundial y a la limitante que impone el BPC para su producción, surge la necesidad de poder ajustar la dinámica de la salida de la dormición de los granos de sorgo a un preciso lapso de tiempo después de la cosecha del cereal. Ello requiere de un conocimiento detallado de los mecanismos fisiológicos, moleculares y genéticos responsables de la imposición y la expresión de la dormición en estas semillas. En la actualidad el genoma del sorgo granífero se encuentra completamente secuenciado, y ello sumado a su relativamente simple constitución genética (es una especie diploide) convierten a este cereal en una especie modelo para el estudio del BPC.

Las bases fisiológicas y moleculares de la dormición en semillas de sorgo granífero vienen siendo estudiadas desde hace aproximadamente 20 años por algunos grupos de investigación. Uno de los sistemas modelo utilizados está conformado por dos líneas endocriadas de sorgo con respuesta contrastante al BPC: IS9530, resistente al BPC, con semillas que presentan elevada dormición más allá de madurez fisiológica y RedlandB2, susceptible al BPC, con granos que pierden la dormición incluso antes de alcanzar la madurez fisiológica (Figura 1.2). Como en caso de otros cereales, los cariopses de sorgo poseen dormición fisiológica impuesta por las cubiertas, i.e. la remoción del pericarpo y del endosperma conduce a una rápida germinación de los embriones (Steinbach et al., 1995).

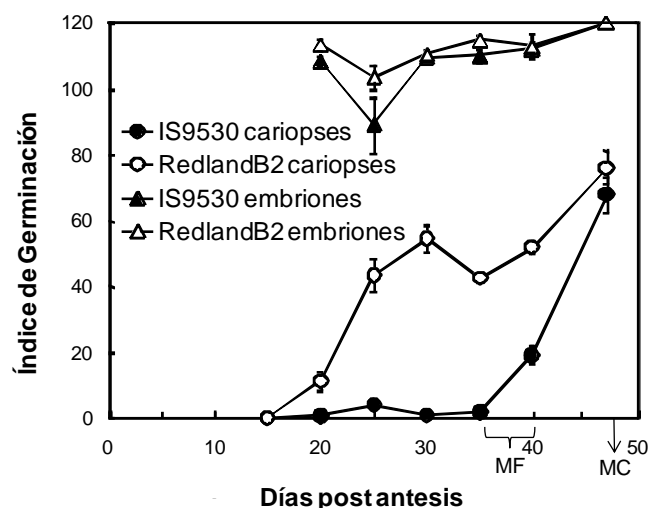


Figura 1.2. Índice de germinación para granos enteros (círculos) y embriones aislados (triángulos) de los genotipos IS9530 (símbolos llenos) y RedlandB2 (símbolos vacíos), medidos a 25°C en distintos momentos del desarrollo. MF: Madurez fisiológica; MC: madurez de cosecha.

Los embriones de sorgo de la línea IS9530 (con dormición persistente) no poseen un contenido de ABA consistentemente más elevado que los embriones de la línea RedlandB2 (cuyos cariopses tienen una pérdida anticipada de la dormición). Más aún, el contenido de ABA durante la incubación de cariopses con dormición contrastante, así como la tasa de degradación/conjugación de ABA en el apoplasto de las dos variedades de sorgo mencionadas, tampoco difiere entre las líneas (Gualano et al., 2007). Sin embargo, para suprimir la germinación de los embriones RedlandB2, se requieren concentraciones de ABA 10 veces mayores a las necesarias para inhibir la germinación de embriones de la línea IS9530 (Steinbach et al., 1995). Esta diferente sensibilidad de los embriones al ABA sí se correlacionan con el patrón de salida de la dormición de granos enteros a través del desarrollo, tanto para genotipos resistentes como susceptibles al BPC (Steinbach et al., 1995; Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). La mayor sensibilidad al ABA de los granos de la línea IS9530 podría interpretarse como el resultado de una mayor actividad de la vía de señalización del ABA en estos embriones, en comparación con los de la línea RedlandB2. En ese sentido, Rodríguez et al. (2009) informaron que la transcripción de los genes de sorgo *ABI3/VP1*, *ABI4*, *ABI5* y *PKAB1* (reguladores positivos de la señalización del ABA) es estimulada durante la incubación de granos inmaduros dormidos de la línea resistente al BPC (IS9530), pero no en granos del genotipo con menos dormición y susceptible al BPC (RedlandB2).

Por otra parte, Benech-Arnold et al. (2000) informaron que la sensibilidad de los embriones a la GA₃ (medida como la habilidad de concentraciones crecientes de GA₃ para revertir la inhibición de la germinación causada por una solución de ABA 50 μM) no está relacionada con los niveles contrastantes de dormición que exhiben las líneas de sorgo IS9530 y RedlandB2. Pero el bajo nivel de dormición que presentan los granos inmaduros de líneas de sorgo con susceptibilidad al BPC se expresa además como una alta capacidad para producir GAs activas que promueven la germinación: embriones de cariopses RedlandB2 con baja dormición producen inmediatamente antes de la manifestación visible de la germinación, un nivel de GA₄ significativamente mayor al que se detecta en los embriones de granos IS9530 con alta dormición (Perez-Flores et al., 2003; Rodríguez et al., 2012). Es conocido que los niveles de GAs son regulados a través de la transcripción de los genes que codifican para las enzimas de su metabolismo (Hedden y Phillips, 2000). El análisis transcripcional de varios genes de sorgo que codifican para enzimas putativas de síntesis de GAs (*SbEKO*, *SbEKAH*, *SbGA20ox2*, *SbGA20ox3* y *SbGA3ox1*) muestra un aumento temprano de estos transcritos en granos dormidos (IS9530) durante la imbibición, comparado con el genotipo de menos dormición (RedlandB2), y disminuye luego (Rodríguez et al., 2012). Sin embargo, esta activación de genes de síntesis de giberelinas en IS9530 está acompañada por una evidente promoción de los genes de inactivación de giberelinas *SbGA2ox1* y *SbGA2ox3*. La concordancia temporal en el patrón de acumulación de algunos transcritos de la vía de señalización del ABA, del metabolismo de las GAs y la variación observada en los niveles de GAs activas en granos inmaduros embebidos, sugiere la posibilidad de que algunos componentes de la señalización del ABA puedan estar regulando la transcripción de genes del metabolismo de GAs.

La información generada hasta el momento acerca de la regulación de los mecanismos fisiológicos y moleculares que se ponen en funcionamiento durante la expresión de la dormición en granos de sorgo inmaduros y maduros (i.e. antes y después de madurez fisiológica), sugiere que los componentes que tienen un rol relevante en cada condición de madurez no serían los mismos. En ese sentido, la síntesis *de novo* de GAs contribuye a la germinación de semillas inmaduras de RedlandB2, pero no parece ser el mecanismo responsable de las diferencias genotípicas en granos maduros (Rodríguez et

al., 2012). Por otra parte, los genes involucrados en la señalización del ABA evaluados por Rodríguez et al. (2009) y Carrari et. al (2001) parecen tener un rol importante durante el mantenimiento de la dormición en granos inmaduros, pero en granos maduros serían otros componentes de esta vía los encargados de la expresión de la dormición.

Si bien durante muchos años se ha logrado una detallada caracterización fisiológica y se han propuesto genes candidatos que tendrían un rol importante en la expresión de la dormición de granos inmaduros de sorgo utilizando el sistema IS9530/RedlandB2, los estudios desde un abordaje genético, aun son necesarios. En este contexto, la identificación de QTL para dormición de sorgo surge como una necesidad, no solo para este sistema particular, sino a nivel general del cereal ya que hasta el momento se ha informado un único trabajo de identificación de QTL para dormición de cariopses de sorgo granífero. En ese trabajo, Lijavetzky et al. (2000) reportaron dos QTL que, en forma conjunta, explicaban más del 80% de la varianza fenotípica observada para dormición de granos inmaduros en sorgo. Sin embargo, a pesar de los valiosos aportes de este último trabajo, el tamaño reducido de población de mapeo utilizada en ese entonces limitaba la posibilidad de llevar adelante trabajos futuros tendientes a corroborar dichos QTL en distintos ambientes o realizar la fenotipificación en granos con distinto grado de madurez. La identificación de nuevos QTL en una nueva población segregante de mayor tamaño construida a partir de las líneas parentales IS9530 y RedlandB2, permitiría identificar regiones del genoma que estén vinculadas a la expresión diferencial de la dormición en sorgo. Delimitar esas regiones, será el primer paso para identificar en un futuro los genes responsables de esos QTL, y a continuación realizar una caracterización funcional de las proteínas codificadas por los genes detectados.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general:

Contribuir a la dilucidación de los mecanismos moleculares y genéticos que participan en la expresión de la dormición de semillas de cereales, utilizando *Sorghum bicolor* (L.) Moench como sistema modelo.

1.2.2. Objetivos específicos:

- i) Identificar loci de caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a la expresión de la dormición en una población segregante obtenida a partir del cruzamiento de las líneas endocriadas IS9530 (elevada dormición) y RedlandB2 (baja dormición).
- ii) Identificar los genes incluidos en los QTL detectados y analizar su posible rol en el marco de los conocimientos actuales de dormición en sorgo granífero.
- iii) Evaluar la existencia de una interacción directa *in vitro* entre los factores de transcripción ABI4 y ABI5, tanto en forma individual como simultánea, y el promotor del gen que codifica para la GA2-OXIDASA3, responsable de la inactivación de GAs con actividad biológica en semillas de una línea de sorgo cuyos granos presentan una dormición persistente (IS9530).
- iv) Evaluar si existe un mecanismo posible de regulación de la transcripción común a las GA2-OXIDASA3 de sorgo y GA2-OXIDASAS de otras especies que muestren similitud en su secuencia proteica (filogenia).

1.3. Hipótesis de trabajo

i) Los QTL detectados serán diferentes dependiendo del tiempo de desarrollo de las semillas; es decir, las regiones del genoma que estén vinculadas a la expresión de la dormición no serán las mismas en granos inmaduros (antes de madurez fisiológica) que en granos maduros (después de madurez fisiológica).

ii) Los factores de transcripción ABI4 (tipo AP2) y ABI5 (tipo bzip) interactúan *in vitro* con una porción de la región 5' regulatoria del gen que codifica para la GA 2-OXIDASA3 (*SbGA 2-OXIDASA3*), responsable de la inactivación de GAs activas en semillas de sorgo con dormición.

Para cumplir con los objetivos **i)**, y **ii)** se llevaron a cabo ensayos a campo de las generaciones F₂ y F₃ durante las campañas 2008-2009 y 2009-2010 respectivamente, en dos localidades diferentes (Castelar y Manfredi). La población de mapeo fue fenotipificada y genotipificada para finalmente realizar el análisis de QTL propiamente dicho. El análisis en detalle de los QTL detectados se realizó utilizando el Genome Browser disponible para *Sorghum bicolor* en el sitio www.phytozome.net. Para cumplir el objetivo **iii)** se realizaron ensayos de retardo en gel con proteínas recombinantes de sorgo SbABI4 y SbABI5 obtenidas con ese fin. Por último, para llevar a cabo el objetivo **iv)** se realizó un análisis filogenético con GA2-OXIDASAS de distintas especies, seguido de un análisis comparativo de la región promotora de los genes que codifican para esas proteínas.

El primer capítulo de la tesis comprende la **Introducción**, exponiendo la problemática a abordar, los antecedentes sobre el tema, los objetivos de esta tesis y las hipótesis correspondientes. Los capítulos 2 (**Identificación de QTL vinculados al carácter dormición en una población segregante de *Sorghum bicolor***) y 3 (**Posible regulación del catabolismo de las giberelinas por el ABA durante la expresión de la dormición: ABI5 y ABI4 de sorgo se unen *in vitro* al promotor de un gen *GA2-oxidasa***) comprenden los resultados experimentales de esta tesis, y a la vez incluyen cada uno de ellos una breve introducción, materiales y métodos y discusión. Por último el capítulo 4 (**Discusión general**) incluye la contrastación de las hipótesis planteadas originalmente, la discusión de los resultados de forma conjunta e integrada, las implicancias de los resultados obtenidos para futuras investigaciones y un modelo integrado de los aportes realizados por esta tesis.

CAPITULO 2

Identificación de QTL vinculados al carácter dormición en una población segregante de *Sorghum bicolor*

CAPITULO 2

Identificación de QTL vinculados al carácter dormición en una población segregante de *Sorghum bicolor*

Resumen

En este capítulo se abordó en primer lugar el objetivo específico i), que planteaba “*identificar loci de caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a la expresión de la dormición en una población segregante obtenida a partir del cruzamiento de las líneas endocriadas IS9530 (elevada dormición) y RedlandB2 (baja dormición)*”. Para ello se utilizó una población de mapeo F_{2:3}, generada a partir del cruzamiento de líneas parentales con niveles de dormición contrastante (IS9530 y RedlandB2). Se realizó la fenotipificación para el carácter dormición en dos momentos del desarrollo, antes y después de madurez fisiológica (34 y 45 días post anthesis, DPA), en dos ambientes diferentes (Manfredi y Castelar). La genotipificación de la población se llevó a cabo con marcadores microsatélites y a partir de los resultados obtenidos se construyó un mapa de ligamiento. Para el análisis de QTL se utilizaron dos metodologías de mapeo por intervalos, mapeo por intervalos compuesto (CIM) y mapeo de caracteres múltiples (MTM). Estos métodos de análisis permitieron detectar tres QTL de efecto aditivo, en granos maduros (*qDOR-5*, *qDOR-9* y *qDOR-10*), mientras que en granos inmaduros no se identificó ninguna región vinculada a la variabilidad del carácter. El loci *qDOR-5* resultó un QTL específico de Castelar, mientras que *qDOR-9* y *qDOR-10* se identificaron en los dos ambientes evaluados. En segundo lugar, se abordó el objetivo específico ii) de esta tesis, que planteaba “*identificar los genes incluidos en los QTL detectados y analizar su posible rol en el marco de los conocimientos actuales de dormición en sorgo granífero*”. Para ello se realizó un análisis *in silico* de las regiones abarcadas por los QTL, ubicadas en el mapa físico disponible para sorgo granífero. Los resultados de este análisis mostraron que ninguno de los genes candidatos propuestos para explicar las diferencias en dormición que existen entre las líneas parentales de la población utilizada, estaría localizado dentro de los QTL identificados. Sin embargo, la ubicación del gen *SbABI5* (mapeado mediante un marcador funcional derivado de un polimorfismo entre IS9530 y RedlandB2), coincidió con una región candidata a ser un QTL en futuros análisis de mapeo que incluyan un mayor número de ambientes. El análisis *in silico* de los QTL evidenció una elevada cantidad de genes incluidos en los mismos, para muchos de los cuales no se dispone de información funcional al presente, lo cual imposibilitó hacer sugerencias con respecto a genes candidatos que puedan ser los responsables de esos QTL para dormición. El trabajo presentado en este capítulo aportó la delimitación de regiones del genoma de sorgo vinculadas a la expresión de la dormición en semillas de sorgo maduras. Dentro de estas regiones deberán enfocarse futuros esfuerzos para lograr un mapeo más fino y finalmente identificar el gen o genes responsable de la contribución de cada QTL a la variabilidad observada en la dormición.

2.1. Introducción

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor*) constituye el quinto cereal en importancia mundial, después del maíz, trigo, arroz y la cebada. Argentina se encuentra dentro de los 10 principales países productores de sorgo a nivel mundial, siendo el cuarto cultivo de verano en importancia en nuestro país, después de la soja, el maíz y el girasol. El brotado pre-cosecha (BPC) es uno de los factores que limitan la producción de sorgo en la región central de Argentina, debido a que el período de llenado de sus granos hasta alcanzar la madurez, transcurre durante fines del verano o inicios del otoño cuando prevalecen condiciones lluviosas o de elevada humedad ambiental. La combinación de elevada humedad con temperaturas adecuadas y genotipos que poseen bajo nivel de dormición puede desencadenar el brotado de los granos en la planta madre, acarreamo pérdidas económicas tanto en lotes para producción de grano como en parcelas para multiplicación de semillas. Ello ha conducido a que la resistencia al BPC, a través de la obtención de cultivares con mayor dormición, sea un carácter deseado por los mejoradores. Sin embargo, la resistencia al BPC rara vez es evaluada e incluida como objetivo en los programas de mejoramiento. Esto se debe, en primer lugar, a que su evaluación implica la realización de extensos ensayos de germinación, y en segundo, a que al ser un carácter gobernado por numerosos genes y con una importante influencia de la condiciones ambientales, se dificulta su manipulación a través del mejoramiento (Anderson et al., 1993).

En este contexto, surge la necesidad de determinar la estructura genética de la dormición en especies de interés agrícola, como es el sorgo granífero y una de las aproximaciones más adecuadas para hacerlo es a través de la disección de esa variabilidad en loci de caracteres cuantitativos (QTL). Gracias a los avances conjuntos ocurridos en las últimas décadas en biología molecular y genética y en el desarrollo de modelos estadísticos apropiados, es ahora posible determinar la posición individual de los QTL vinculados a la expresión de un carácter continuo, y la contribución relativa de cada uno de ellos. El análisis de QTL es, en ese sentido, una estrategia válida para identificar genes que regulen directamente la dormición y cuyas variantes alélicas están detrás de la variabilidad intraespecífica existente. En esa dirección, considerando que tanto la imposición como la expresión de la dormición se apoyan en mecanismos particulares en cada especie, y que a su vez son afectados de manera específica por factores ambientales, se hace necesario llevar adelante abordajes genéticos adecuados a cada especie. En los últimos años, numerosos estudios han informado la existencia de QTL vinculados a dormición, tanto en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* como en especies de interés agrícola. En *A. thaliana* Alonso-Blanco et al. (2003) localizaron el QTL *DOG1*, y el mismo fue sometido a un mapeo fino (de alta resolución), que permitió aislar el gen *DOG1*, vinculado al establecimiento de la dormición durante la maduración de la semilla en esta especie (Bentsink et al., 2006). Por otra parte, en arroz, el QTL *SDR4* fue identificado y caracterizado (Lin et al., 1998; Sugimoto et al., 2010), tratándose de un gen cuyo producto es una proteína regulatoria específica de la dormición, que se encuentra bajo el control del factor de transcripción *OsVPI* (Sugimoto et al., 2010). En distintas poblaciones de mapeo de cebada fueron identificados los QTL *SD1* (Han et al., 1996) y *SD2* (Prada et al., 2004), siendo el gen que codifica para una *GA-20oxidasa* uno de los genes candidatos propuestos para este último QTL. Por otro lado, en trigo Flintham (2000) y Groos et al. (2002) identificaron los *Red grain color loci (R)* causantes de un incremento en la dormición de los granos. Más tarde, Mori et al. (2005) reportaron un QTL en el cromosoma 3A, para el cual Nakamura et al. (2011)

propusieron como gen candidato a *TaMFT*, un represor de la germinación en trigo. En el caso particular de sorgo granífero, Lijavetzky et al. (2000) informaron dos QTL que en conjunto explicarían el 83% de la variabilidad en resistencia al brotado pre-cosecha (dormición) en granos inmaduros, en una población obtenida a partir del cruzamiento de las líneas endocriadas IS9530 (elevada dormición) y RedlandB2 (baja dormición).

Los avances logrados en los últimos años en relación a la regulación fisiológica y molecular de la dormición en sorgo granífero, sugieren que la sensibilidad al ABA y el metabolismo de las GAs son los dos componentes que cobran mayor relevancia al momento de explicar el comportamiento de dormición que tienen los granos de un determinado genotipo (Steinbach et al., 1995; Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2012). Pero al mismo tiempo, los resultados obtenidos en esta línea sugieren que los mecanismos que operan durante la expresión de la dormición en granos maduros e inmaduros podrían no ser los mismos. Esta idea se fundamenta principalmente en los resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2012) quienes observaron que la síntesis *de novo* de giberelinas contribuye a la germinación de los granos antes de madurez fisiológica (i.e. 40 DPA), pero no pareciera ser el mecanismo que mejor explica la germinación de granos maduros (i.e. después de madurez fisiológica). Se ha observado además que la expresión de algunos componentes de la señalización del ABA (*ABII*, *ABI4*, *ABI5*, *VP1/ABI3* y *PKABAI*) y los genes de catabolismo de GAs *GA2ox1* y *GA2ox3*, medidos en un genotipo susceptible al BPC (RedlandB2) y en otro resistente al BPC (IS9530), explicaría el comportamiento contrastante de dormición que se observa en granos inmaduros (30 DPA) pero no en granos maduros (47 DPA) (Rodríguez et al., 2009). De ese modo, las diferencias que se evidencian en los patrones de salida de la dormición de genotipos con elevada y baja dormición en distintos momentos del desarrollo, podrían estar regulados por genes diferentes. En este contexto, un abordaje genético de la dormición, que permita identificar y comparar porciones del genoma de sorgo vinculadas a la expresión de la dormición en granos con distinto grado de madurez (maduros e inmaduros) resultaría de gran utilidad.

El progreso reciente que se ha dado en genómica de sorgo ha puesto a disposición recursos genéticos importantes que pueden ser utilizados para la generación de marcadores moleculares y para la identificación de genes que gobiernan distintos caracteres de relevancia agronómica. En el marco de ese progreso, un hecho fundamental en los últimos años fue la concreción de la secuenciación del genoma de la línea de sorgo BTx623 (Paterson et al., 2009), <http://www.phytozome.net/sorghum>, que trajo como consecuencia inmediata la generación de un mapa físico para la especie. Entre los 5 cereales más importantes a nivel mundial, el genoma del sorgo resultó tener el segundo genoma más pequeño (750 Mb) después del arroz, y corresponde aproximadamente a un tercio del genoma de maíz. Por otra parte, durante las últimas décadas se han desarrollado distintos tipos de marcadores moleculares como RFLPs, AFLPs, RAPDs, SSRs, DArTs y SNPs, que han sido utilizados de manera exitosa en la construcción de mapas de ligamiento para sorgo granífero (Bhatramakki et al., 2000; Hausmann et al., 2002; Menz et al., 2004; Mace et al., 2009; Ramu et al., 2009; Satish et al., 2009). Particularmente, se ha incrementado notoriamente la cantidad de microsatélites o SSR (simple sequence repeats) disponibles para esta especie (Yonemaru et al., 2009). Los SSR consisten en secuencias de entre 1 y 5 nucleótidos que se repiten en tándem un número determinado de veces y es precisamente el número de veces que se repite una secuencia lo que origina distintos alelos para dicho marcador. La naturaleza multialélica, la transmisión codominante, la facilidad de su detección por PCR, la frecuencia en que se presentan, la cobertura de una gran extensión del genoma y el requerimiento de pequeñas

cantidades de ADN para su detección hacen que los microsatélites sean considerados marcadores moleculares de gran valor en estudios de mapeo de QTL (Powell et al., 1996).

Actualmente, existe una importante variedad de metodologías para identificar QTL a partir de los datos genotípicos y fenotípicos generados a partir de una población segregante. Dentro de esas opciones, el mapeo por intervalos compuesto o CIM (Jansen, 1994; Zeng, 1994) ha superado ampliamente en cuanto a poder de detección de QTL, al mapeo por intervalos simple o SIM (Lander y Botstein, 1989). A su vez, las metodologías por intervalos compuestos incluyen variantes de gran utilidad como el mapeo de caracteres múltiples o MTM (Jiang y Zeng, 1995). Todos estos análisis son igualmente válidos y a la vez complementarios, siendo la aplicación de más de uno de ellos para un mismo conjunto de datos, una alternativa ventajosa a la hora de obtener un panorama lo más acabado posible de las bases genéticas que gobiernan un carácter en una condición dada.

En este contexto, el trabajo presentado en este capítulo tuvo como objetivo identificar QTL vinculados a la expresión de la dormición en granos de sorgo granífero maduros e inmaduros, en una población de mapeo generada a partir del cruzamiento de las líneas endocriadas IS9530 (elevada dormición, resistente al BPC) y RedlandB2 (baja dormición, susceptible al BPC), en dos ambientes contrastantes, Castelar (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba). Adicionalmente, se realizó un análisis *in silico* de los QTL detectados, para sugerir posibles genes candidatos que pudieran ser los responsables de dichos QTL. Los QTL que se generen en el marco de esta tesis sentarán las bases para la localización de regiones genómicas vinculadas a la expresión del carácter dormición que deberán ser exploradas en mayor detalle mediante el mapeo fino posterior. Como resultado del mapeo fino se espera concretar la identificación de genes que intervienen en el carácter dormición vinculado al BPC, y ahondar en su función y los mecanismos regulatorios de los cuales forman parte.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Población de mapeo

Para la construcción del mapa genético y posterior detección de QTL se utilizó una población segregante de sorgo granífero obtenida a partir del cruce de las líneas parentales IS9530 y RedlandB2. Estas dos líneas son altamente contrastantes en el carácter dormición: IS9530 posee elevada dormición y es resistente al BPC, mientras RedlandB2 tiene baja dormición y es susceptible al BPC. El cruzamiento de estos dos genotipos dio lugar a panojas F_1 , de las cuales por autofecundación se obtuvieron 1800 semillas F_2 (provenientes de una única panoja autofecundada). La totalidad de las semillas fueron sembradas durante la campaña 2008-2009, en un diseño completamente aleatorio, en el campo experimental del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, en una siembra en hileras (tanto de la población de mapeo como de las líneas parentales IS9530 y RedlandB2). Del total de plantas F_2 , se identificó un grupo de unos 190 individuos, que florecieron sincrónicamente y fue ese conjunto de plantas el que se utilizó para la obtención de la población F_3 : las 190 plantas F_2 fueron autofecundadas y las semillas F_3 resultantes se cosecharon y se sembraron en la siguiente campaña para constituir la población F_3 . El cultivo de plantas F_3 se realizó durante la campaña 2009-2010 en la estación experimental INTA Manfredi (Córdoba), en el predio correspondiente al laboratorio de Biotecnología, con un diseño en bloques completamente aleatorizado. El cultivo estuvo constituido por 3 bloques, cada uno

formado por hileras (parcelas) de 25 plantas correspondientes a cada una de las 190 familias F₃ (provenientes de la siembra de semillas de las 190 panojas de la generación F₂ seleccionadas. Durante las dos campañas, el cultivo se mantuvo bajo riego, libre de malezas, con aplicación de plaguicida, fungicida y fertilización adecuada. Durante los dos ensayos, todas las plantas fueron registradas en una planilla. Al cabo de aproximadamente 75 días post siembra comenzó la floración del cultivo, el cual se recorría diariamente para la marcación de antesis para cada una de las plantas. Se consideró la fecha de antesis de cada planta como el día en que asomaron las anteras (de color amarillo intenso) en el tercio central de la panoja.

2.2.2. Evaluación de la dormición de semillas en la población de mapeo (fenotipificación)

La variable medida en la población de mapeo fue la dormición de las semillas. Como se mencionó anteriormente, la presencia de dormición se percibe de manera indirecta como la ausencia de germinación de semillas incubadas en condiciones estandarizadas de humedad y temperatura. Para realizar las mediciones de dormición, una vez cosechadas las semillas se incubaron 3 pseudo- réplicas de 50 semillas en cajas de Petri con dos papeles de filtro y 6 ml de agua destilada en cámaras incubadoras a 25 °C. Durante 12 días consecutivos se realizaron recuentos de germinación, para lo cual se consideró que una semilla estaba germinada cuando se visualizaba la radícula por fuera de las cubiertas seminales. Diariamente se retiraron de las placas las semillas germinadas y se registró el N° acumulado de semillas germinadas. Transcurridos los 12 días de recuentos de germinación se calculó un Índice de Germinación (IG), a partir de la fórmula de Steinbach et al. (1995):

$$IG = (n1 \times 12 + n2 \times 11 + \dots + n12 \times 1) / 50$$

donde $n1$ a $n12$ son los números de cariopses germinados en el día 1 y los días subsecuentes.

La fenotipificación se realizó tanto en plantas F₂ como en F₃. Durante la fenotipificación de la población F₂ se seleccionaron dos grupos de aproximadamente 190 plantas de una población de un total de 1800 plantas. La selección de las plantas estuvo basada en la fecha de antesis: a partir del registro de las fechas de antesis, se identificaron 190 plantas que tuvieran la misma fecha de antesis, conformando un “grupo de antesis”. Sobre ese grupo de plantas, se realizaron dos muestreos de semillas, uno a los 34 DPA (poco antes de la madurez fisiológica, MF) y otro a los 45 DPA (después de madurez fisiológica). El momento de MF se estimó alrededor de los 36-40 DPA, y se observó como la aparición de una capa negra localizada en la base del grano (chalaza). Aunque ambas cosechas difieren en sólo 10 días, son importantes los cambios fisiológicos que ocurren en esta ventana de tiempo, ya que no solo el contenido de humedad del grano disminuye considerablemente, sino que además ocurre la muerte celular programada del endosperma que rodea al embrión. Los muestreos consistieron en cosechas de 150 semillas del tercio central de las panojas, que se incubaron como se detalla más arriba para el cálculo final de IG de cada planta F₂ seleccionada. Al mismo tiempo, se guardaron semillas de estos 190 individuos, para sembrar en la próxima campaña y constituir la generación de familias F₃. Simultáneamente, durante la campaña 2008-2009, se hicieron muestreos por duplicado de 50 semillas de 5 plantas de las líneas

parentales (IS9530 y RedlandB2) a 30, 34, 37, 40 y 45 DAP y se calculó el IG para dichas plantas.

Durante la campaña 2009-2010 se llevó a cabo el cultivo y fenotipificación de las familias F_3 . Para ello, se cosecharon semillas a los 45 DPA y se agruparon en una única muestra para cada familia de plantas y por cada bloque. Las muestras de semillas fueron el resultado de la cosecha de aproximadamente 5 a 8 plantas por familia, utilizándose nuevamente las semillas provenientes del tercio central de la panoja para los muestreos. Para la medición de dormición se incubaron 3 pseudo-réplicas de 50 semillas por familia y por bloque.

La estimación de la heredabilidad del carácter dormición se pudo realizar únicamente a partir de los datos fenotípicos de la generación F_3 (IG de granos maduros en Manfredi), ya que en la F_2 no se disponía de repeticiones biológicas para su cálculo. Para estimar la heredabilidad en sentido amplio (H^2), se realizó un ANOVA en Infostat (Di Rienzo et al., 2010), y se estimaron las varianzas fenotípicas, genotípicas y ambientales, y la correspondiente heredabilidad (V_G/V_F), a partir de los cuadrados medios.

2.2.3. Búsqueda de polimorfismo en genes candidatos para dormición

Se analizó la presencia de posibles polimorfismos en genes candidatos previamente asociados con la diferente dormición de las líneas IS9530 y RedlandB2, con el doble propósito de utilizarlos como marcadores en la construcción del mapa de ligamiento y a la vez evaluar si alguno de estos genes mapea con alguno de los QTL detectados. Para ello se realizaron búsquedas *in silico* en la base de datos PlantGDB de las secuencias de *Sorghum bicolor* correspondientes a los genes candidatos *ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *GA2oxidasal*, *GA2oxidasal3* y *PkABAI*. Estos genes habían mostrado expresión diferencial entre ambas líneas IS9530 y RedlandB2 (ver introducción). Se amplificaron por PCR los intrones, exones y regiones 3' y 5' no codificantes correspondientes a cada uno de los genes en los dos genotipos (IS9530 y RedlandB2). Los productos de PCR fueron secuenciados y se realizó un alineamiento de cada una de las secuencias para ambos genotipos, con el fin de identificar regiones polimórficas entre ellos. En el caso de presencia de polimorfismo, se diseñaron "primers" que amplificaran esa región y así poder utilizarla como marcador funcional a incorporar en el mapa genético. Los códigos de identificación de los genes candidatos evaluados se encuentran en la Tabla suplementaria 2.1.

2.2.4. Análisis de marcadores microsatélites (genotipificación)

La genotipificación se llevó a cabo en la generación de plantas F_2 , para lo cual se cosechó una hoja completa de cada una de las plantas a las que se les había medido el IG (190) y también se conservó una hoja de las líneas parentales. Las hojas fueron liofilizadas y a continuación molidas en el equipo TissueLyser (Quiagen). A partir de ellas se realizó una extracción de ADN genómico con buffer CTAB (Watson y Thompson, 1986). La extracción de ADN se realizó tanto para las plantas de la población de mapeo como para las líneas parentales. Las muestras de ADN fueron cuantificadas en un equipo NanoDrop y se prepararon diluciones de trabajo de 20ng/ul. La genotipificación de la población se realizó con microsatélites (SSRs) y su selección se hizo a partir de las bases de datos públicas de microsatélites para sorgo granífero. Se intentó escoger aquellos marcadores que fueran polimórficos en un elevado número de líneas de *Sorghum bicolor* para aumentar la probabilidad de que fueran polimórficos

entre las líneas parentales utilizadas en la construcción de esta población. Una vez seleccionados los SSRs, se adquirieron los “primers” correspondientes, estando uno de los mismos marcado con alguno de los fluoróforos FAM (azul), HEX (verde) o NED (amarillo), salvo en el caso de un grupo pequeño de SSR (SAMIV) cuyos “primers” no fueron marcados. La marcación de los “primers” con fluoróforos fue necesaria para la posterior determinación exacta de los tamaños de los alelos de cada marcador a través de electroforesis capilar. En primer lugar se probó la presencia o ausencia de polimorfismo del grupo de marcadores elegidos en las líneas parentales (aproximadamente 220 marcadores). Cabe aclarar que los SSR corridos fueron identificados con una nomenclatura interna, por lo que en la Tabla suplementaria 2.2 se ofrece un listado de todos los marcadores corridos en las líneas parentales y el nombre público correspondiente. Del total de marcadores probados (unos 220), resultaron polimórficos entre IS9530 y RedlandB2, 85 SSR. Se realizaron amplificaciones por PCR para cada uno de los marcadores informativos en las muestras de ADN de la población de mapeo. Para el caso de los SSR marcados con fluoróforos, las mezclas de reacción para las corridas de PCR estuvieron constituidas por: Buffer 1X; Mg_2Cl 1.5 mM; dNTPs 0.2 mM; Taq Platinum 0.425 U; “Primers” 0.25 μM , Templado 20 ng. Para los microsátélites SAMIV, se siguió el mismo protocolo, pero con 0.75 U de Taq Platinum y 30 ng de templado. El programa de PCR en el caso de los SSR marcados con fluoróforo, consistió en las siguientes etapas: un único ciclo de desnaturalización inicial (94°C, 5 mins); 39 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 segs), “annealing” (50°C, 30 segs), elongación (72°C, 45 segs) y un último ciclo de elongación final (72°C, 10 mins). En el caso de los marcadores SAMIV, se utilizó un programa de PCR touchdown, en donde se incorporaron 10 ciclos iniciales con descensos de 1°C por ciclo en la temperatura de “annealing” (desde 61°C a 51°C) y 31 ciclos adicionales con una temperatura de “annealing” de 54°C. En el caso del primer protocolo de PCR, los productos quedaron marcados con las partículas fluorescentes que se habían incorporado previamente a los “primers” correspondientes. Una alícuota de cada una de las amplificaciones fue evaluada en gel de agarosa 1,5% para confirmar la aparición de un único amplicón y el volumen restante fue enviado a la Unidad de Genómica del INTA Castelar. Allí se realizó una electroforesis capilar mediante el uso del equipo ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosynthesis), que permitió separar los productos de PCR de acuerdo a la relación masa/carga en un capilar. Este equipo genera un diferencial de potencial entre los dos extremos del capilar que provoca que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del mismo y así posibilita la separación de las moléculas por carga/tamaño. La electroforesis capilar estuvo acoplada a un detector de fluorescencia, que permitió mediante el uso de un software apropiado (GeneMapper 4.0.) obtener el tamaño exacto de cada alelo para cada microsátélite en cada uno de los individuos de la población. Para el caso de los SSR SAMIV, los productos de PCR fueron corridos en un gel de poliacrilamida (3%) y se identificó visualmente la conformación alélica de cada individuo.

2.2.5. Construcción de mapa de ligamiento o mapa genético

A partir de los datos de la genotipificación se construyó una matriz con cada individuo F_2 y el genotipo correspondiente a cada uno de los marcadores evaluados. Se ingresaron los datos de 190 individuos y 85 marcadores. En primer lugar se evaluó la bondad de ajuste de la segregación para cada marcador a través de un test de X^2 , siendo eliminados aquellos marcadores que presentaron una segregación diferente a la esperada (1:2:1). El nivel de significancia para las pruebas de X^2 que resultó del 5%, se determinó

mediante el test FDR (False discovery rate). Cuatro marcadores presentaron una distorsión en la segregación, por lo cual fueron eliminados para la construcción del mapa de ligamiento, quedando un total de 81 marcadores informativos. Las distancias genéticas entre marcadores fueron obtenidas por medio del software JoinMap, utilizando un valor de LOD mínimo de 5, una frecuencia de recombinación máxima de 50% y la función de mapeo de Kosambi (1943). La utilización de un valor de LOD relativamente alto permitió obtener un mapa con alto grado de confianza y eliminar aquellos marcadores que presentaban ligamiento no consistente (4 SSR fueron eliminados en esta instancia por no quedar incluidos en ningún grupo de ligamiento). Una vez obtenido el mapa genético, se corroboró la posición y el orden de los marcadores con respecto al mapa físico de *Sorghum bicolor* (versión 2.1) utilizando la herramienta Gbrowse, disponible en http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/sorghum_er/.

2.2.6. Análisis de QTL

Mediante la utilización combinada de la información generada en el mapa de ligamiento y la fenotipificación realizado en la población de mapeo, se realizó el análisis de QTL. Para ello en primer lugar se definieron los tres grupos de datos fenotípicos a utilizar:

- IG1. Índice germinación de semillas cosechadas a 34 DPA, generación F₂, Castelar (Buenos Aires), campaña 2008-2009 (no se disponen de repeticiones biológicas, el valor de IG fue calculado para cada planta individual y fue el promedio de tres réplicas-cajas de Petri).
- IG2. Índice de germinación de semillas cosechadas a 45 DPA, generación F₂, Castelar (Buenos Aires), campaña 2008-2009 (no se disponen de repeticiones biológicas, el valor de IG fue calculado para cada planta individual y fue el promedio de tres réplicas-cajas de Petri).
- IG3. Índice de germinación de semillas cosechadas a 45 DPA, generación F₃, Manfredi (Córdoba), campaña 2009-2010. El valor de IG utilizado es promedio de 3 repeticiones a campo, provenientes de un diseño en bloques completamente aleatorizado.

Para realizar la detección de QTL para dormición se utilizaron dos metodologías diferentes en paralelo: CIM (Mapeo por intervalos compuestos) y MTM (Mapeo de caracteres múltiples). En ambos casos se utilizó el software QTL Cartographer.

2.2.6.1. CIM

La metodología de mapeo por intervalos compuestos permite detectar QTL mediante la combinación de mapeo por intervalos con regresión múltiple. El objetivo de esta metodología es controlar la variabilidad genética que puede haber en otras regiones del genoma fuera del intervalo considerado entre dos marcadores puntuales y de esta forma incrementar el poder de detección de los QTL (Zeng, 1993; Zeng, 1994). La variabilidad genética residual es controlada mediante la incorporación de cofactores que consisten en marcadores que están significativamente asociados con el carácter y pueden estar localizados en cualquier posición del genoma. Para identificar en primer lugar estos cofactores se realiza una regresión simple por pasos que permita encontrar marcadores que se asocien significativamente con el carácter de interés. La regresión por pasos puede realizarse hacia delante o hacia atrás: en la regresión hacia adelante, se va agregando al análisis un marcador por vez y se prueba si ese marcador se asocia

significativamente al fenotipo; en la regresión por pasos hacia atrás, se incorporan todos los marcadores disponibles y se eliminan aquellos que no muestran una asociación significativa con el fenotipo. Aquellos marcadores que resultaron estar asociados al carácter, se convierten en cofactores, y al ser incorporados en el CIM se logra evaluar la presencia de un QTL en un intervalo dado, independientemente de los efectos de otro QTL que pudiera existir en el mismo cromosoma. El análisis CIM realiza varios tests de hipótesis en donde se ponen a prueba distintas hipótesis alternativas: $H_1: a \neq 0$ y $d=0$ (modelo aditivo) $H_2: d \neq 0$ y $a=0$ (modelo de dominancia); $H_3: a \neq 0$ y $d \neq 0$ (modelo completo). La hipótesis nula en todos los casos es $H_0: a=0$ y $d=0$ (ausencia de un QTL). La presencia de un QTL se deduce a partir del valor del estadístico (LR o Likelihood Ratio) calculado en los tests para cada posición del genoma evaluada. Para definir el valor de LR crítico a partir del cual se declaró significativo un QTL en esta tesis, se utilizó un test de permutación con 1000 permutaciones y un nivel de significancia de 0.05 (Churchill y Doerge, 1994). El test de permutación fija el genotipo de los individuos, permuta sus valores fenotípicos y realiza un análisis de QTL cada vez que se permutan los datos (en este caso 1000 veces). Los valores máximos de LR alcanzados en cada una de las 1000 permutaciones realizadas, se ordenaron de mayor a menor, y se seleccionó el valor de LR ubicado en la posición 50 de los 1000 valores posibles (nivel de significancia del 0.05). Ese valor de LR se estableció como crítico y se calculó por separado para cada conjunto de datos (IG1, IG2 e IG3). El mapeo de QTL por CIM y la estimación de los valores de aditividad y dominancia se realizaron a través del software QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2006). Se seleccionó una velocidad de caminado de 0.5 cM (i.e. cada 0.5 cM el software realizó las pruebas de hipótesis). Para establecer qué modelo genético ajustaba mejor la varianza de los datos fenotípicos (modelo aditivo, modelo de dominancia o modelo completo), se evaluó el valor de LR de cada test de hipótesis, y cuando ese valor excedió el valor crítico (obtenido a través del test de permutación), se consideró que el modelo era estadísticamente significativo. A modo de ejemplo, si el LR calculado en una posición determinada para el test que tenía como hipótesis alternativa $H_1: a \neq 0$ y $d=0$, superó el crítico, se declaró la presencia de un QTL en esa posición con efecto génico aditivo.

2.2.6.2. MTM

El mapeo de caracteres múltiples, implica una extensión de la aplicación del CIM a varios caracteres o a un mismo carácter medido en distintos ambientes (Jiang y Zeng, 1995). Una de las ventajas principales de este tipo de análisis es la posibilidad de calcular la interacción QTL x ambiente (GxE) y la existencia de efectos pleiotrópicos (QTL que tengan efecto sobre varios caracteres a la vez). La utilización de un análisis MTM no solo incrementa el poder de detección de QTL sino que además aumenta la precisión de la posición de los QTL en el mapa, ya que al trabajar con mediciones de un carácter en dos ambientes (o dos caracteres diferentes en un mismo ambiente), ello equivaldría de manera aproximada a tener medidas repetidas, y ello lleva a una reducción de la varianza residual. En el presente trabajo, se utilizaron los datos correspondientes a IG2 e IG3, que consistían en el mismo carácter (IG a las 45 DPA) medido en dos ambientes diferentes (Manfredi y Castelar). Para determinar los valores de LR crítico, tanto para la posición de los QTL como para la interacción GxE, se corrieron test de 1000 permutaciones, con un nivel de significancia del 0.05, tal como se explicó para CIM. De acuerdo a los QTL detectados, para determinar si los mismos presentaban interacción GxE se analizó el valor del estadístico correspondiente, en la posición más

probable de los QTL (máximo LR obtenido). Si el valor del estadístico se encontró por encima de valor de LR crítico, se consideró una interacción significativa.

Para los resultados obtenidos con CIM y MTM, se precisó la posición de los QTL detectados informando un intervalo de confianza del 95% generado a partir del descenso de 2 unidades de LOD (9.22 unidades de LR) con respecto al pico de LR máximo de cada QTL (Van Ooijen, 1992). Los QTL detectados fueron nombrados con una letra *q* seguida de las letras *DOR* y el número de cromosoma en el que se localizaron.

La Figura 2.1 muestra un esquema resumiendo las etapas del análisis de mapeo, incluyendo la construcción de la población segregante, la fenotipificación, la genotipificación, los ambientes y campañas en donde se llevaron a cabo los ensayos.

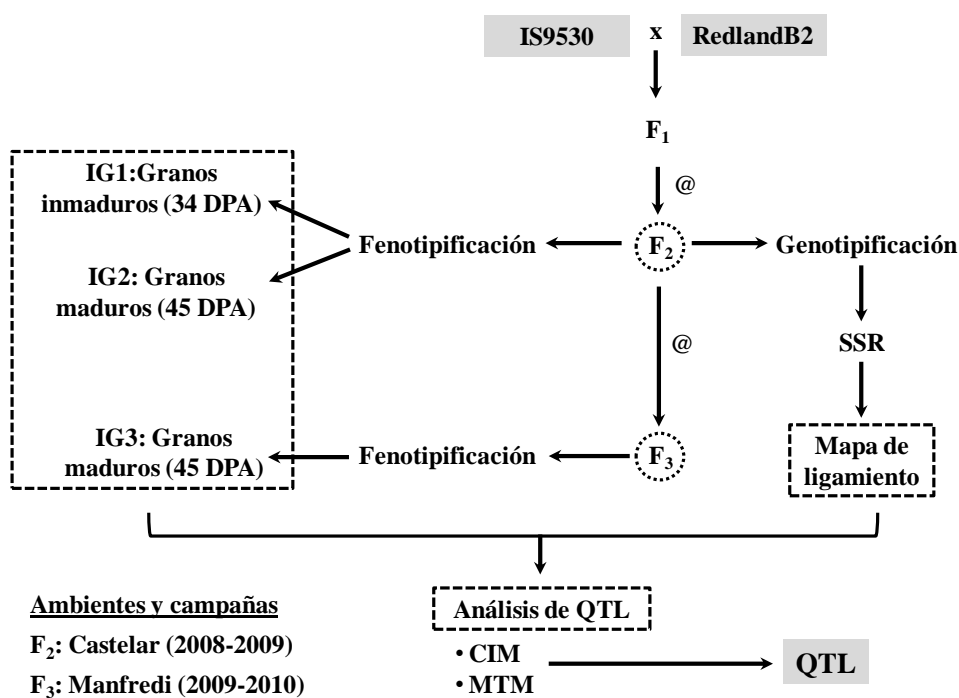


Figura 2.1. Esquema integrado de la metodología empleada para llevar a cabo el análisis de QTL. Se indican las líneas parentales utilizadas para la construcción de la población (IS9530 y RedlandB2), la generación genotipificada y las fenotipificada, los grupos de datos fenotípicos obtenidos, marcadores moleculares utilizados (SSR), metodologías de análisis de QTL empleadas (CIM y MTM), los ambientes y campañas en donde se realizaron los ensayos. El símbolo @ implica autofecundación de las plantas.

2.2.7. Análisis *in silico* de las regiones del genoma comprendidas por los QTL detectados

Una vez finalizada la detección de QTL se realizó un análisis *in silico* de las secuencias correspondientes a los QTL identificados con las distintas metodologías. Para ello se utilizó la herramienta Gbrowse para *Sorghum bicolor*, disponible en http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/sorghum_er/. Se consideraron las porciones genómicas comprendidas dentro de los intervalos delimitados por el par de SSRs correspondientes a cada QTL. Para ello se utilizó la herramienta “blastn”, ingresando la secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos (“primers”) usados para amplificar los SSR que delimitaban el intervalo, como consulta o “query”. La herramienta “blastn” permitió obtener la posición exacta de esos oligos y en función de ello la localización de

la porción del genoma comprendida por dichos intervalos. Las regiones de los QTL fueron detalladamente escaneadas y se identificaron los códigos de todos los genes comprendidos en ellas y su función en caso de que estuviera descripta (en muchos casos la función putativa era desconocida). Por otro lado, se evaluó la ubicación de genes del metabolismo de giberelinas (*SbCPS*, *SbKSB*, *SbEKO*, *SbEKAH*, *SbGA20ox1*, *SbGA20ox2*, *SbGA20ox3*, *SbGA3ox1*, *SbGA3ox2*, *GA2ox1*, *SbGA2ox2*, *SbGA2ox3*) y de señalización de ácido abscísico (*SbABI1*, *SbABI2*, *SbABI3*, *SbABI4*, *SbABI5* y *SbPKABA*) en el genoma de sorgo, con el fin de determinar si alguno de ellos se localizaba dentro o en las cercanías de alguno de los QTL detectados. Los códigos de identificación de los genes evaluados y su posición en el genoma se encuentran disponibles en la Tabla suplementaria 2.1.

2.3. Resultados

2.3.1. Evaluación fenotípica

Los cultivos correspondientes a las generaciones F_2 y F_3 de la población de mapeo, se llevaron a cabo en las localidades de Castelar (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba), durante las campañas 2008-2009 y 2009-2010 respectivamente. Además de haber realizado los ensayos en dos sitios y campañas diferentes, se utilizaron distintas fechas de siembra: en Castelar se sembró el 20 de octubre y en Manfredi el 10 de diciembre. Este conjunto de decisiones, determinó que las condiciones ambientales que experimentaron los cultivos F_2 y F_3 fueran diferentes (Figura 2.2). Particularmente, la temperatura promedio para el período comprendido entre antesis y los muestreos de granos fue mayor en Castelar (24.5°C) que en Manfredi (21.6 °C). La radiación diaria promedio para esta misma etapa también fue mayor en Castelar (24.4 MJm⁻²) que en Manfredi (18.5 MJm⁻²). El agua no fue limitante en ninguna de las dos localidades, ya que en Castelar se utilizó riego y en Manfredi las precipitaciones cubrieron los requerimientos hídricos del cultivo. En cuanto a las características edáficas, Castelar presentó un suelo Argialbol típico, pobremente drenado, con un horizonte Bt fuertemente textural; mientras que el suelo en Manfredi fue un Haplustol éntico, profundo, bien drenado y con buena capacidad de almacenaje de agua.

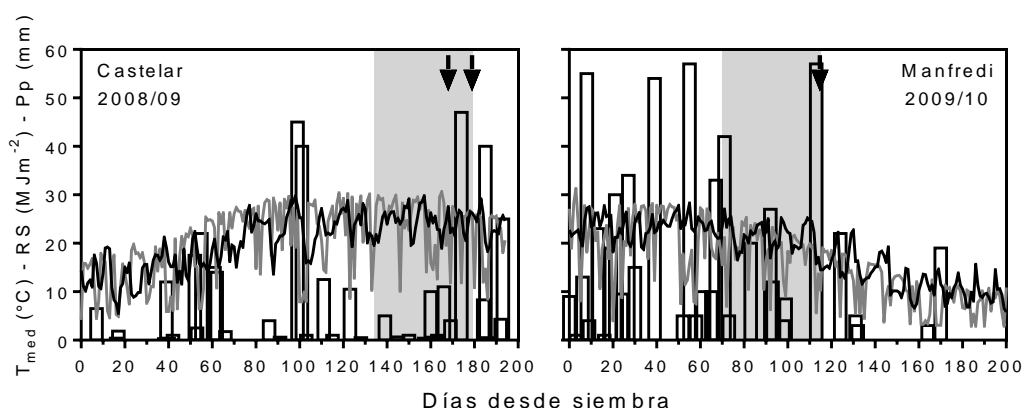


Figura 2.2. Evolución de la temperatura media diaria ($^{\circ}\text{C}$; línea negra), radiación solar media diaria incidente (MJ m^{-2} ; línea gris) y precipitaciones diarias (mm; barras) para el ciclo de cultivo de las generaciones F_2 (Castelar, 2008/09) y F_3 (Manfredi, 2009/10). La barra gris representa el período comprendido entre antesis (floración) y los muestreos realizados en cada campaña (34 DPA y 45 DPA en Castelar y 45 DPA en Manfredi), que se indican con una flecha.

La evaluación fenotípica de la población de mapeo $F_2:F_3$, se realizó a través del cálculo del índice de germinación (IG), según se describe en la sección “Materiales y métodos”. Este índice refleja el total de semillas germinadas y la velocidad con la que germinaron. Las dos líneas parentales (IS9530 y RedlandB2) mostraron diferencias significativas en IG en todos los muestreos (34 y 45 DPA, Castelar y 45 DPA, Manfredi). Los datos de IG mostraron una distribución aproximadamente normal en los casos de los grupos IG2 (45 DPA, Castelar) e IG3 (45 DPA, Manfredi). La fenotipificación realizada a los 34 DPA (IG1, Castelar) no mostró una distribución normal, con un elevado número de plantas que tuvieron valores de IG comprendidos entre 0 y 20. Para todos los casos, se observó un amplio rango de variación del carácter, desde muy elevada dormición (bajo IG) a muy baja o ausencia de dormición (elevado IG), indicando una herencia cuantitativa típica (Figura 2.3). Por otra parte, se detectó segregación transgresiva positiva para IG1, en donde algunos individuos presentaron mayores valores de IG que la línea parental RedlandB2 y para IG2, donde unos pocos individuos exhibieron valores de IG menores a la línea parental IS9530.

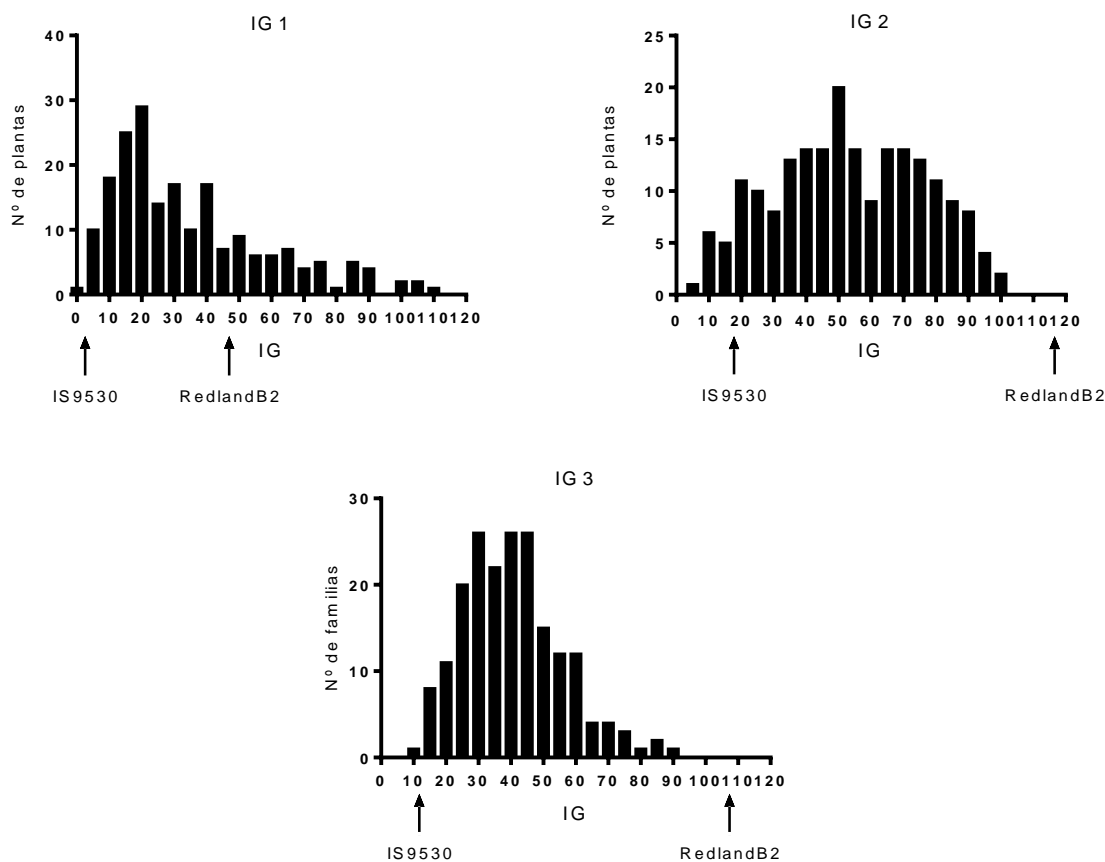


Figura 2.3. Distribución de frecuencias de Índices de germinación (IG) para distintas generaciones y ambientes. A, IG de individuos F₂, semillas cosechadas 34 días post anthesis (DPA) en Castelar (Buenos Aires). B, IG de individuos F₂, semillas cosechadas 45 DPA en Castelar (Buenos Aires). C, IG de familias F₃, semillas cosechadas 45 DPA en Manfredi (Córdoba). En todos los casos las flechas indican los IG para las líneas parentales (IS9530 y RedlandB2) medidos en esos mismos ambientes.

Al haber realizado un diseño en bloques completamente aleatorizado (DBCA) para la generación F₃ en la localidad de Manfredi, fue posible estimar la heredabilidad en sentido amplio del carácter dormición en granos maduros (45 DPA) para esa localidad. Para ello se realizó un ANOVA (Tabla 2.1), considerando las 186 familias F₃ que lograron fenotiparse en ese ambiente (4 familias no pudieron ser evaluadas en este ambiente porque tuvieron problemas de implantación). Las fuentes de variación fueron la familia y el bloque (repetición).

F.V.	SC	gl	CM	CM Estima:	F	p-valor
Modelo	126270.02	187	675.24		3.73	<0.0001
Familia	122597.25	185	662.69	$V_E + rV_G$	3.66	<0.0001
Bloque	3672.78	2	1836.39	$V_E + gV_r$	10.14	<0.0001
Error	66993.66	370	181.06	rV_E		
Total	193263.68	557				

Tabla 2.1. Análisis de la varianza para datos fenotípicos (IG) de granos maduros (45 DPA), en Manfredi. F.V.: fuente de variación; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrado medio; V_E : varianza ambiental; V_G : varianza genotípica; V_r : varianza de las repeticiones; g: número de familias F₃; r: número de repeticiones (3).

A partir de los cuadrados medios obtenidos en el ANOVA se estimaron las magnitudes de las varianzas genotípica (V_G), ambiental (V_E) y fenotípica (V_F) y la heredabilidad en sentido amplio o H^2 como V_G/V_F . Los valores obtenidos fueron V_G : 160.54; V_E : 60.35; V_F : 220.89 y H^2 0.73. El valor de H^2 estimado indica que el 73% de la variabilidad fenotípica observada en dormición de granos maduros, fue explicada por el genotipo.

2.3.2. Identificación de polimorfismos en genes candidatos para dormición

Con el objetivo de generar marcadores funcionales, es decir marcadores que estuviesen localizados en genes candidatos para dormición en sorgo, se amplificaron por PCR exones, intrones y regiones UTR (untranslated regions) de los genes *ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *GA2oxidasal* *GA2oxidasal3* y *PkABA*, en ambas líneas parentales (IS9530 y RedlandB2). La secuenciación de esos amplicones y el posterior alineamiento de las secuencias obtenidas, reveló la presencia de un InDel (inserción-delección) en el gen *SbABI5*. La InDel consistió en la presencia de las 6 bases CAGCAG en la secuencia del primer exón de *SbABI5* en la posición +40 pb (a partir del ATG) de RedlandB2 y su ausencia en IS9530 (Figura suplementaria 2.1). El polimorfismo detectado se utilizó para construir un marcador informativo que fue evaluado junto con el resto de los SSR en la

población de mapeo generada, ofreciendo la ventaja de ser un marcador funcional. Para el resto de los genes candidatos evaluados no se detectó ningún polimorfismo de tamaño en las regiones amplificadas.

2.3.3. Análisis de marcadores moleculares y construcción de mapa de ligamiento

Se corrieron aproximadamente 220 marcadores microsatélites (SSR) en las líneas parentales IS9530 y RedlandB2, resultando polimórficos, y por ende informativos, 85 de ellos. Para los 85 SSR se realizó una prueba de X^2 , con el objetivo de probar que su segregación fuera la apropiada. Se detectaron 4 marcadores que presentaban segregación distorsionada (SgMS0006, SgMS0012, SgMS0158 y SAMIV33) y por lo tanto fueron eliminados antes de proceder a la construcción del mapa genético. El análisis de ligamiento realizado mediante el software JoinMap 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), reveló que los marcadores SAMIV51, SgMS0287, SgMS0010 y SgMS0260 no se incorporaron a ningún grupo de ligamiento y por ende fueron eliminados del análisis. Una vez obtenido el mapa genético se chequeó que la posición y el orden de cada uno de los SSR incluidos en el mapa fuera coherente con su posición física en el genoma de sorgo, utilizando para ello la herramienta Genome Browser para *Sorghum bicolor* disponible en www.phytozome.net (Figura suplementaria 2.2). El mapa genético quedó constituido por 10 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia total de 1011 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 13 cM (Figura 2.4).

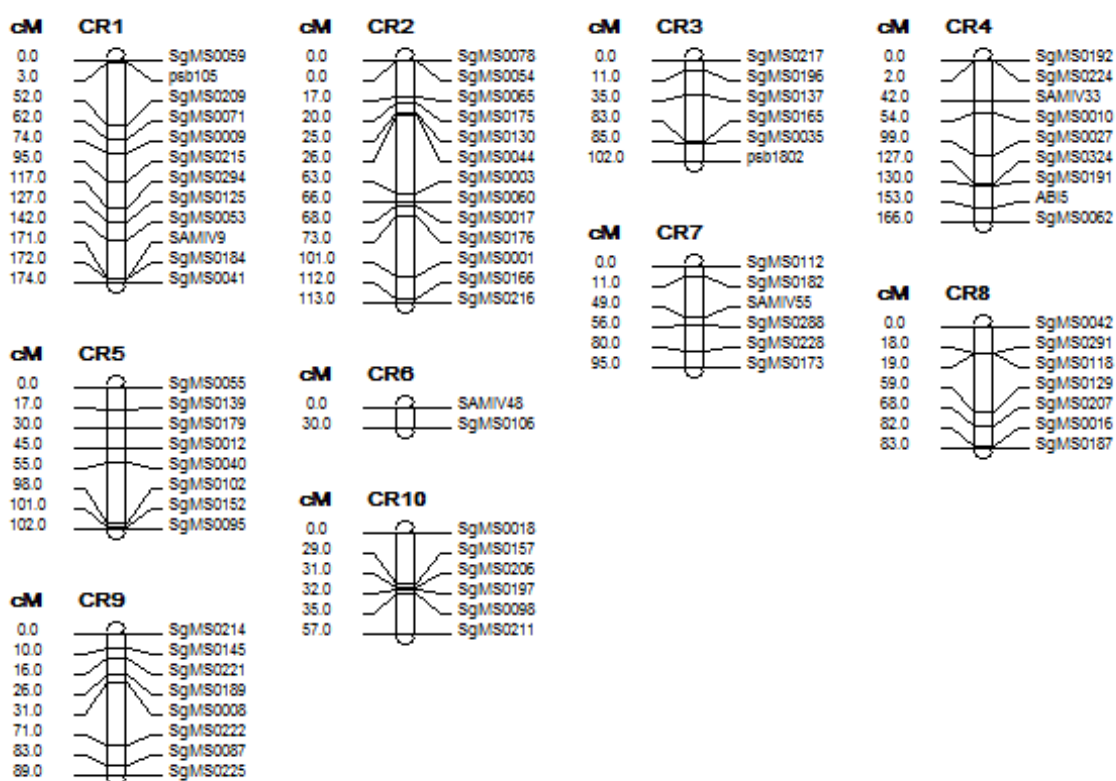


Figura 2.4. Mapa de ligamiento para una población $F_{2:3}$ de sorgo granífero derivada del cruzamiento de las líneas IS9530 y RedlandB2, construido a partir del análisis de segregación de 77 microsatélites (SSR). Las distancias entre marcadores (en cM) se indican a la izquierda de cada grupo de ligamiento y los nombres de los marcadores hacia la derecha.

2.3.4. Identificación de QTL

Mediante el uso combinado del mapa genético generado para la población de mapeo y los datos fenotípicos obtenidos en los dos ambientes (Castelar y Manfredi), se realizó el análisis de QTL. Para ello se utilizaron 2 metodologías distintas en simultáneo, según se detalla en la sección materiales y métodos: mapeo por intervalos compuestos (CIM) y mapeo de caracteres múltiples (MTM).

2.3.4.1. Mapeo por intervalos compuestos

Para el análisis CIM, en primer lugar se calcularon los valores críticos del estadístico LR para cada grupo de datos fenotípicos (IG1, IG2 e IG3), a través del test de permutación (1000 permutaciones), obteniéndose los siguientes valores: IG1: 39,83; IG2: 18,43 e IG3: 17,14. Solo en los casos en los que el LR calculado fuera superior al valor de LR crítico estimado, se consideró la presencia de un QTL. Para el caso de IG1 (F_2 , 34 DPA), no se detectaron valores de LR superiores al crítico (39.83) en ninguna posición del genoma, es decir que no se hizo evidente ningún QTL para dormición en este grupo de datos fenotípicos (Figura 2.5). Cabe destacarse además que los valores de IG en este caso no mostraron una distribución normal y si bien la normalización de los datos IG1 podría haber sido una alternativa factible para rehacer el análisis, se consideró inapropiada, ya que en caso de normalizarlos y realizar un análisis de QTL con ellos, la reproducibilidad de los resultados y el grado de certeza de los posibles QTL que surgieran estaría en riesgo.

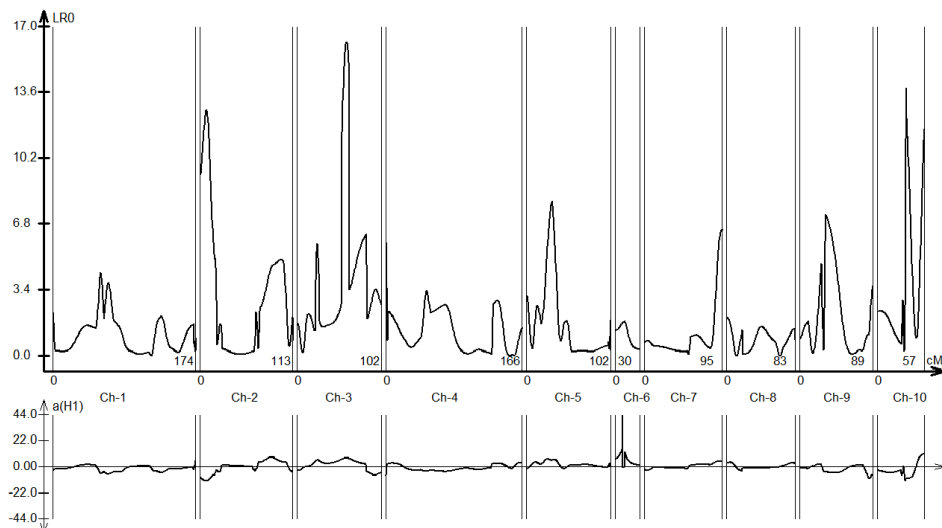


Figura 2.5. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG1 (F₂, 34 DPA, Castelar). El valor de LR crítico estimado a partir del test de permutación para este grupo de datos fue de 39.83, quedando excluido del gráfico debido a su magnitud.

En el caso de IG2, se identificó un QTL localizado en el cromosoma 5 (*qDOR-5*), en la posición 5.51 cM (LR=24.984; Figura 2.6) asociado al marcador SgMS55 (Figura suplementaria 2.3). El QTL explicó el 18.58 % de la variabilidad fenotípica observada en los IG ($R^2 = 18.58\%$), y mostró un efecto aditivo de -15.68, indicando que el mismo disminuye en 15.68 unidades el valor de IG. El desvío por dominancia para *qDOR-5* fue de -1.25 y el tamaño calculado, con un intervalo de confianza del 95% fue de 10.8 cM.

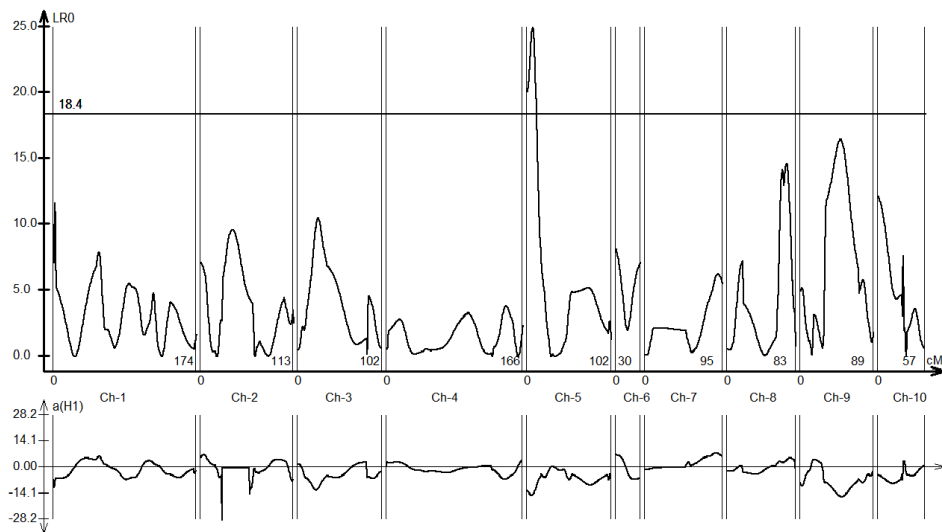


Figura 2.6. A. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG2 (F_2 , Castelar). El valor de LR crítico (18.43) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del mapa genético.

Por otra parte, se identificó por CIM un QTL para el carácter IG3, ubicado en el cromosoma 9 (*qDOR-9*), en la posición 82.51 cM (LR=32.10; Figura 2.7), asociado al marcador SgMS222 (Figura suplementaria 2.4). El QTL encontrado explicó un 16.31% de la variabilidad fenotípica observada en el grupo de datos IG3 ($R^2 = 16.31\%$) y tuvo un efecto aditivo de -8.61 y un desvío por dominancia de -0.03. El tamaño estimado para *qDOR-9*, con un intervalo de confianza del 95% fue de 7.3 cM.

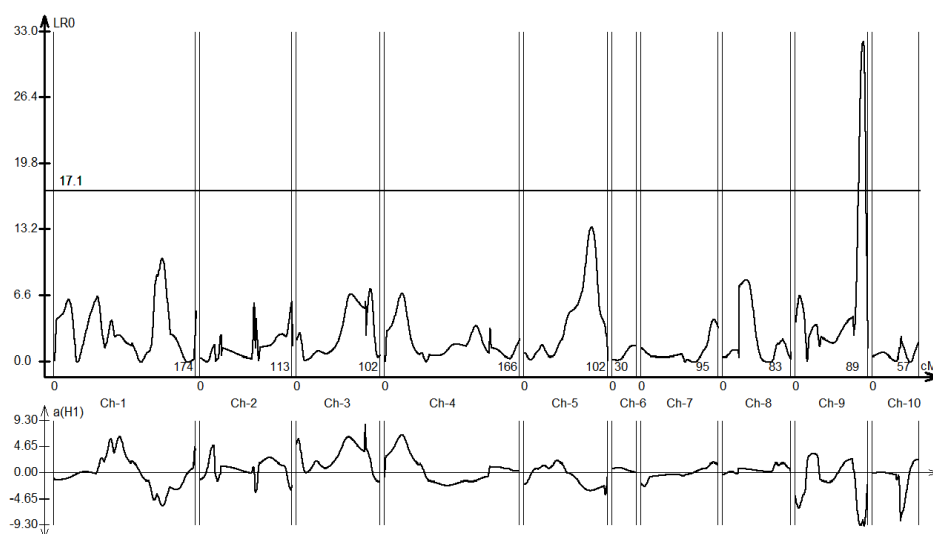


Figura 2.7. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo por intervalos compuestos para los datos fenotípicos IG3 (F₃, Manfredi). El valor de LR crítico (17.14) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, valores de aditividad correspondientes a cada posición del mapa genético.

2.3.4.2. Mapeo de caracteres múltiples

El hecho de disponer de una misma variable fenotípica (IG de semillas cosechadas a los 45 DPA) medida en dos ambientes diferentes (Castelar y Manfredi), permitió la realización de un análisis de mapeo de caracteres múltiples (MTM). En este caso, los valores de LR críticos obtenidos a través de test de permutación fueron: 19.1 (IG2), 18.7 (IG3) y 25.8 (IG2 e IG3 de forma conjunta o “joint-trait”). Los resultados del análisis MTM indicaron la presencia del mismo QTL detectado por CIM, en el cromosoma 9 (*qDOR-9*), en la posición 82.51 cM (LR=32.8164; Figura 2.8), asociado al marcador SgMS222 (Figura suplementaria 2.5). Por otra parte, se identificó un QTL en el cromosoma 10 (*qDOR-10*), en la posición 34.51 cM (LR= 33.8830; Figura 2.8), asociado al marcador SgMS197 (Figura suplementaria 2.6). Si bien el método MTM no estima efectos génicos (a y d) al analizar los datos conjuntos IG2 e IG3 (“joint-trait”), a continuación se informan los valores estimados en los análisis individuales para cada grupo de datos fenotípicos (IG2 e IG3) que realiza el MTM de manera previa al “joint-trait”. Para el QTL *qDOR-9*, se observó un efecto aditivo (a) de -8.84 y un desvío por dominancia (d) de -0.16 y en el caso del QTL *qDOR-10* obtuvo un efecto aditivo de -9.95 y un desvío por dominancia de 2.09. El tamaño de los QTL de acuerdo a un intervalo de confianza del 95% fue 7.3 cM para *qDOR-9* y de 8.2 cM para *qDOR-10*. El análisis por MTM no estima valores de R², por lo cual no se puede realizar ninguna afirmación acerca de la proporción de variabilidad fenotípica explicada por *qDOR-10*.

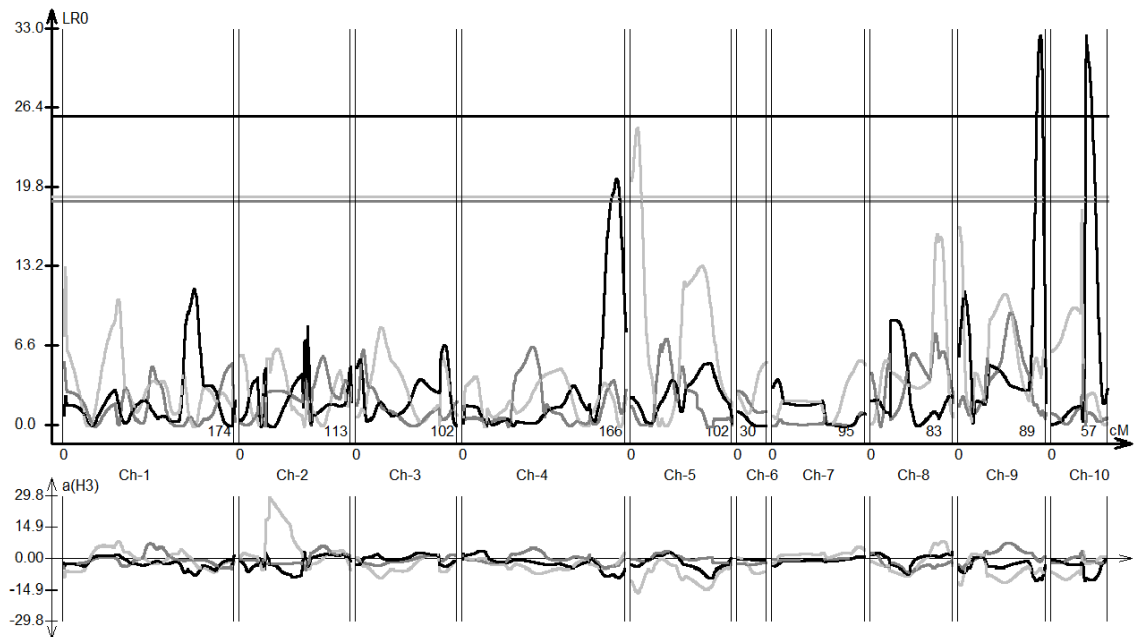


Figura 2.8. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas) para el mapeo de caracteres múltiples (MTM). En gris claro, resultados para datos fenotípicos IG2 (F_2 , Castelar); en gris oscuro resultados para datos IG3 (F_3 , Manfredi) y en negro, resultados del análisis conjunto de datos fenotípicos IG2 e IG3 (“joint-trait”). Los valores de LR crítico se indican en cada caso con una línea recta del color correspondiente (IG2: 19.1; IG3: 18.7 y “joint-trait”: 25.8). Debajo, valores de aditividad para cada posición del mapa genético.

Para poner a prueba la interacción GxE de los QTL detectados por MTM, se evaluó el valor de LR para la interacción GxE correspondiente a la posición más probable de los QTL. No se encontró una interacción GxE significativa en ninguno de los dos casos, ya que los valores de LR (3.7989 y 9.6174 para *qDOR-9* y *qDOR-10* respectivamente) no superaron el valor de LR crítico estimado para la interacción GxE (24.2278).

En la tabla 2.2 se muestra un resumen de los QTL detectados a partir de las distintas metodologías de mapeo, y sus valores de referencia.

QTL	GL	LR máx.	LOD-2(i.)	LOD-2(d.)	Pos. LR max.	Intervalo	R ²	a	d
Metodología CIM									
<i>qDOR-5</i>	CR5	24.98	0.9 cM	12.7 cM	5.51 cM	SgMS55 / SgMS139	0.1858	-15.68	-1.25
<i>qDOR-9</i>	CR9	32.1	79.0 cM	86.3 cM	82.51 cM	SgMS222 / SgMS87	0.1631	-8.61	-0.03
Metodología MTM									
<i>qDOR-10</i>	CR10	33.88	34.5 cM	42.7 cM	34.51 cM	SgMS197 / SgMS98		-9.95	2.09

Tabla 2.2. Resumen de los QTL detectados para dormición, detallando GL: grupo de ligamiento; LR máx.: valor de LR máximo; LOD-2(i.): posición LOD-2 hacia la izquierda; LOD-2(d.): posición LOD-2 hacia la derecha; intervalo: intervalo entre marcadores SSR; Pos. LR máx.: posición del LR máximo; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL; a: efectos aditivos y d: desvío por dominancia.

2.3.5. Análisis *in silico* de los QTL detectados

Con el objetivo de conocer los genes incluidos en los QTL detectados a través de las tres metodologías (CIM y MTM) y evaluar si alguno de los genes candidatos para dormición (vinculados al metabolismo de las GAs o a la señalización del ABA) se encontraba incluido en estos sitios, se realizó un análisis *in silico* de las regiones genómicas abarcadas por los QTL. Para ello se utilizó la herramienta Genome Browser de sorgo granífero generado por el Joint Genome Institute (www.phytozome.net), que permite tener acceso a cada uno de los genes incluidos en una porción del genoma definida por el usuario, en este caso a través de la posición de los marcadores que flanquearon cada QTL (intervalo). El tamaño genético (en cM) y el físico (en pb) de los QTL detectados fue variado, como así también la cantidad de genes comprendidos dentro de esas regiones, y no hubo una relación constante entre el tamaño y el número de genes incluidos (Tabla 2.3). Por ejemplo, *qDOR-10* mostró una elevada densidad de genes considerando su tamaño genético (103.3 genes/cM), pero una baja densidad de genes considerando su tamaño físico (1.04×10^{-4} genes/pb). De manera contraria, *qDOR-9* mostró una baja densidad de genes en función de su tamaño genético (5.17 genes/cM), pero una elevada densidad de genes considerando su tamaño físico (0.1409 genes/pb). Por otra parte, aproximadamente la mitad de los genes identificados en los diferentes QTL tienen funciones desconocidas y para gran parte de los restantes solo se dispone de información de funciones putativas. Solo un pequeño porcentaje tiene función conocida en sorgo u otra especie relacionada (Tabla suplementaria 2.3).

QTL	Intervalo	Intervalo en pb	Tamaño (pb)	Tamaño (cM)	Genes
<i>qDOR-5</i>	SgMS55 y SgMS139	Chr05: 1.907.430 - 3.641.500	1.734.070	17	197
<i>qDOR-9</i>	SgMS222 y SgMS87	Chr09: 54.914.820 - 55.354.550	439.730	12	62
<i>qDOR-10</i>	SgMS197 y SgMS98	Chr10: 17.470.000 - 47.161.320	29.691.320	3	310

Tabla 2.3. QTL detectados, intervalo dentro del cual se encontraron comprendidos, tamaño del intervalo en pares de bases (pb), tamaño del intervalo en cM, y cantidad de genes incluidos en cada caso.

Para evaluar si alguno de los genes candidatos se encontraba comprendido dentro de los intervalos definidos por los marcadores, en primer lugar se identificó la ubicación en el genoma de sorgo de cada uno de ellos (Tabla suplementaria 2.1). De la información compilada, se pudo determinar que algunos genes se localizaron en cromosomas en donde también se identificaron QTL. *SbAB11*, *SbAB14*, *SbGA20ox2*, *SbGA3ox2*, *SbGA2ox1* y *SbGID1* se ubicaron en el cromosoma 9 y por otra parte *SbEKO* y *SbEKAH* se localizaron en el cromosoma 10. Si bien ninguno de estos genes se encontró posicionado físicamente dentro de los intervalos de los QTL definidos por los marcadores, algunos de ellos se ubicaron en las cercanías de esas regiones. Particularmente *SbAB11* se localizó 500.000 pb río arriba del intervalo delimitado por SgMS222 y SgMS87 (*qDOR-9*). El gen *SbAB15*, que había sido incorporado como marcador funcional en el mapa de ligamiento, no quedó incluido dentro de ninguno de los QTL; sin embargo, los resultados del MTM (“joint-trait”) mostraron que si bien el valor de LR en la posición de *SbAB15* no alcanzó a superar el LR crítico, obtuvo un valor muy elevado (20.6) en el cromosoma 4, posicionándolo muy próximo al valor de LR umbral (Figura suplementaria 2.7). En términos generales, debido al tamaño de los QTL identificados, y al número elevado de genes que se encuentran incluidos en ellos (muchos de ellos con funciones desconocidas), hacer alguna sugerencia en cuanto a cuáles de ellos podrían ser los responsables de esos QTL se torna dificultoso. En todo caso, es posible afirmar con la información disponible que ninguno de los genes que en la literatura se han reportado como partícipes directos del establecimiento y/o imposición de la dormición en otras especies, colocaliza con los QTL identificados en el presente trabajo.

2.4. Discusión

El carácter dormición es un rasgo cuantitativo, producto de la acción combinada de numerosos genes y de los efectos significativos que tiene el ambiente en su expresión (Bentsink et al., 2007). A la vez, para diversas especies de cereales se ha observado una variabilidad intra-específica importante para el carácter dormición y la susceptibilidad al brotado pre-cosecha. La posibilidad de manipular el nivel de dormición y la respuesta al BPC de los cultivos depende de la comprensión de las bases genéticas de este carácter. Una estrategia para detectar aquellos genes cuyas variantes alélicas son responsables de una parte de la variabilidad fenotípica observada se basa en el análisis de genomas completos en busca de QTL. Este tipo de análisis provee información acerca de varios parámetros genéticos que son responsables de esa variabilidad continua, incluyendo el

número de loci, la magnitud de sus efectos, la ocurrencia de interacción entre algunos de ellos (epistasias) y la presencia de interacciones genotipo x ambiente cuando se evalúa el carácter en más de un ambiente. Hasta el momento se han encontrado QTL para dormición tanto en especies cultivadas (como los cereales) como en especies modelo (como *Arabidopsis*). La posterior identificación de los genes responsables de esos QTL es un desafío de mayor magnitud, sin embargo en los últimos años han aparecido los primeros resultados en este campo. En esa dirección, en *Arabidopsis* diversos análisis de QTL han identificados más de 12 regiones del genoma involucradas en dormición (Alonso-Blanco et al., 2003; Clerkx et al., 2004), y para una de ellas se logró aislar el gen responsable (*DOG1*), relacionado con la imposición de la dormición en semillas de *Arabidopsis* (Bentsink et al., 2006). Mientras tanto, en gramíneas como trigo, arroz, cebada, y avena también se ha avanzado en la genética de este carácter (Han et al., 1996; Lin et al., 1998; Flintham, 2000; Groos et al., 2002; Prada et al., 2004; Sugimoto et al., 2010) y para uno de los QTL encontrados en arroz, se logró identificar el gen responsable (*SDR4*) que estaría regulado por VP1/ABI3 durante la dormición (Sugimoto et al., 2010). En el caso de sorgo granífero, un único trabajo realizado por Lijavetsky et al., (2000) informó la localización de dos QTL para dormición en semillas inmaduras de esta especie (30 DPA). Sin embargo, una serie de cuestiones metodológicas de este último trabajo limitan el uso de la información generada: el número de individuos evaluados en ese entonces (90), la ausencia de una fenotipificación de granos maduros y la imposibilidad de tener repeticiones biológicas de las mediciones (se fenotipificaron únicamente individuos F₂). En ese sentido, se hicieron necesarios nuevos análisis de QTL que evalúen el carácter dormición en semillas de sorgo no solo inmaduras sino también maduras. En este capítulo se llevó a cabo un análisis de QTL para el carácter dormición en granos maduros (45 DPA) e inmaduros (30 DPA), evaluado en dos ambientes diferentes (Manfredi y Castelar), empleando en simultáneo dos metodologías de análisis (CIM y MTM).

La evaluación fenotípica del carácter dormición realizada en granos maduros e inmaduros de sorgo, permitió corroborar en primer lugar, la distribución continua que presenta este carácter en una población segregante como la utilizada en este trabajo. Por otra parte, el valor estimado de heredabilidad en sentido amplio del rasgo dormición para granos maduros en Manfredi ($H^2 = 0.73$) demostró que una proporción muy elevada de la variabilidad fenotípica que muestra el carácter, es explicada por el genotipo. Además, el valor de heredabilidad obtenido se asemeja a los reportados para el carácter dormición en numerosos trabajos de identificación de QTL (Prada et al., 2004; Silady et al., 2011; Kronholm et al., 2012), corroborando la importancia de caracterizar las bases genéticas que regulan la dormición, como vía posible para su manipulación en genotipos de sorgo granífero y otros cereales.

El análisis de QTL no permitió detectar QTL que expliquen la variabilidad fenotípica observada en dormición de granos inmaduros (34 DPA). Los datos fenotípicos de este muestreo, se mostraron muy alejados de una distribución normal y la normalización del grupo de datos IG1 no fue considerada como alternativa, ya que los resultados obtenidos de esa manera perderían confiabilidad y no se podrían comparar con los provenientes de los análisis de mapeo con granos maduros (IG2 e IG3). La imposibilidad de detectar porciones del genoma que estén vinculadas a la expresión de la dormición en granos inmaduros no implica que las mismas no existan, sino que es posible que haya varios loci de efectos menores involucrados en la expresión del carácter en semillas con este grado de desarrollo, y que la detección de los mismos requiera de metodologías de mapeo especiales, ajustadas para distribuciones apartadas de la normal,

un aumento del tamaño poblacional evaluado y un incremento en el número de marcadores moleculares utilizados (Beavis 1998).

El análisis realizado para granos maduros (45 DPA) resultó en la detección de 3 QTL con impacto en la expresión del carácter dormición. De los 3 QTL identificados, *qDOR-9* y *qDOR-10* surgieron del análisis combinado (“joint-trait”) de los datos fenotípicos provenientes de dos ambientes (Castelar y Manfredi), mientras que *qDOR-5* se manifestó únicamente en Castelar. La presencia de *qDOR-9* y *qDOR-10* en dos localidades (y dos años) diferentes, con condiciones ambientales contrastantes implica que, al menos para los dos ambientes evaluados, *qDOR-9* y *qDOR-10* son estables. Esa misma idea fue corroborada por la ausencia de interacción GxE significativa para estos mismos QTL, condición que les otorga estabilidad y permite establecer el alcance de los efectos de *qDOR-9* y *qDOR-10* al menos dentro del marco de esta tesis. De manera contraria, la ausencia de *qDOR-5* en Manfredi puede ser interpretada como una manifestación de interacción GxE significativa y su presencia únicamente en Castelar, dificulta la transferibilidad de sus efectos a otro ambiente como Manfredi, pero no invalida su importancia, indicando que *qDOR-5* se manifiesta en ambientes particulares como el que experimentó el cultivo en Castelar. En este contexto, a partir de este trabajo surge un QTL de efecto particular o específico (*qDOR-5*) y otros dos QTL que parecieran tener un alcance más amplio (*qDOR-9* y *qDOR-10*). Esta situación se encuentra con regular frecuencia en muchos trabajos sobre dormición, donde se informa sobre algunos QTL de efecto mayor que aparecen de manera consistente en más de un ambiente y otros QTL que se encuentran solo en ambientes específicos o bajo determinadas condiciones de cultivo (Miura et al., 2002; Hori et al., 2007). Los resultados de este capítulo junto con los antecedentes disponibles, reafirman la complejidad que existe en expresión de la dormición y la alta sensibilidad al ambiente que tiene este carácter. Por otra parte, la proporción de variabilidad fenotípica explicada por los QTL encontrados, en los casos en los que pudo ser estimada, adquirió magnitudes entre 15 y 20%. Particularmente, *qDOR-5* explicó el 18.5 % de las variaciones en dormición y *qDOR-9* explicó el 16.3%. En ambos casos, los valores obtenidos concuerdan con lo esperado para un carácter de naturaleza cuantitativa, donde se supone la acción conjunta de muchos genes con un efecto pequeño o mediano. Por otra parte, muchos trabajos que identificaron QTL para dormición informaron magnitudes de la variabilidad fenotípica explicada por esos QTL similares a los estimados en esta tesis (Cai y Morishima, 2002; Alonso-Blanco et al., 2003; Wan et al., 2005).

Una de las principales ventajas que poseen las poblaciones de mapeo F_{2,3}, como la utilizada en este trabajo, es que permiten estimar y diferenciar los efectos génicos de cada QTL identificado, es decir los valores de aditividad y dominancia (a y d) de los loci. En este sentido, si bien los QTL detectados fueron nombrados *qDOR*, para representar el carácter sobre el cual tienen impacto (dormición), al ser un carácter que se mide de forma indirecta (a través de la ausencia de germinación), los efectos aditivos o de dominancia de los QTL fueron expresados en unidades de IG. En este contexto, todos los QTL detectados (*qDOR-5*, *qDOR-9* y *qDOR-10*) presentaron efectos aditivos significativos de signo negativo, indicando que todos disminuyen el índice de germinación, y por lo tanto aumentan la dormición, en magnitudes que van desde una disminución de aproximadamente 8 unidades de IG (*qDOR-9*) a más de 15 unidades de IG (*qDOR-5*). En todos los casos, los alelos provenientes de la línea parental IS9530 fueron los que aumentaron el nivel de dormición (disminuyeron el valor de IG). Los valores de los desvíos por dominancia (d) para los tres QTL fueron próximos a cero o de una magnitud pequeña, sugiriendo que en todos los casos los loci presentaron un comportamiento claramente aditivo. En concordancia con los resultados de esta tesis, en

otras especies como *Arabidopsis* y cebada se ha informado que la dormición está principalmente determinada por genes con efecto aditivo (Hori et al., 2007; Imtiaz et al., 2008; Bentsink et al., 2010).

El tamaño de los 3 QTL identificados, expresado de acuerdo a un intervalo de confianza (IC) del 95%, resultó en 7.3 cM (*qDOR-9*), 8.2 cM (*qDOR-10*) y 11.8 cM (*qDOR-5*). Si bien esos valores se utilizaron para definir el tamaño estimado de los QTL, al momento de realizar el análisis *in silico* de las regiones comprendidas por ellos, se debió tomar como referencia la posición física del intervalo delimitado por los dos SSR más próximos al LR máximo en cada caso. En ese contexto, las regiones genómicas escaneadas fueron de tamaño variable y a excepción de *qDOR-10*, resultaron de un tamaño mayor al estimado por el IC (3 cM, 12 cM y 17 cM para *qDOR-10*, *qDOR-9* y *qDOR-5* respectivamente). Particularmente notable fue la heterogeneidad detectada en la densidad de genes comprendidos en los QTL, en relación a su tamaño genético (en cM) y a su tamaño físico (en pb). Según la integración de los mapas citogenético y físico para el genoma de sorgo granífero informada por Kim et al. (2005), *qDOR-10* estaría posicionado en una región de heterocromatina, mientras que *qDOR-5* y *qDOR-9*, corresponden a porciones de eucromatina en sus respectivos cromosomas. En ese sentido, Mace et al. (2009) informaron que la densidad media de genes en regiones de heterocromatina de sorgo, a lo largo de todos los cromosomas, es elevada (118.3 genes/cM), en comparación con las porciones de eucromatina (19.3 genes/cM); sin embargo, la relación genes/pb en zonas de heterocromatina de sorgo es baja. La baja frecuencia de eventos de recombinación que caracteriza a la heterocromatina provoca esta “contracción” de esas regiones y consecuentemente una elevada densidad de genes/cM, que no se condice con la relación genes/pb. En este contexto, en el marco de un programa de mejoramiento, resulta más relevante referirse a la distancia genética abarcada por un QTL que al tamaño físico (i.e. el mejorador está interesado en conocer qué posibilidad hay de que ocurra recombinación entre dos posiciones de un cromosoma). En ese caso, *qDOR-5* o *qDOR-9* presentaría un grado de complejidad menor en caso de querer incorporarlos a un programa de mejora para el carácter dormición (al posicionarse en regiones de eucromatina), mientras que *qDOR-10* implicaría mayores desafíos. En esa misma línea, el gran número de genes comprendidos a lo largo de los 3 QTL identificados y la elevada proporción de los mismos con funciones desconocidas, dificulta postular posibles candidatos a ser los responsables de esos loci. En todo caso, sí es posible sugerir que la identificación del gen responsable de *qDOR-10* seguramente será una tarea futura bastante más compleja que para los otros QTL identificados. Por otra parte, ninguno de los genes candidatos para dormición (del metabolismo de giberelinas o de la señalización del ABA) quedó incluido dentro de los QTL detectados, a pesar de que algunos como *SbABII*, quedaron ubicados muy próximos al intervalo de confianza de un QTL. Un resultado particularmente interesante fue el valor de LR alcanzado por el marcador *SbABI5* en el cromosoma 4 durante el análisis de MTM. Si bien en esta instancia la magnitud de LR no fue suficiente para superar el umbral de significancia, este resultado sugiere que en futuros análisis, la incorporación de nuevos ambientes, podría mejorar la prueba, y consecuentemente tal vez se logre detectar un QTL en esa posición. Rodríguez et al. (2009) observaron que la transcripción de genes involucrados en la señalización del ABA (entre ellos *ABI5*) se ve estimulada durante la incubación de granos inmaduros (30 DPA) en la línea IS9530 pero no en granos de RedlandB2, y un patrón similar se observó en granos maduros, cosechados a los 42 DPA (Rodríguez, 2008). Sin embargo en granos con un mayor grado de madurez (cosechados a los 47 DPA), las diferencias en la transcripción de estos genes desaparecieron, sugiriendo que la expresión diferencial de la dormición en este estado de

los granos dependería de otros componentes de la señalización del ABA (Rodríguez et al., 2009). Teniendo en cuenta que el fenotipo para dormición realizado en IG2 e IG3, en los que se identificaron los QTL, fue realizado en cariopses de fechas intermedias a las evaluadas por Rodríguez et al. (2009), a los 45 DPA, y considerando el impacto que tienen las condiciones ambientales particulares de cada región y año de cultivo sobre la expresión de la dormición, no se debería descartar la posibilidad de que *SbABI5* pueda explicar una proporción de la variabilidad observada en dormición. Resulta interesante además el hecho de haber encontrado un polimorfismo (InDel) en la secuencia de *SbABI5* entre las líneas parentales, para el cual si bien no es posible asignar *a priori* un significado fisiológico, podría estar implicado en las diferencias que se observan en dormición entre las líneas. Por otro lado, según resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2009), *SbABII* (regulador negativo de la señalización del ABA) no parece ser responsable de las diferencias en dormición que se evidencia entre las líneas IS9530 y RedlandB2, ya que la mayor expresión de *SbABII* en granos de IS9530 sería solo una consecuencia de la mayor actividad de señalización del ABA en este genotipo, actuando en un mecanismo de “feedforward negative regulatory loop”. Esta condición sugiere que la importancia de *SbABII* en la expresión de la dormición de sorgo, debe ser evaluada con cautela, al menos en el sistema IS9530/RedlandB2.

El conocimiento generado con respecto a la regulación de la dormición de sorgo granífero en los últimos años utilizando como sistema de estudio las líneas IS9530 y RedlandB2, permitió proponer genes candidatos a tener un rol durante ese proceso en granos inmaduros, estadio que resulta de particular interés debido a que es el momento en el que RedlandB2 comienza a perder su dormición precozmente, mientras IS9530 expresa una dormición persistente (Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2012). Sin embargo, aun no se han sugerido genes candidatos a tener un rol durante la expresión de la dormición en granos maduros, donde la dormición continúa expresándose en IS9530 aunque en menor magnitud. En este contexto, el hecho de no haber podido detectar QTL en granos inmaduros en el transcurso de esta tesis, imposibilitó realizar comparaciones entre las regiones del genoma que estarían regulando parte de la expresión de la dormición en granos maduros e inmaduros. Sin embargo, considerando que los QTL identificados para granos maduros (*qDOR-5*, *qDOR-9* y *qDOR-10*) incluyen genes para los cuales hasta el momento no se ha asignado un rol en dormición, se refuerza el concepto de que las bases genéticas que operan durante la expresión de este carácter en granos maduros podrían ser diferentes de las que se ponen en funcionamiento en granos inmaduros. Pero además, los resultados obtenidos muestran que genes hasta ahora candidatos para dormición en sorgo, podrían estar actuando aguas abajo de genes maestros o mayores, y en ese contexto los genes propuestos como candidatos podrían estar regulados diferencialmente en distintos genotipos. En línea con este resultado, Carrari et al. (2003) informaron que la posición de *Sbvp1* (*SbABI3*) no se correspondió con ninguno de los QTL para BPC de granos inmaduros identificados por Lijavetzky et al. (2000), sugiriendo que este gen participaría aguas abajo de otros genes mayores involucrados en el BPC y que estaría regulado diferencialmente en las líneas IS9530 y RedlandB2, tal cual lo habían demostraron los resultados de Carrari et al. (2001).

En este capítulo, se trató de demostrar el origen de una proporción de la variabilidad fenotípica total que se observa para dormición en granos de sorgo granífero. El hecho de haber detectado QTL que expliquen parte de esa variabilidad implica que existen polimorfismos en esas regiones para las líneas parentales (IS9530 y RedlandB2), que son los que generan en última instancia las diferencias observables en el fenotipo de granos maduros. El polimorfismo podría estar dado a nivel de la propia secuencia de los genes o podría provenir de variantes a nivel de las secuencias regulatorias de los mismos,

que a su vez podrían estar ubicadas en las cercanías de los propios genes (promotores) o en regiones más alejadas (“enhancers” o “silencers”). Identificar el origen del polimorfismo que subyace a cada QTL encontrado, es una tarea crucial a llevar a cabo como continuación de este trabajo, para lo cual en primer lugar se deberían corroborar los QTL identificados en poblaciones permanentes, como RILs (recombinant inbred lines), que permitan repetir el análisis en distintos ambientes. En ese caso se podrían incorporar otro tipo de marcadores como SNP (single nucleotide polymorphism), que ayuden a mejorar la cobertura del genoma. Aquellos QTL que resultaran consistentes podrían ser sometidos a un mapeo de alta resolución, a través del uso de poblaciones como NILs (near isogenic lines), con las que se logre acotar el tamaño de los QTL y facilitar la identificación de los polimorfismos responsables de una proporción de la variabilidad observable para dormición en cariopses maduros de sorgo granífero.

CAPITULO 3

Posible regulación del catabolismo de las giberelinas por el ABA durante la expresión de la dormición: ABI5 y ABI4 de sorgo se unen *in vitro* al promotor de un gen *GA2-oxidasa*

Cantoro R, Crocco CD, Benech-Arnold RL, Rodríguez MV. 2013. *In vitro* binding of *Sorghum bicolor* transcription factors ABI4 and ABI5 to a conserved region of a *GA 2-OXIDASE* promoter: possible role of this interaction in the expression of seed dormancy. *Journal of Experimental Botany*. 64(18), 5721–5735.

CAPITULO 3

Posible regulación del catabolismo de las giberelinas por el ABA durante la expresión de la dormición: ABI5 y ABI4 de sorgo se unen *in vitro* al promotor de un gen *GA2-oxidasa*

Resumen

En este capítulo se abordó en primer lugar el objetivo específico iii), que planteaba “*Evaluar la existencia de una interacción directa in vitro entre los factores de transcripción ABI4 y ABI5, tanto en forma individual como simultánea, y el promotor del gen que codifica para la GA2-OXIDASA3, responsable de la inactivación de GAs con actividad biológica en semillas de una línea de sorgo cuyos granos presentan una dormición persistente (IS9530)*”. Para ello se realizó un análisis del promotor de *SbGA2ox3*, seguido de ensayos de retardo en gel (EMSA). Se demostró que *SbABI4* y *SbABI5* (componentes de la señalización del ABA) interactúan *in vitro* con un fragmento del promotor de *SbGA2ox3* que contiene un “complejo de respuesta al ABA” o ABRC. Ambos factores de transcripción fueron capaces de unirse al promotor, pero no lo pudieron hacer de manera simultánea, sugiriendo que compiten por las mismas secuencias *cis*-regulatorias. Ensayos de retardo en gel realizados con sondas a las que se les mutaron elementos del ABRC, demuestran que posiblemente *SbABI4* y *SbABI5* tengan la capacidad de unirse a los mismos motivos ABRE y CE. Los resultados sugieren un mecanismo de *cross-talk* entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs, que contribuiría a explicar el mantenimiento de la dormición en granos de sorgo embebidos dormidos. En una segunda instancia de este capítulo, se abordó el objetivo específico iv), que planteaba “*evaluar si existe un mecanismo posible de regulación de la transcripción común a las GA2-OXIDASA3 de sorgo y GA2-OXIDASAS de otras especies que muestren similitud en su secuencia proteica (filogenia)*”. Para ello se llevó a cabo un análisis filogenético de *GA2oxidadasas* de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, seguido de un estudio comparativo de los promotores de esos genes *GA2oxidadasas*. Se observó que el ABRC detectado originalmente en el promotor de *SbGA2ox3* aparece representado en las regiones regulatorias de *GA2oxs* de monocotiledóneas que comparten una estructura proteica similar a *SbGA2ox3*. A partir de estos resultados se sugiere que el mecanismo de *cross-talk* entre la señalización del ABA y el metabolismo de GAs evidenciado para sorgo granífero, podría ser compartido por las monocotiledóneas *Brachypodium* y arroz

3.1. Introducción

Se encuentra ampliamente documentado que el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) cumplen un rol antagonico en el control de la germinación en especies que poseen dormición de tipo fisiológica (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008; Nambara et al., 2010). En ese sentido, durante la liberación de la dormición, los niveles de ABA o la sensibilidad al mismo disminuyen, mientras cobra importancia un aumento de la respuesta a las giberelinas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Es precisamente el balance ABA-GAs lo que finalmente determina la expresión de la dormición durante la imbibición de las semillas en muchas especies, incluidos los cereales (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008; Nambara et al., 2010). Los componentes del balance ABA-GAs fueron evaluados en granos de sorgo granífero con el fin de establecer el origen de la diferente dormición en las líneas IS9530 y RedlandB2 que presentan respuestas contrastantes al brotado pre-cosecha. Resultados previos con estas líneas muestran que el contenido de ABA de los embriones, medido durante la incubación de los granos, no está relacionado con su nivel de dormición (Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). Por el contrario, cambios en la sensibilidad de los embriones al ABA sí se correlacionan con el patrón de salida de la dormición de granos enteros durante el desarrollo, y con la diferente respuesta entre ambas líneas (Steinbach et al., 1995; Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). En concordancia con estos resultados, Carrari et al., (2001) mostraron que los niveles de transcriptos del gen de sorgo *VP1/ABI3* (regulador positivo de la señalización del ABA) se mantienen elevados durante la incubación de semillas inmaduras del genotipo IS9530, mientras que decrecen rápidamente a partir del tercer día de incubación en cariopses del genotipo RedlandB2. Unos años más tarde, Rodríguez et al. (2009) observaron que la transcripción de este mismo gen y otros genes de sorgo reguladores positivos de la señalización del ABA (*ABI3/VP1*, *ABI4*, *ABI5* y *PKAB1*) se induce durante la incubación de granos inmaduros dormidos de la línea resistente al BPC (IS9530), pero no en granos del genotipo con menos dormición y susceptible al BPC (RedlandB2). En particular, la expresión de los genes *SbABA-INSENSITIVE 4* (*SbABI4*) y *SbABA-INSENSITIVE 5* (*SbABI5*) se indujo fuertemente y de forma transitoria en los cariopses de IS9530 después de 2 o 3 días de incubación, y los niveles de la proteína *SbABI5* siguieron un patrón similar (Rodríguez et al., 2009). Por lo tanto, la señalización del ABA es un componente clave en la expresión de la dormición en granos de sorgo granífero, y la diferente sensibilidad al ABA observada en granos inmaduros de líneas con respuesta contrastante al BPC parece estar en parte asociada con una diferente abundancia de factores de transcripción como *SbVP1/ABI3*, *SbABI4* y *SbABI5*. La posible función de estos factores de transcripción en la señalización del ABA en la semilla surge de estudios previos con otras especies. Por ejemplo, el análisis de mutantes de *Arabidopsis* *aba-insensibles* (*abi*) reveló que aunque los factores de transcripción *ABI4* y *ABI5* no tienen un efecto sobre la inducción o la liberación de la dormición, tienen un rol fundamental en la inhibición de la germinación y en la maduración de las semillas, ambos procesos regulados por ABA (Brocard-Gifford et al., 2003; Penfield et al., 2006; Piskurewicz et al., 2008; Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). *ABI5* es un factor de transcripción de tipo “basic leucine zipper” (bZIP), conocido por estar involucrado en la regulación de la germinación en respuesta al ABA y al estrés (Finkelstein y Rock, 2002). El dominio “leucine zipper” de *ABI5* está involucrado en la dimerización de la proteína, evento necesario para que ocurra la unión al ADN. Por otro lado, *ABI4* es miembro de la familia de factores de

transcripción que poseen un dominio APETALA2. Se ha informado que el mutante de *Arabidopsis abi4* posee una expresión alterada de genes de respuesta al ABA que se expresan durante la maduración de la semilla, como el gen *Em6* (Finkelstein, 1994). Pero además, ABI4 está involucrado en la inhibición de la germinación mediada por ABA (Reeves et al., 2011).

Como se mencionó más arriba, no solo el ABA sino también las giberelinas tienen un rol importante en la expresión de la dormición en semillas durante la imbibición. En sorgo granífero, Benech-Arnold et al. (2000) observaron que la sensibilidad de los embriones a la GA₃ (medida como la capacidad de concentraciones crecientes de GA₃ para revertir la inhibición de la germinación causada por una solución de ABA 50 μM) no estaba relacionada con los niveles contrastantes de dormición que exhibían las líneas de sorgo IS9530 y RedlandB2. Sin embargo, al evaluar posibles diferencias en los niveles de giberelinas en granos embebidos de ambas líneas, se observó un aumento en los niveles de GA₄ en embriones de la línea RedlandB2 unas 24 h antes de la emergencia de la radícula, mientras que los niveles de GA₄ permanecieron bajos en IS9530, que exhibió mayores niveles de dormición. El contenido de GA₄ en embriones se incrementaba y alcanzaba un valor significativamente mayor después de un período de 4 días de incubación en la línea con baja dormición RedlandB2, comparada con la de mayor dormición IS9530, y este incremento comenzaba al menos unas 24 hs antes de que emergiera la radícula (Perez-Flores et al., 2003; Rodríguez et al., 2012). Estos resultados permitieron sugerir que es precisamente durante este estadio de inmadurez de los granos (i.e. antes de que alcancen la madurez fisiológica) que la síntesis de giberelinas *de novo* contribuye a la germinación de semillas RedlandB2.

Es conocido que los niveles de GAs son regulados a través de la transcripción de genes que codifican para diferentes enzimas involucradas en su metabolismo (Hedden y Phillips, 2000). Un trabajo realizado por Rodríguez et al. (2012) en donde se analizó la transcripción de varios genes de sorgo que codifican para enzimas de síntesis de giberelinas (*SbEKO*, *SbEKAH*, *SbGA20ox2*, *SbGA20ox3* y *SbGA3ox1*), mostró un aumento temprano de estos transcritos en granos dormidos (IS9530) durante los primeros 2 o 3 días de imbibición de las semillas, comparado con el genotipo de menor dormición (RedlandB2), y disminuyó luego. Este resultado parecía estar en contradicción con los cambios en los niveles de GA₄ en ambas líneas. Sin embargo, esta activación de genes de síntesis de giberelinas en IS9530 estaba acompañada por una evidente promoción de los genes de inactivación de giberelinas *SbGA2ox1* y *SbGA2ox3*. Esta observación, junto con la asociación negativa entre los niveles de la giberelina activa GA₄ y su correspondiente catabolito GA₃₄, respaldaron la idea de que la GA₄ es mantenida en un nivel bajo en granos de IS9530 como resultado de una actividad catabólica prominente, mediada por la acción de GA2-oxidases, que no es evidente en embriones de RedlandB2. Por otro lado, en este mismo trabajo de Rodríguez et al. (2012) se observó que la incubación de granos dormidos en 100 μM GA₃ promovió la germinación pero no redujo la expresión de la mayoría de los genes de síntesis de giberelinas. Este resultado descartó la posibilidad de que la regulación de los niveles de giberelinas estuviera dada por un mecanismo de feedback negativo impulsado por las propias giberelinas. Pero además se observó que la expresión de los genes de sorgo *GA2ox1* y *GA2ox3* era regulada negativamente por GA₃ aplicada exógenamente, de manera contraria a otros resultados reportados en *Arabidopsis* que mostraron un mecanismo de feed-forward en donde la expresión de genes de GA2ox se ve afectada por los niveles de GAs activas (Ogawa et al., 2003; Rieu et al., 2008).

La coincidencia temporal de los patrones de expresión de *SbABI4*, *SbABI5* (junto con la abundancia de la proteína SbABI5) y genes de *SbGA2oxidases*, en paralelo a la

deficiencia de GA₄ y la ausencia de germinación, sugirió que la señalización del ABA podría estar regulando la expresión de *SbGA2ox1* y *SbGA2ox3* en granos dormidos de IS9530; Figura 3.1; (Rodríguez et al., 2012; 2009). Hasta hace muy poco tiempo, no se habían propuesto evidencias de interacciones entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs. El primer trabajo en esa dirección fue publicado recientemente por Lee et al. (2012), quienes observaron que AtABI5 es capaz de unirse *in vivo* a los promotores de *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2* y reprimir su expresión durante el bloqueo de la germinación dependiente de la luz via el fitocromo B (phyB) en Arabidopsis. A pesar de estos avances, hasta el momento no se ha propuesto un mecanismo de *cross-talk* entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs durante la expresión de la dormición en especies de importancia agronómica, como el sorgo granífero. En este sentido, un análisis *in silico* de la region 5' regulatoria de *SbGA2ox3* realizado por Rodríguez et al. (2012) puso en evidencia la presencia de varios elementos *cis*-regulatorios relacionados con la señalización del ABA y las GAs. En particular, se identificaron elementos como los RY *repeat*, CE y ABRE localizados cerca de la TATA box y con una configuración espacial similar a la que ha sido previamente descrita como necesaria para la inducción de promotores por ABA (Himmelbach et al., 2003; Shen et al., 2004). Particularmente, el núcleo ACGT (ABRE) y el "coupling element" (CE) conforman lo que se conoce como ABRC (ABA response complex), presente en los promotores de los genes inducidos por ABA (Shen y Ho, 1995; Shen et al., 1996).

Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que el gen de inactivación de GAs, *SbGA2ox3*, pudiera estar siendo regulado por algún factor de la vía de señalización del ABA en granos de sorgo inmaduros dormidos. En este sentido, considerando la sincronía de los perfiles de expresión de los genes *SbABI4*, *SbABI5* y *SbGA2ox3*, los patrones de acumulación de la proteína SbABI5 y de GA₄ (activa) y de GA₃₄ (catabolito) durante la incubación de granos de sorgo dormidos, junto con la identificación de un posible ABRC localizado en el promotor de *SbGA2ox3*, el objetivo de este capítulo de la tesis fue testear *in vitro* la posibilidad de una interacción entre las proteínas ABI4 y ABI5 y la región 5' regulatoria de *SbGA2ox3* y evaluar si existe un mecanismo posible de regulación de la transcripción común a las GA2-OXIDASA3 de sorgo y GA2-OXIDASAS de otras especies que muestren similitud en su secuencia proteica.

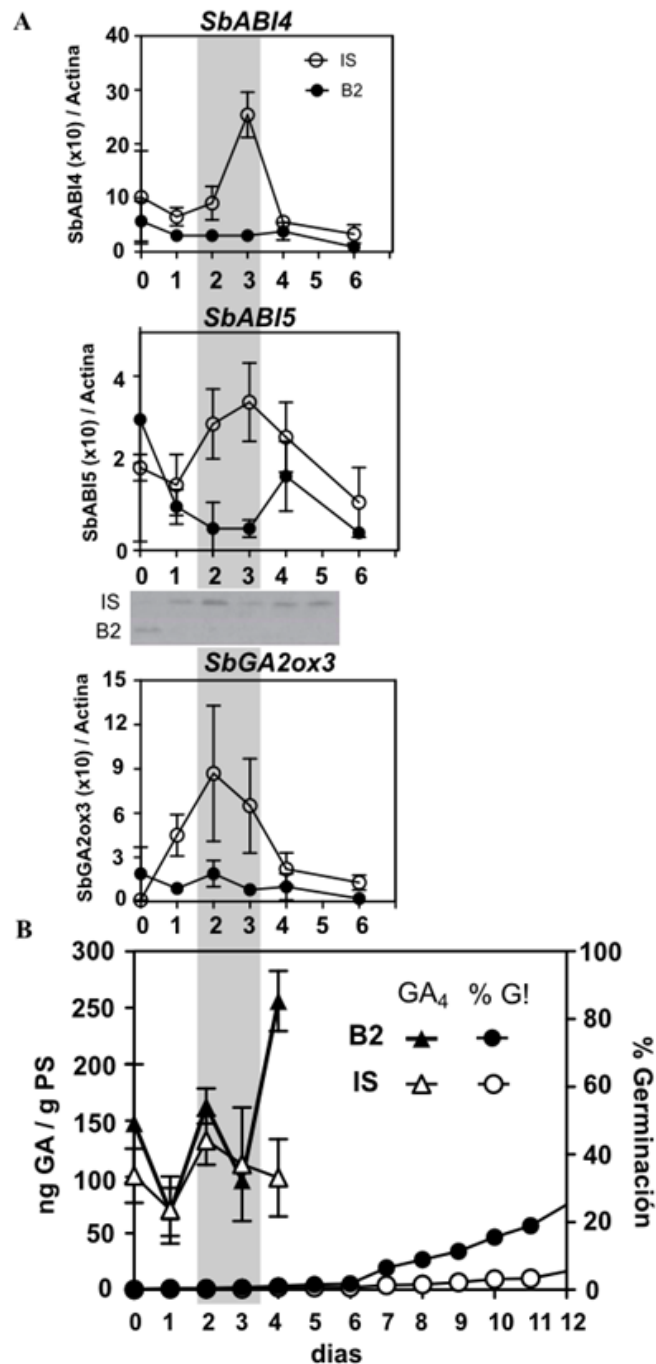


Figura 3.1. Coordinación temporal entre elementos de la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs, en granos de sorgo incubados. A, Nivel de transcritos de los genes *SbABI4*, *SbABI5* y *SbGA2ox3* en embriones, durante la incubación de granos inmaduros a 20°C de RedlandB2 (símbolos llenos) e IS9530 (símbolos vacíos). Las barras indican el error estándar de la media. Debajo de *SbABI5* se muestra la acumulación de proteína *SbABI5* (detectada por western blot) durante la incubación de los granos, para ambas líneas. B, Evolución del porcentaje de germinación (círculos) y el contenido de GA₄ en embriones (triángulos) durante la incubación de semillas inmaduras a 20°C de RedlandB2 (símbolos llenos) e IS9530 (símbolos vacíos). La franja gris indica la coincidencia temporal para todos los componentes. Resultados tomados de Rodríguez et al. (2012; 2009).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Análisis *in silico* de la región promotora del gen *SbGA2ox3*

Se utilizó el código de identificación del gen *SbGA2ox3* (Sb03g035000) en la base de datos Phytozome para localizar una secuencia genómica que abarcara 2 kpb río arriba del sitio de inicio de la transducción (ATG) de *SbGA2ox3*. Esa región de 2 kpb fue considerada la porción 5´regulatoria del gen o promotor, ya que no se detectaron intrones río arriba del ATG de *SbGA2ox3*. La secuencia fue escaneada para detectar la presencia de elementos *cis*-regulatorios putativos en la base de datos PLACE (Plant *cis*-acting regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

3.2.2. Ensayos de retardo en gel o Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)

La técnica de EMSA se basa en una corrida electroforética de un fragmento de DNA marcado y una proteína. La forma más simple de EMSA consiste en correr un gel de poliacrilamida en donde la primer calle contiene sólo el fragmento de DNA de interés marcado y la segunda calle tiene el mismo DNA con el agregado de una proteína. Si la proteína interacciona con el fragmento de DNA, se formará un complejo que recorrerá menos distancia a través del gel en el mismo tiempo que el DNA solo (calle 1), y ello es indicativo de que la proteína en cuestión tiene afinidad por la sonda de DNA. Sin embargo, para poder afirmar esto último y demostrar la especificidad de la unión ADN-proteína, se hacen necesarios ensayos con distintas variantes, además de controles positivos y negativos. En este caso, para poder llevar a cabo los ensayos de retardo en gel, se obtuvieron en primer lugar las proteínas SbABI4 y SbABI5 expresadas y purificadas, y el fragmento del promotor de *SbGA2ox3* de interés con el agregado de una marca que permitiera su detección. Además se obtuvieron sondas competidoras (específica y no específica), así como también una sonda que serviría como control positivo y un extracto proteico total de *E. coli* que se utilizó como control negativo. A continuación se detalla cada uno de estos pasos, para finalmente concluir con la descripción de los EMSA.

3.2.3. Material vegetal, extracción de RNA y clonado de SbABI4 y SbABI5

La línea endocriada de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] IS9530 se sembró en el Instituto de investigaciones fisiológicas y ecológicas vinculadas a la agronomía (IFEVA), ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Para cada planta se registró la fecha de antesis y transcurridos 30 días post-antesis, se colectaron semillas de 8 plantas con similar fecha de antesis, las cuales fueron agrupadas en una única muestra e incubadas en placas de Petri con 6 ml de agua destilada a 25°C. Al cabo de 1,2 o 3 días de incubación de los granos, se disectaron los embriones con ayuda de un bisturí y se los congeló en N₂ líquido. Se molieron muestras de 30-45 embriones (70-100 mg) en mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino y luego se le agregaron 600 ul de buffer de extracción RA1, incluido en el kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel, Germany). A continuación se agregó PVP-40 (Sigma) en una concentración final de 1% (p/v) y luego de 5 minutos de centrifugación, el sobrenadante fue utilizado para extraer ARN de acuerdo a las instrucciones del manual del kit. A partir de las muestras de ARN resultantes se hizo una transcripción reversa, mediante el uso de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y de las muestras de cDNA obtenidas se tomaron alícuotas para confeccionar una única muestra de

cDNA que fue utilizado como templado o molde en las siguientes reacciones de PCR. Los cDNA correspondientes a *SbABI4* y *SbABI5* fueron clonados por PCR utilizando primers con el agregado de sitios de corte para enzimas de restricción, y como templado el pool de cDNA. Los primers que se diseñaron fueron: *SbABI4*, ACGGGATCCGAACCCAACAACAATCAG (Fw con sitio de corte para BamHI) y GCGCTCGAGCTTGAGGAAGACATCAAACC (Rev con sitio de corte para XhoI); *SbABI5*, GAGAGGATCCAATTTCCCGGGAGGAAGCG (Fw con sitio de corte para BamHI) y GAGACTCGAGCCACGGACCTGTCAATGTC con sitio de corte para XhoI). Los productos de PCR resultantes fueron purificados con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany). La incorporación de sitios de corte para enzimas de restricción tuvo como objetivo poder insertar y liberar los amplicones (productos de PCR) fácilmente de los plásmidos que se usaron a continuación.

3.2.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes *SbABI4* y *SbABI5*

Los productos de PCR purificados, correspondientes a *SbABI4* y *SbABI5* se ligaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y con dicha ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes, siguiendo el protocolo del manual del vector. A partir de las colonias obtenidas, se identificaron aquellas positivas a través de colony-PCR y se prepararon cultivos líquidos para obtener un elevado número de copias de plásmido. Los cultivos líquidos crecieron a 37°C y al cabo de 16 hs se centrifugaron. El pellet resultante fue utilizado para purificar los plásmidos utilizando el kit Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification Systems (Promega). Las minipreps (plásmidos purificados) obtenidas fueron enviadas para su secuenciación y de esta manera se confirmó la identidad de las secuencias. Una alícuota de cada miniprep fue digerida con las enzimas BamHI y XhoI y el producto liberado se purificó y subclonó en el vector de expresión pET24a, que contiene un tag de Histidina C-terminal. Con estos nuevos plásmidos recombinantes se transformaron bacterias *E. coli* Rossetta pLys competentes. Se crecieron colonias positivas en medio LB con el agregado de kanamicina y cloranfenicol, durante 16 hs a 37°C. Este cultivo fue utilizado para inocular 1 Lt de LB fresco por cada plásmido recombinante (pET24a-*SbABI4* y pET24a-*SbABI5*), utilizando una dilución 1/100 (inóculo/LB fresco). Los cultivos resultantes se dejaron crecer hasta que alcanzaron un OD₆₀₀= 0.6 - 0.7 y a partir de ese momento fueron inducidos con 0.05 mM IPTG, a 20°C, durante 16 hs. Transcurrido ese lapso de tiempo, se centrifugaron los cultivos, y el pellet resultante fue sonificado en buffer de lisis (Tris HCl 25 mM pH7.4, NaCl 300 mM y imidazol 30 mM) e incorporado a una columna His GraviTrap (GE Healthcare). Estas columnas permiten la purificación por cromatografía de afinidad, ya que poseen iones Ni⁺² a los cuales se une la Histidina que traen incorporadas las proteínas recombinantes. La elución de las proteínas *SbABI4*-6His y *SbABI5*-6His se realizó con un buffer de elución que contenía Tris HCl 25mM, NaCl 300 mM y imidazol 350 mM, de acuerdo a las instrucciones del kit. Las proteínas purificadas se cuantificaron por espectrofotómetro mediante el método de Bradford y fueron guardadas a -80°C con el agregado de sacarosa 5% y 2-mercaptoetanol 3mM. El agregado de un agente reductor (2-mercaptoetanol) se realizó para evitar la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en las proteínas purificadas (2 residuos en *SbABI4*-6His y 3 residuos en *SbABI5*-6His) y así impedir la oligomerización de las cadenas polipeptídicas.

3.2.5. Obtención de extracto proteico total de *E. coli* (control negativo)

Para demostrar que los retardos observados no se debían a la unión de proteínas bacterianas a la sonda (y que solo se deben a la unión de las proteínas SbABI4 y SBABI5 de manera específica) se realizó un cultivo de LB líquido en donde se crecieron bacterias *E. coli* transformadas con el vector pET24a sin inserto (vacío). El cultivo fue tratado de la misma manera que los cultivos para expresión de las proteínas ABI4 y ABI5, obteniéndose finalmente un pellet bacteriano, del cual se realizó una extracción de proteínas totales con el mismo buffer de lisis. Estas muestras se cuantificaron por espectrofotometría (método de Bradford) y se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.6. Construcción de la sonda de *SbGA2ox3*

La sonda del promotor de *SbGA2ox3* fue obtenida por PCR con un primer forward biotinilado en su extremo 5' (5'BIOT GGGCGCCGTGGGAAAAGTGG 3') y un primer reverso no biotinilado (5'GGGCGGCACCTGGCTGGATG 3'), utilizando DNA genómico de la línea de sorgo IS9530 como templado de la reacción. El producto resultante (tamaño: 242 pb) se purificó con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel), se cuantificó en gel de agarosa con la referencia del MassRuller DNA Ladder (Fermentas) y fue guardado a 20°C.

3.2.7. Obtención de las sonda competidoras (específica y no específica), sondas mutadas y sonda control

La sonda competidora específica se obtuvo por PCR con el mismo par de primers y templado utilizados para la sonda biotinilada convencional, pero esta vez el primer Fw no estuvo biotinilado en su extremo 5'. En el caso de la sonda competidora inespecífica, la misma consistió en un fragmento de 240 pb del gen *SbGAMyb*, amplificado a partir de ADN genómico de sorgo. Como sonda control positivo se utilizó un fragmento del promotor de *AtEm6* (186 pb), que se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de *Arabidopsis* como templado con los siguientes primers: 5'BIOT AGTTAAAGAACACGCGGCGA 3' y 5'TCAATCCGGAGGGCGTTTTGG3'.

Por otro lado se obtuvo una sonda alternativa biotinilada de menor tamaño para el promotor de *SbGA2ox3* y variantes de esta misma sonda con mutaciones puntuales, mediante la combinación del mismo primer 5' (5'BIOT GGGCGCCGTGGGAAAAGTGG 3') con los siguientes reversos no biotinilados: 5'GGGCGCGACGTGTCCGGACGCG 3' (amplicón de 131 bp, ABRE y CE intactos); 5'GGGCGCGAATTGTCCGGACGCG 3' (amplicón de 131 bp, ABRE mutado) y 5'ACGCGATCCACCGGAAGCAGG 3' (amplicón de 114 bp, CE mutado y sin el ABRE incluido). Todas las sondas se purificaron con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel) y se cuantificaron en gel con la referencia del MassRuller DNA Ladder (Fermentas). Las secuencias completas de todas las sondas se encuentran incluidas en la Tabla suplementaria 3.1.

3.2.8. Ensayos de retardo en gel

Para llevar a cabo los ensayos de retardo en gel, se prepararon reacciones de binding con un buffer apropiado (EDTA 0.5mM, MgCl₂ 3 mM, 2-mercaptoetanol 14mM, glicerol 10% v/v, NP-40 0.05% v/v, BSA 10 µg/ml, Tris HCl pH 7.4 25mM,

DTT 1 mM y KCl 30 mM) y el agregado de ADN de esperma de salmón 50 µg/ml, 40 ng de sonda biotinilada, concentraciones variables de proteínas recombinantes purificadas SbABI4 o SbABI5 y fragmentos competidores específicos o inespecíficos (en concentraciones 5x, 10x o 20x). Las incubaciones se realizaron por 30 mins a temperatura ambiente y se sembraron en un gel de poliacrilamida (29:1 acrilamida:bisacrilamida) al 8% (para los ensayos con SbABI4) o 6% (para los ensayos con SbABI5). Para el caso de los ensayos de competencia específica (*SbGA2ox3*) e inespecífica (*SbGAMyb*), las proteínas se incubaron con las sondas competidoras por 10 min, transcurrido ese tiempo se incorporó la sonda biotinilada y se continuó con la incubación por 20 min adicionales. Para los ensayos controles con proteína inespecífica, las reacciones se incubaron durante 30 min. En todos los casos, los geles fueron sometidos a electroforesis a 120V en buffer 0.5X TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA) y una vez finalizada la corrida, fueron transferidos a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N⁺), aplicando una corriente de 100V por 50 min. Las membranas fueron bloqueadas con TTBS 1X (Buffer tris-salino con Tween 20) adicionado con 5% de leche descremada durante 2 hs y luego se incubaron durante una 16 hs con el anticuerpo correspondiente: estreptavidina-HRP (High Sensitivity Streptavidin HRP Conjugate, Thermo). Las membranas se lavaron 3 veces con TTBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo y proceder a la detección. La detección de la señal se realizó con el sustrato para ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron las membranas a una autoradiografía (CL-X Posure Film, Thermo) durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el revelado con soluciones de revelado, detención y fijación. Las concentraciones de proteína a utilizar en las reacciones de “binding” fueron puestas a punto previamente, utilizando para ello distintas concentraciones de proteína (10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM y 800 nM) y evaluando a partir de que concentración se comenzaban a visualizar retardos.

3.2.9. Identificación de secuencias de GA2ox y análisis filogenético

Se utilizaron las secuencias completas de aminoácidos de GA2oxidasas de *Arabidopsis thaliana* (AtGA2ox), *Oryza sativa* (OsGA2ox), *Sorghum bicolor* (SbGA2ox) y *Zea mays* (ZmGA2ox) previamente descritas por Rodríguez et al. (2012). Con el objetivo de expandir la familia de GA2ox, se escaneó la base de datos de nucleótidos y proteínas de KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) de otras especies con genomas completamente secuenciados y se identificaron sus GA2ox's: *Medicago truncatula* (MtGA2ox), *Vitis vinifera* (VvGA2ox), *Populus trichocarpa* (PtGA2ox) y *Brachypodium distachyon* (BdGA2ox). Los códigos de identificación de las secuencias se encuentran listadas en la Tabla suplementaria 3.2. Con estas secuencias de aminoácidos se completó un set de proteínas GA2ox representadas en 4 especies monocotiledóneas y 4 dicotiledóneas. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas se realizó en ClustalW (Thompson et al., 1997) usando el seteo estandar (Gonnet weight matrix, gap opening=10 y gap extension=0.2) y se ajustó mediante inspección visual. Con las secuencias completas alineadas se realizó un análisis filogenético bayesiano mediante el uso de MrBayes v. 3.1.2, seteando un algoritmo MCMC (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se realizaron dos corridas independientes para 1.500.000 generaciones (Figura suplementaria 3.2). Utilizando otros métodos alternativos (neighbor-joining y máxima parsimonia), se obtuvieron árboles con una topología similar (información no mostrada). Todos los árboles se visualizaron usando el programa MEGA 5.01 (Tamura et al., 2011). A partir del árbol obtenido, únicamente se seleccionó el grupo que incluyó la SbGA2ox3 (I) y se lo dividió en los subgrupos D,

M1, M2 y M3 para los análisis siguientes. Se identificó un fragmento de 2Kpb río arriba del ATG para cada gen como la región regulatoria putativa (promotor). El promotor de *SbGA2ox4* no se incluyó en la búsqueda porque la proteína hipotética *SbGA2ox4* mostró estar truncada y posiblemente no ser funcional. A continuación se realizó un análisis comparativo utilizando las secuencias de promotores de 2 Kpb dentro de cada uno de los subgrupos (D, M1, M2 y M3) utilizando la herramienta EARS (<http://wsbc.warwick.ac.uk/ears/help.php>). El programa EARS fracciona las secuencias en secuencias pequeñas (ventanas) y lleva a cabo un alineamiento global entre cada par de ventanas posibles, permitiendo la detección de secuencias conservadas. Se realizaron 4 corridas independientes con EARS, comparando el promotor de *SbGA2ox3* con los promotores de las GA2oxs de los subgrupos D, M1, M2 y M3 respectivamente. Para todas las corridas, se utilizó un tamaño de ventana de 60 pb y un p valor límite de 0.0001. Se analizó el archivo de resultados del EARS para cada corrida y, en el caso del subgrupo M3, se estableció la ubicación de los picos significativos identificados (1 y 2) dentro del promotor de *SbGA2ox3* y de los promotores de las GA2oxs incluidas en M3. Finalmente, se utilizó el software MEME (Bailey et al., 2009) para identificar los motivos conservados representados en las secuencias correspondientes a los picos 1 y 2 de los promotores de *BdGA2ox5*, *BdGA2ox8*, *OsGA2ox3*, *OsGA2ox4* y *SbGA2ox3* (miembros del subgrupo M3).

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis *in silico* de la región regulatoria del gen *SbGA2ox3*

En un trabajo previo (Rodríguez, 2008; Rodríguez et al., 2012), se analizó una secuencia que abarcaba las primeras 557 pb río arriba del inicio de la transcripción (ATG) del gen *SbGA2ox3*, y se identificaron varias secuencias *cis*-regulatorias relacionadas a la señalización por ABA. Con el objetivo de profundizar este análisis se evaluó el contexto genómico para *SbGA2ox3* (Figura suplementaria 3.1), pudiendo observarse que el gen más próximo a *SbGA2ox3* tenía la misma polaridad que este último y el final de su secuencia se encontró a una distancia de 10.052 pb con respecto al ATG de *SbGA2ox3*. Teniendo en cuenta además que *SbGA2ox3* no posee intrones aguas arriba de su ATG, y que numerosos autores han informado sobre la regularidad con la que se identifican elementos regulatorios ubicados entre 2 y 3 Kpb río arriba del ATG (Kim et al., 2007; Oh et al., 2007; Lee et al., 2012), se clonó y secuenció un fragmento de DNA genómico de 2 kpb río arriba del ATG de *SbGA2ox3* (considerada la región 5' regulatoria putativa o promotor) para los genotipos resistente a BPC (IS9530) y susceptible a BPC (RedlandB2). Para evaluar la posibilidad de una composición diferencial en la secuencia regulatoria de IS9530 y RedlandB2, se analizaron ambas secuencias en la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements), que permitió identificar elementos *cis*-regulatorios. Dentro de los 2 Kpb del promotor de *SbGA2ox3* analizados, se encontraron numerosas secuencias regulatorias, incluyendo elementos vinculados a la señalización del ABA y las GA: ABRE (ABA Response Element), CE (Coupling Element), DRE (Drought Response Element), RY repeat, MYB, E-box/MYC y GA-down (similar al ABRE), observándose la mayor densidad de estas secuencias dentro de las primeras 1000 pb río arriba del ATG (Figura 3.2). Dentro de los elementos de respuesta al ABA, se identificaron los motivos ABRE, CE1 y DRE en las posiciones -194, -218 y -225 bp río arriba del TATA-box respectivamente. Otros autores informaron que esta sucesión particular de elementos regulatorios se encuentra en promotores de genes regulados por ABA (Himmelbach et al., 2003; Shen et al.,

2004) y este conjunto de elementos en el promotor de *SbGA2ox3* podría ser considerado un “Complejo de Respuesta al ABA” o ABRC (ABA Response Complex). Por otro lado, en la región analizada se encontraron varios elementos RY y E-box/MYC, que aparecen frecuentemente en genes que tienen expresión específica en semillas (Stalberg et al., 1996; Ezcurra et al., 1999; Kim et al., 2007). En particular, uno de los elementos RY, ubicado en la posición -244 río arriba del TATA-box y próximo al ABRC, sugiere que la regulación de *SbGA2ox3* por ABA sería específica de la semilla. Estos hallazgos están en concordancia con varios estudios que muestran que los elementos que confieren expresión específica en semillas aparecen en la región proximal del promotor, generalmente dentro de las 500 pb río arriba del inicio de la transcripción (Wu et al., 2000; Chandrasekharan et al., 2003).

```

-2000 AATCTCCACATCTGACGACCTAGTACTATATAATTACAGGGATGTCAGATGTCTAATGCGTTGCCGGTCTATAGCTAGTCTCAGCAAAA
      E-box/MYC                               E-box/MYC
-1906 ATGGTCAGATCTACTACTCTAATCTAATCTAGTCTAATCTCTTGGGAACACGGTCAATGTTGCATGACCAGGCGGTGAGCCTCTGCAC
      RY
-1812 CATTGGAATATCAGAGGAAGGCACACAGTTCGCCGGATCAGAATGTCTGTGCGCTGGGCTGGGCATGCCGATGCCGTGCGCACCAGGTATGCA
-1719 TTTCTGGCAGGTGCGCAATACAATACTGCACATAGTACTACGTACAGTACTGCCGTACAGCTGCGGAACTTGTTTATTCTGTCCTAGTACGCGG
      E-box/MYC
-1633 GTACGGAAATGTTTACTGGAAAGGTGTCTGAAACATGAGAAAGCTTTGACTAGGGTGGACTTGTTTATGGCATCGAAAGCAGCGAGTTGCCCC
-1532 AACTGGCGAGCCACCATTGCGTGGCCGAGATTACTACTGCCGAATTACTACGTGGCCTGGGAAAAATGTCGGCAGGAGCGCGCGCTG
      E-box/MYC/MYB                               ABRE
-1440 CTCGTCTGCGGTTTCTATGTGCCGATGCGATCGGATCGGATCGGATCGGATCGGATCGGAAACACGCGAGGGCGGGACGACGACCACAGGAGCGA
-1348 GCAGTAGTCTCACCAAGTCAACAGGCTGCATGGGCATGGCCGCGAGCAGGGCTGGACCGTGTCAATCCATCGAGCCGCTATTATTGGTTT
      RY
-1255 CACACAGCATTGCTTCACGGTCCCAATGCCACGCCTAGCCTAAGCGAGATCAACTAGGCCCAGCTGAAACTACGAGAGATGCGCTGTGGGC
      E-box/MYC
-1163 AAGACTGGTGGAGCGAGTCTATCAGCTGTAAACGATATTTGATTTTTTTTTTACTATGATCCTTACCCGCTCCTCTGATGTTATCACTC
      E-box/MYC
-1067 GCCCATTGGTTTTACCCGGCCACCTAGAAATCACCTCGTCATGCTTATCTGGTTCAGAGCGTCACAAACAGTCACACATGAGCCTTCACAGCA
      MYB                               E-box/MYC
-974 TGGACGGCTATGGAGTTCGAGTCCGTGGACTTAACGGAGCAGCACGTACTGTGGGGACCCGATCGAGCCGGAGAGCCACCACACATAAACC
      MYB                               ABRE                               MYB
-883 GCCTTTTTTCCGACGACACAGCCGCTAATTCGGGGCGGGTGCCTTCAACGCCGATCTCTTGGTTTCGCGGGAGAATAATTTAGCGAGAC
      MYB
-790 ACGGGAACGGGTCGTGAGGAAGGAAAGCCTGACAGCATCACGGCCGGTCCGTTCCGACCCAGGCATGGCAGTTATGATGATCCGAGTC
      MYB                               MYB
-699 ACCGACTGCCAGAAAGGATACCGGATCAAGGGCAGGTTTCATCTCATCTTTAGGTCTTCCTAACCAAACATCATCTTCACTGTCTCACGTA
      DRE                               MYB                               MYB                               ABRE
-606 GTACGACTCTTATCTGATCCGCTCATGTCTGCCCTGATCAGAGCGTCCCGGTGCCGGCTTGGTTAACGGGAGGGAGGGAGGGACTGGGA
      MYB/MYB
-514 GCTAGGGCCGGCGCCGTGGGAAACTGCTATTGGCCGGCGTGCCATCGCCTCGTATCGTATGCGTCTCCCATGGAGCCATGCATGCAGCGCG
      RY
-421 GCGGGCCGACTTGCCACCGGTGGATCGCGTCCGGACCAGTGCGCGCCCCGACCCGACTGCCCTGGCTCCATCGGCACCGTGCACCCAAA
      DRE                               CE1                               ABRE
-331 GCGATCCACCCCGATGATCCTTTTCGTCTCCCTGTCAGTGGTCCATCCAGCCAGGTGCCGCTCGTCCCTTCTCGTTCGCTCCGGG
      E-box/MYC                               E-box/MYC
-238 CGGGGCTCTCCCTCGTCTGTCGCCCGCACAGGCTTGAGACGATCTATATATACGCCCCACGAGCTCTCCAGTCTTCCCCCACATGCACT
      TATA box                               MYC/RY/MYC
-145 TGTCGAGCAACCGTAGTACACAAGCACACACCACCTCGTCTCCACTCCCTGTTCTCAGCGTGTGGCCCTGTTTCGACCTCCTGTGCTCA
      MYB
-55 TCCGCCTCCCTCGCCGCCACGCCACCCTAGTACAGGCCGGCAGACAGCCATG
      +1 Met

```

Figura 3.2. Secuencia de la región 5' regulatoria putativa para *SbGA2ox3* que comprende 2000 bp río arriba del ATG (+1 Met). La numeración es relativa a la primer base de la metionina de inicio. Los motivos potenciales de regulación transcripcional ABRE, CE, DRE, RY, MYB y E-box/MYC están subrayados y nombrados debajo. El fragmento de 242 pb biotinilado que se utilizó como sonda en los ensayos de retardo en gel (EMSA) está resaltado en gris.

El análisis completo de la región 5' regulatoria permitió definir una región dentro del promotor como secuencia candidata a ser reconocida y unida por SbABI4 y SbABI5. De acuerdo a análisis realizado, la región ubicada entre -505 y -263 pb con respecto al ATG, contiene un ABRC putativo (ABRE y CE1), posible blanco de ambos factores de transcripción (ABI4 y ABI5). Por este motivo, esta fue precisamente la

región que se decidió utilizar en primer lugar como sonda para los ensayos de retardo en gel (Figura 3.2).

Cuando se compararon las secuencias de los promotores de *SbGA2ox3* en ambas líneas (IS9530 y RedlandB2), aparecieron algunas mutaciones puntuales dentro de los 2 kpb, pero solo una base fue diferente dentro de la secuencia -505 a -236 (región de la sonda), y eso no afectó ninguno de los elementos del ABRC (Figura suplementaria. 3.3). Considerando los elementos *cis*-regulatorios involucrados en la señalización por ABA, no se encontraron diferencias en la región promotora de *SbGA2ox3* entre las líneas, que podrían estar relacionadas a la expresión contrastante de este gen.

3.3.2. SbABI4 y SbABI5 se unen al promotor de *SbGA2ox3* *in vitro*

Para poner a prueba si SbABI4 y AbABI5 se podían unir al promotor del gen *SbGA2ox3* que contenía el ABRC putativo, se clonaron los fragmentos de cDNA correspondientes del genotipo IS9530 y se expresaron ambas proteínas con un tag C-terminal de histidina (6His-tag). La habilidad de las proteínas recombinantes de unirse a la región promotora de *SbGA2ox3* fue analizada por ensayos de retardo en gel, utilizando la porción -505 a -263 pb como sonda biotinilada. La incubación de esta sonda con 0.225 µg de proteína recombinante SbABI4 dió lugar a la formación de dos complejos, indicando la presencia de dos sitios de unión para ABI4 en la sonda de *SbGA2ox3* (Figura 3.3A). Se obtuvieron resultados similares cuando se incubó la sonda con SbABI5 purificada: se observaron 2 bandas que migraron de forma lenta y retrasada usando 0.375 µg de proteína, indicando que el factor de transcripción se podía unir a la sonda en dos sitios (Figura 3.3B). En ambos casos, el complejo que migró más lentamente (I) puede tratarse del factor de transcripción uniéndose a ambos elementos *cis*-regulatorios de forma simultánea, y el complejo II, de migración más rápida es el producto de la proteína uniéndose a un único sitio (independientemente de cual sea). Para ambos factores de transcripción SbABI4 y SbABI5, el complejo I (doble unión a la sonda) mostró una señal más fuerte que la que evidenció el complejo II con todas las concentraciones de proteína, indicando un efecto sinérgico entre ambos elementos *cis*-regulatorios; ello podría explicar la menor probabilidad de la forma de unión a un único sitio en la sonda. Cuando se compararon los resultados de los ensayos para ABI4 y ABI5, la cantidad de proteína que condujo a la formación de ambos complejos en cada uno de los casos fue diferente. En este sentido, se necesitó una cantidad de casi el doble de ng de proteína SbABI5 recombinante para detectar los complejos retardados, en comparación con la cantidad de SbABI4. Esto puede ser explicado en parte por el hecho de que la forma funcional de SbABI5 es un dímero mientras que SbABI4 actúa como monómero. Debido a esto, para obtener un mismo número de unidades funcionales para la unión al ADN, se requeriría el doble de proteína rABI5 en comparación con rABI4.

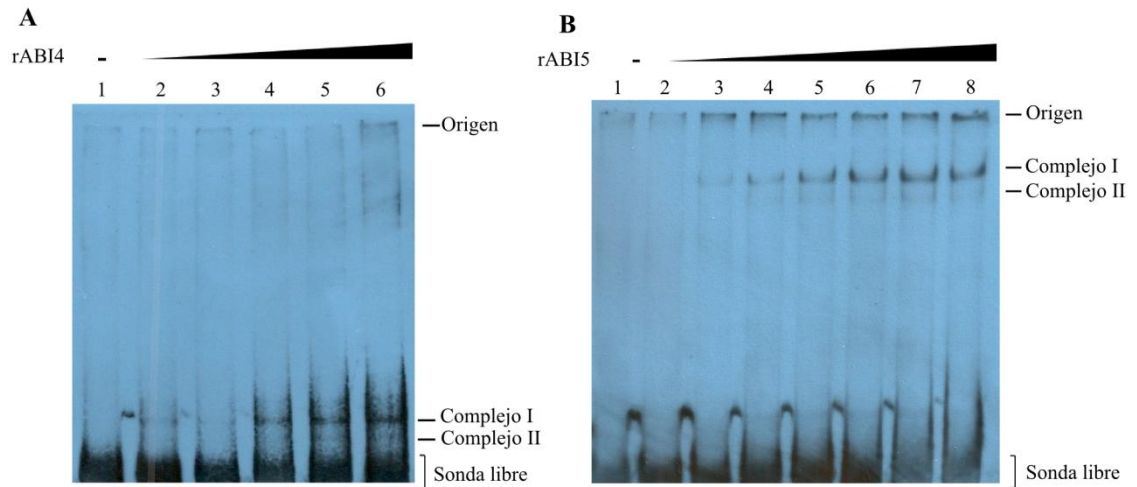


Figura 3.3. Capacidad de unión al ADN de las proteínas recombinantes de *S. bicolor* ABI4 y ABI5 (rABI4 y rABI5). Los experimentos de EMSA fueron realizados con 40 ng de un fragmento de 242 pb (-505 a -263 pb) como sonda biotinilada, correspondiente al promotor de *SbGA2ox3* y concentraciones crecientes de proteínas recombinantes rABI4 y rABI5. Los complejos detectados, la posición del origen y la sonda libre están indicados. A, Patrón de bandas retardadas para rABI4. La cantidad de proteína en cada reacción fue la siguiente: línea 1, sin proteína; línea 2, 0.045 μ g; línea 3, 0.075 μ g; línea 4, 0.15 μ g; línea 5, 0.225 μ g; línea 6, 0.3 μ g. B, Patrón de bandas retardadas para rABI5. La cantidad de proteína en cada reacción fue la siguiente: línea 1, sin proteína; línea 2, 0.03 μ g; línea 3, 0.06 μ g; línea 4, 0.15 μ g; línea 5, 0.3 μ g; línea 6, 0.375 μ g; línea 7, 0.47 μ g; línea 8, 0.6 μ g.

Para poner a prueba la especificidad de los complejos detectados para rABI4 y rABI5, se llevaron a cabo varios ensayos de retardo en gel utilizando sondas competidoras específicas e inespecíficas y extractos proteicos inespecíficos. La figura 3.4 muestra los resultados de los ensayos de competencia para ABI4 y ABI5: concentraciones crecientes de sonda *SbGA2ox3* no marcada (específica) desplazaron los complejos I y II tanto para las incubaciones con rABI4 como con rABI5 (Figura 3.4A), mientras que la competencia con un fragmento no marcado del gen *SbGAMyb* (inespecífica) no tuvo efecto (Figura 3.4B). Para descartar una posible interacción entre proteínas residuales de *E. coli* y la sonda, se realizaron incubaciones con cantidades variables de extracto proteico proveniente de cultivos de *E. coli* transformados con el vector pET24a vacío (sin inserto); estas incubaciones no condujeron a la formación de ningún complejo (Figura 3.4 C y D).

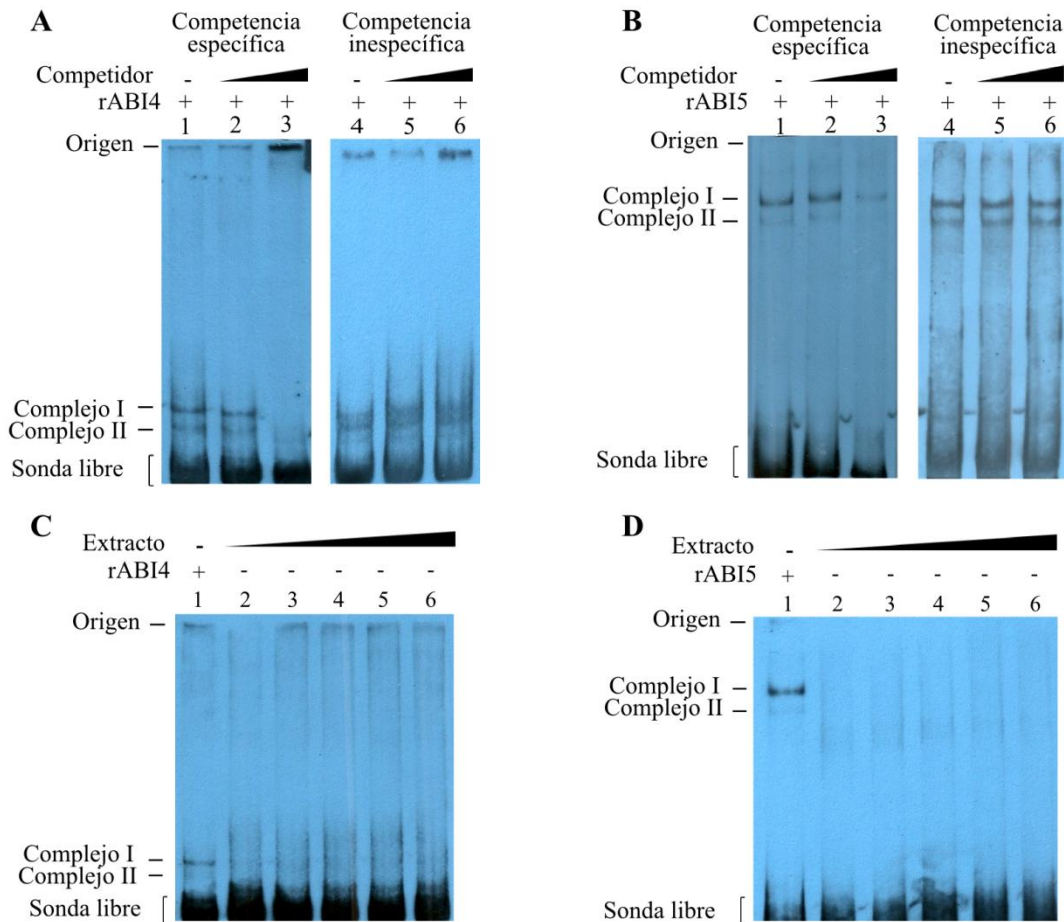


Figura 3.4. Especificidad de los complejos detectados para rABI4 y rABI5. A y B, Ensayos de competencias para rABI4 y rABI5, realizados con un fragmento de 242 pb de *SbGA2ox3* (-505 a -263 pb) como sonda biotinilada. Para todas las posiciones se usaron 40 ng de sonda biotinilada y 0.225 μ g de rABI4 (A) o 0.375 μ g de rABI5 (B). Para las competencias específicas, la cantidad de ADN competidor no marcado (fragmento *SbGA2ox3* sin marcar) en cada reacción fue la siguiente: calle 1, sin competidor; calle 2, 200 ng; calle 3, 600 ng. Para las competencias no específicas, la cantidad de de competidor no marcado (fragmento de *SbGAMyb* de 183 pb) fue la siguiente: calle 4, sin competidor; calle 5, 200 ng; calle 6, 600 ng. C y D, EMSAs controles para rABI4 (C) y rABI5 (D) llevados a cabo con concentraciones crecientes de extracto proteico de cultivos de *E. coli* (transformados con vector pET24a vacío) y 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3*. Tanto para C como para D, la cantidad de extracto proteico en cada calle fue la siguiente: calle 2, 10.74 μ g; calle 3, 14.32 μ g; calle 4, 17.9 μ g; calle 5, 21.48 μ g; calle 6, 25.06 μ g. La calle 1 muestra los controles positivos de incubación con 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3* y 0.225 μ g de rABI4 (C) y 0.375 μ g de rABI5 (D).

Por otro lado, se realizó un ensayo de retardo en gel como control positivo, incubando rABI4 o rABI5 con sonda biotinilada del promotor de *AtEm6*. La secuencia de este promotor contiene seis ACGT que podrían actuar como elementos ABRE y dos elementos CE-like. En ese sentido, Carles et al. (2002) mostraron que *AtABI5* interacciona con ese promotor, convirtiéndolo en un buen control positivo para esta tesis. Tanto rABI4 como rABI5 fueron capaces de unirse a la sonda de *AtEm6*, originando cinco y cuatro complejos retardados respectivamente (Figura 3.5). En forma conjunta, los resultados de los ensayos de competencia y los controles positivos y

negativos, demostraron que SbABI4 y SbABI5 se unen *in vitro* al promotor de *SbGA2ox3* de una manera específica.

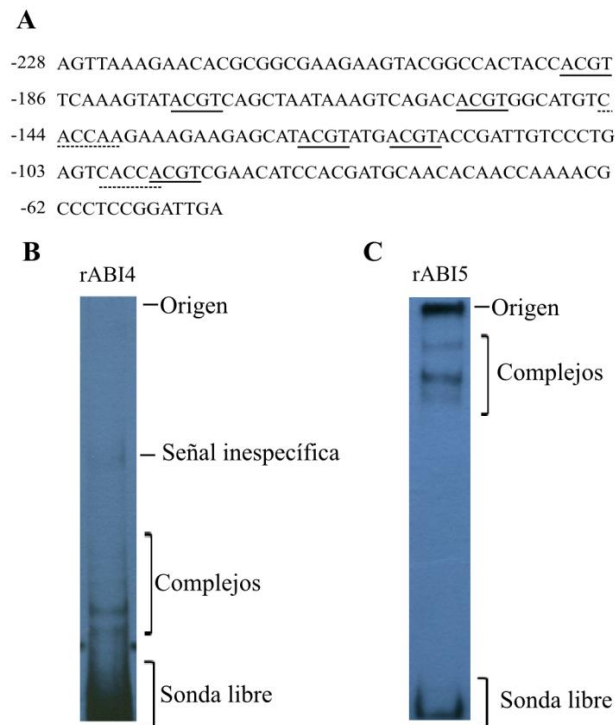


Figura 3.5. Capacidad de unión de rABI4 y rABI5 a la sonda biotinilada del promotor de *AtEm6*. A, Secuencia de la sonda biotinilada *AtEm6* (186 pb). Las posiciones están expresadas relativas a la primer base de la metionina inicial (ATG). Se indican los motivos ACGT para ABREs putativos (líneas sólidas) y CE-like (líneas punteadas). B, Patrón de retardos para rABI4. Se incubaron 40 ng de sonda biotinilada *AtEm6* con 0.225 μ g de rABI4. C, Patrón de retardos para rABI5. Se incubaron 40 ng de sonda biotinilada *AtEm6* con 0.375 μ g de rABI5. En todos los casos, los complejos detectados, el origen de la corrida y la sonda libre están indicados.

Con el fin de examinar la posibilidad de que el ABRC incluido en la región 5' regulatoria de *SbGA2ox3* fuese el responsable de las uniones detectadas para rABI4 y rABI5 y para descartar posibles artefactos debido al largo de la sonda utilizada, se diseñaron sondas más cortas, incluyendo una sonda "wild type" (con el ABRC intacto), una sonda "ABRE mutado" (ABRE mutado y CE intacto) y una sonda "CE mutado" (CE mutado y sin ABRE incluido) (Figura 3.6A). Cuando se realizaron los experimentos de EMSA con la sonda "wild type", tanto rABI4 como rABI5 produjeron complejos similares a los detectados con la sonda más larga, con la aparición de un complejo retardado adicional en el caso de rABI4. Sin embargo, cuando se incubó rABI4 o rABI5 con la sonda "ABRE mutado", la intensidad de todos los complejos disminuyó, indicando una menor afinidad por ese fragmento de ADN. Además, cuando se utilizó la sonda "CE mutado" (y no había un ABRE incluido en este caso), se detectaron únicamente trazas de complejos retardados, sugiriendo que la afinidad por esta última sonda era aun menor (Figura 3.6 B y C). Colectivamente, estos resultados sugieren que los elementos ABRE y CE tienen un rol decisivo en la unión de rABI4 y rABI5 al promotor de *SbGA2ox3*.

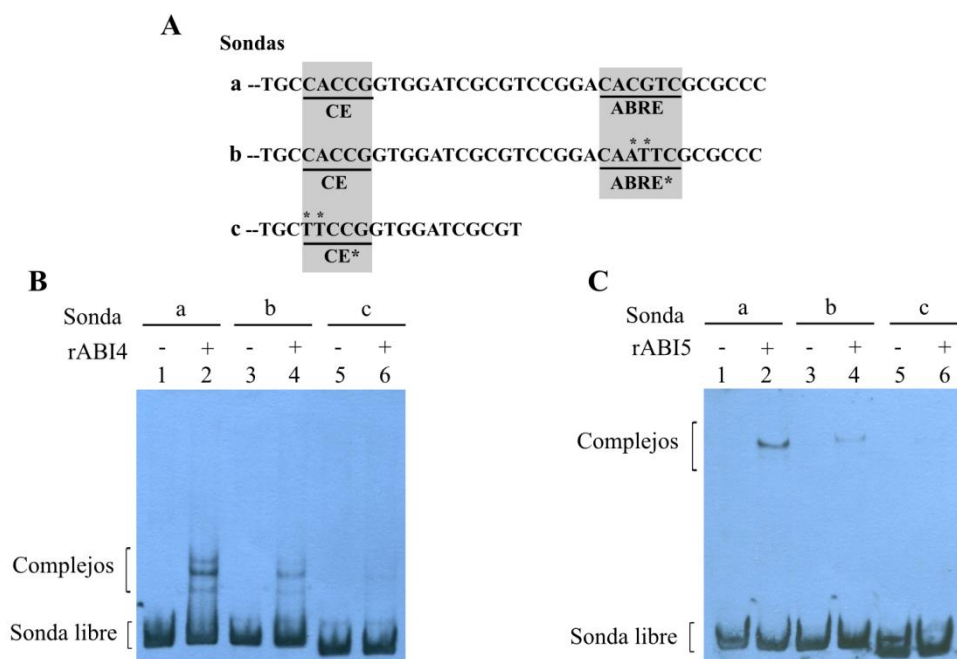


Figura 3.6. Capacidad de unión de rABI4 y rABI5 a sondas *SbGA2ox3* “wild type” y mutadas. A, Secuencia de las sondas a, b y c indicando los elementos CE y ABRE: sonda a, ABRE y CE sin mutar; sonda b, ABRE mutado y sonda c, CE mutado y sin ABRE incluido. Los asteriscos en las sondas b y c indican las bases y elementos mutados. El largo total de las sondas fue el siguiente: a, 131 pb; b, 131 pb y c, 114 pb. B, Ensayos de retardo en gel (EMSA) llevados a cabo con rABI4 y las sondas *SbGA2ox3* a, b y c. Para todas las calles, se utilizaron 40 ng de sonda biotinilada y la cantidad de proteína rABI4 fue la siguiente: calle 1, 3 y 5, sin proteína; calles 2, 4 y 6, 0.225 μ g. C, EMSA realizado con rABI5 y las sondas a, b y c. Para todas las calles, se utilizaron 40 ng de sonda biotinilada y las cantidades de rABI5 fueron las siguientes: calle 1, 3 y 5, sin proteína; calles 2, 4 y 6, 0.375 μ g.

3.3.3. SbABI4 y SbABI5 no se unen *in vitro* al *SbGA2ox3* de forma simultánea.

Considerando que tanto SbABI4 como SbABI5 se unieron a la misma región 5' regulatoria de *SbGA2ox3* y que se ha informado recientemente que ABI4 y ABI5 pueden activar sinérgicamente algunos promotores de genes de plantas (Reeves et al., 2011), se examinó la posibilidad de que las proteínas recombinantes ABI4 y ABI5 se pudieran unir simultáneamente a la misma sonda del promotor de *SbGA2ox3*. Contrario a esta hipótesis, los ensayos de retardo en gel llevados a cabo mediante co-incubaciones de la sonda *SbGA2ox3* con ambos factores de transcripción, no mostraron la formación de ningún complejo ternario, sugiriendo que SbABI4 y SbABI5 no se unen al promotor de *SbGA2ox3* simultáneamente (Figura 3.7). Por lo tanto, es posible que estas dos proteínas tengan afinidad por los mismos elementos *cis*-regulatorios. Estos resultados concuerdan con datos de microarreglos obtenidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *AtABI4*, en los que observó que los elementos ABRE están sobrerrepresentados en promotores de genes regulados por ABI4, mientras que los CE están casi ausentes (Reeves et al., 2011).

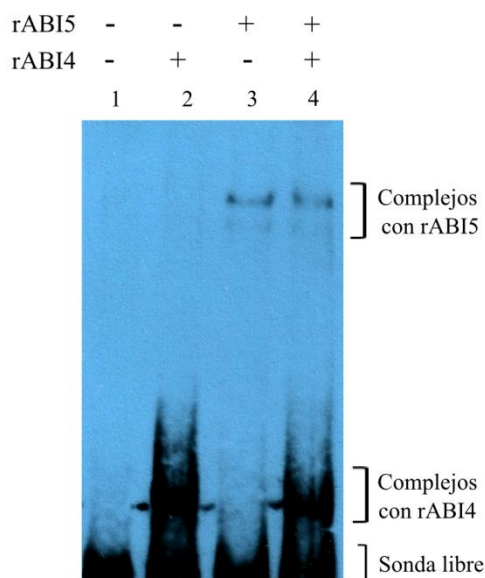


Figura 3.7. Ensayos de retardo en gel (EMSA) llevados a cabo con co-incubaciones de rABI4 y rABI5 con 40 ng de sonda biotinilada *SbGA2ox3*. Las cantidades de proteína en las reacciones fueron las siguientes: calle 1, sin proteína; calle 2, 0.225 µg de rABI4; calle 3, 0.375 µg de rABI5; calle 4, 0.225 µg de rABI4 y 0.375 µg de rABI5.

3.3.4. El “Complejo de respuesta al ABA” o ABRC se encuentra en el promotor de otros genes *GA2ox* de monocotiledóneas

En vista de los resultados obtenidos *in vitro* mediante la técnica de EMSA, el siguiente objetivo fue investigar si las interacciones detectadas son parte de un mecanismo regulatorio conservado en genes de *GA2oxidasas* en otras especies. Para ello, se evaluó la posibilidad de que aquellas proteínas *GA2oxidasas* con elevada similitud de secuencia a la *SbGA2ox3* pudieran compartir los mismos elementos regulatorios en la región 5' regulatoria. Para abordar esta pregunta, en primer lugar se llevó a cabo un análisis filogenético global usando el set completo de *GA2oxidasas* involucradas en el metabolismo de las GAs pertenecientes a 4 especies dicotiledóneas y 4 monocotiledóneas. Las secuencias completas de las proteínas *GA2oxs* de las 8 especies fueron completamente alineadas y se obtuvo un árbol filogenético (Figura suplementaria 3.1) utilizando el software MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Teniendo en cuenta la estructura topológica, el largo de las ramas y los valores soporte del clado, las proteínas *GA2ox* fueron clasificadas en 3 grupos: I, II y III, corroborando la clasificación propuesta por (Lee y Zeevaart, 2005) y los resultados específicos de Rodríguez et al. (2012). Las proteínas *SbGA2ox1* y *SbGA2ox2* fueron incluidas en el grupo II, mientras que *SbGA2ox3* y *SbGA2ox4* quedaron incorporadas dentro del grupo I, y como el principal interés estaba focalizado en *SbGA2ox3*, el grupo I fue seleccionado para los análisis subsiguientes. Dentro del grupo I de *GA2oxidasas* se observó una separación clara entre *GA2oxidasas* de monocotiledóneas (M) y *GA2oxidasas* de dicotiledóneas (D) y el grupo M fue a su vez dividido en los subgrupos M1, M2 y M3 (Figura 3.8A). La *SbGA2ox3* se ubicó dentro del subgrupo M3. Cuando se examinó la composición de motivos en todas las *GA2oxidasas* de monocotiledóneas (Figura suplementaria 3.4), la *SbGA2ox4* apareció como una proteína trunca, probablemente no funcional, siendo altamente probable que se haya originado en una duplicación reciente del gen *SbGA2ox3*. Para analizar la posibilidad de la existencia de

un mecanismo regulatorio común a los genes *GA2ox* de sorgo y otras especies, se realizó un análisis comparativo entre la secuencia 5' regulatoria (2 Kpb río arriba del ATG) de *SbGA2ox3* versus los promotores de cada uno de los subgrupos (D, M1, M2 y M3), con la ayuda de la herramienta EARS (Picot et al., 2010). Los resultados obtenidos de estos análisis mostraron que solo los promotores de las GA2oxidasas correspondientes al subgrupo M3 comparten regiones comunes dentro de la secuencia 5' regulatoria de *SbGA2ox3*. Se obtuvieron 2 picos con altos niveles de significancia indicando la existencia de 2 regiones conservadas dentro de estos promotores (Figura 3.8B).

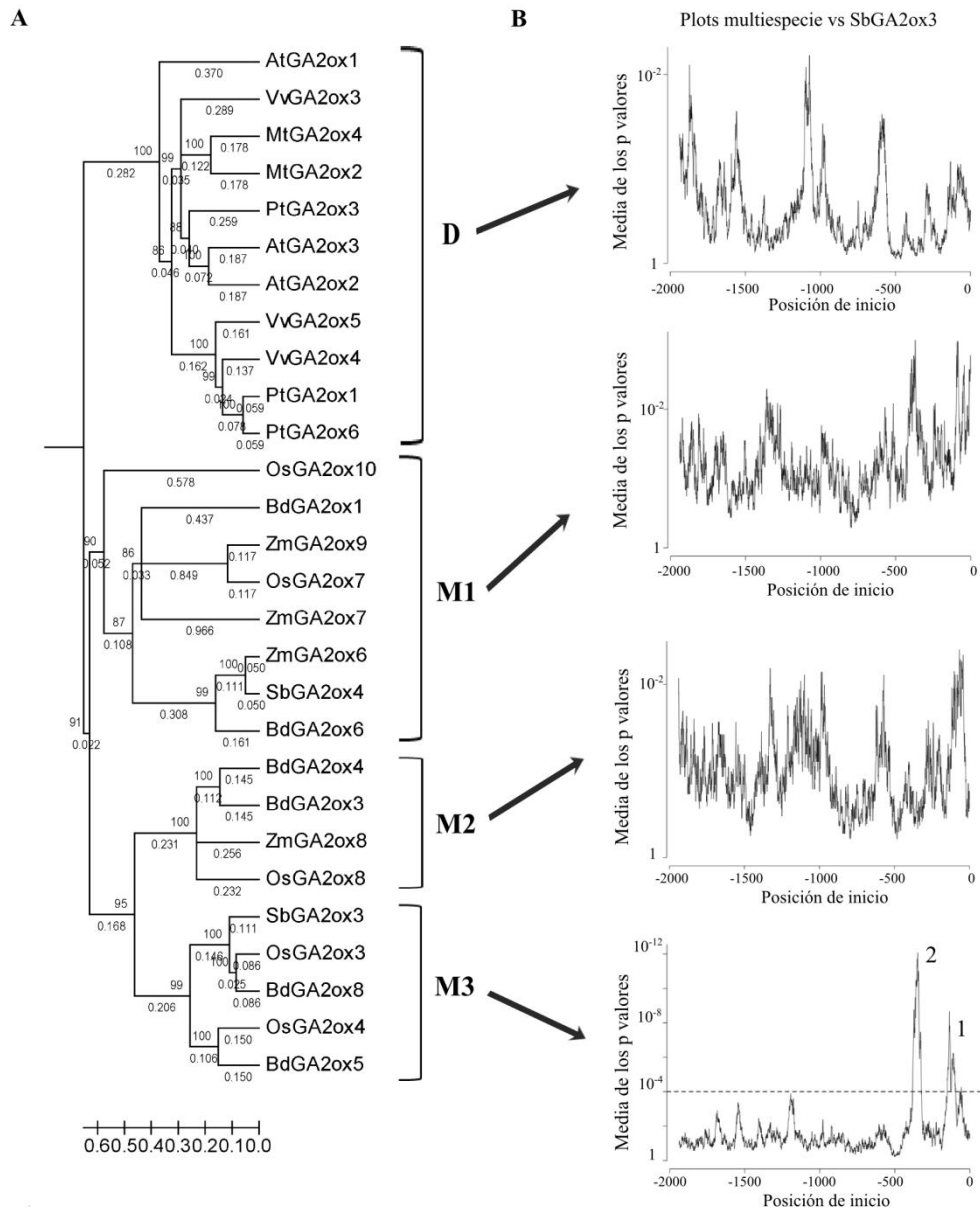


Figura 3.8. Análisis comparativo de los promotores de GA2oxs. A, Relaciones filogenéticas para el grupo I de GA2oxs. Las 28 proteínas GA2oxs fueron agrupadas en 4 subgrupos: D: dicotiledóneas; M1: monocotiledóneas 1; M2: monocotiledóneas 2 y M3: monocotiledóneas 3. At: *Arabidopsis thaliana*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Pt: *Populus trichocarpa*; Sb: *Sorghum bicolor*; Vv: *Vitis vinifera*; Zm: *Zea mayz*. Se muestran los valores de bootstrap y la escala indica el número de cambios por posición por unidad de largo de rama. Los códigos de identificación de las secuencias están listados en la Tabla suplementaria 3.2. B, Plots comparativos multi especie entre el promotor de *SbGA2ox3* y los promotores de las GA2oxs de cada grupo (D, M1, M2 y M3); obtenidos con la herramienta EARS. La línea punteada horizontal indica el p valor de corte (0.0001), sugiriendo que únicamente en el caso de M3 se detectaron 2 picos significativos.

Además, se analizó en detalle cada una de las comparaciones de manera individual, i.e. el promotor de *SbGA2ox3* y cada uno de los promotores del subgrupo M3, y se encontró que los cinco miembros de M3 compartían los dos mismos picos significativos (Figura suplementaria 3.5). A continuación, para identificar los motivos comunes representados dentro de estos picos en los cinco genes *GA2oxidasas*, se exploró la secuencia de las dos regiones conservadas. La ubicación del pico 1 colocalizaba en todos los casos con el TATA-box, mientras que el pico 2 pudo ser delimitado entre -460 y -375 pb río arriba del ATG de *SbGA2ox3*. La secuencia correspondiente al segundo pico comprendió una porción de las sondas que había sido previamente utilizada en los ensayos de EMSA descritos más arriba, y el ABRE y el CE1 estaban representados en todos los casos (Figura 3.9). La secuencia del CE1 presentó mutaciones puntuales en el promotor de los genes *GA2ox* de *Brachypodium*, comparada con el CE1 descrito en otras especies como maíz, lo cual conduciría a la formación de elementos CE1-like, como lo expresó Niu et al. (2002).

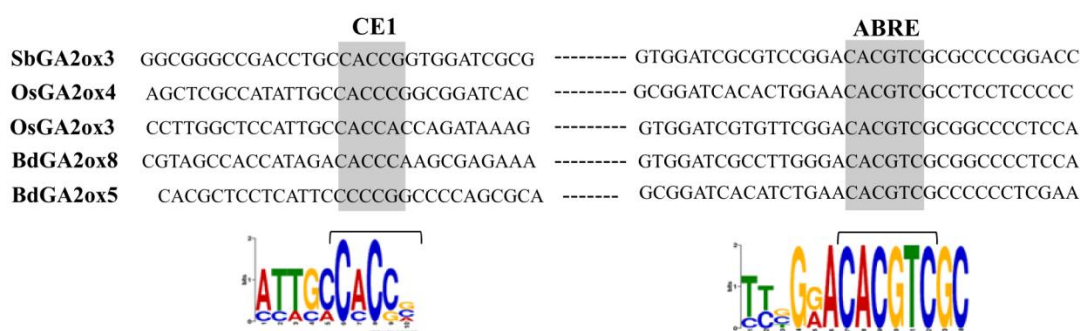


Figura 3.9. Alineamiento de las secuencias correspondientes al pico 2 de los miembros M3 (*SbGA2ox3*, *OsGA2ox3*, *OsGA2ox4*, *BdGA2ox5* y *BdGA2ox8*). Las regiones conservadas están resaltadas en gris: ABRE (CACGTC) y CE (CACCG). El software MEME (Bailey and Elkan, 1994) fue utilizado para encontrar los motivos comunes en los promotores de los miembros del subgrupo M3. Debajo de cada región conservada se muestran los logos para los motivos CE y ABRE.

En todos los casos, la posición del ABRE y el CE1 respecto al TATA-box en este grupo de promotores fue tal como se ha descrito en otros ABRC (Shen y Ho, 1995; Shen et al., 1996), sugiriendo una posible regulación transcripcional de estos genes por parte de la vía de señalización del ABA. Asimismo, aunque no se detectaron elementos RY dentro de las regiones conservadas identificadas en el análisis (debido a una mayor variación en la posición de estos elementos), sí se encontró este tipo de elementos en los promotores de todos los miembros del subgrupo M3, indicando que la posible inducción por ABA de estos genes es específica de semillas. En conjunto, los resultados del análisis filogenético y comparativo indican que las *GA2oxidasas* del subgrupo M3, no solo muestran una similitud estructural y probablemente funcional, sino que también podrían compartir un mecanismo de regulación transcripcional similar. Los factores de transcripción ABI4 y ABI5 involucrados en la señalización por ABA emergen como fuertes candidatos a formar parte de este mecanismo.

3.4. Discusión

Es ampliamente conocido que la señalización por ABA y el metabolismo de las GAs juegan un rol fundamental durante la expresión de la dormición en granos de sorgo inmaduros (Perez-Flores et al., 2003; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2012). Resultados previos obtenidos con el sistema de sorgo RedlandB2 (baja dormición)-IS9530 (elevada dormición), mostraron que la expresión de la dormición en estos dos genotipos está relacionada a la diferente sensibilidad de los embriones al ABA (Steinbach et al., 1995; Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). Esa sensibilidad contrastante al ABA, se evidencia como una transcripción diferencial de genes que codifican para proteínas que actúan como reguladores positivos de la señalización del ABA (ABI3/VP1, ABI4, ABI5 y PKABA1), que se expresan en altos niveles durante la incubación de granos inmaduros dormidos de la línea IS9530, pero no en el genotipo con baja dormición RedlandB2 (Rodríguez et al., 2009). Por otro lado, el contenido de la giberelina activa GA₄ alcanza valores significativamente más elevados en embriones de la línea con baja dormición RedlandB2 durante el cuarto día de incubación de los granos, comparados con los alcanzados por la línea de elevada dormición IS9530 (Perez-Flores et al., 2003; Rodríguez et al., 2012). Una explicación posible a esta acumulación diferencial de GA₄ fue propuesta por (Rodríguez et al., 2012), quien observó que los niveles de transcriptos de genes que codifican para enzimas de síntesis de giberelinas aumentan durante la incubación de granos de ambas líneas (con elevada y baja dormición) pero ello está acompañado por una evidente promoción de la transcripción de los genes de inactivación de giberelinas *SbGA2ox1* y *SbGA2ox3* únicamente en IS9530. La correlación negativa entre los niveles de GA₄ y su catabolito GA₃₄ también brinda respaldo al rol activo que posee el catabolismo de las GAs en la determinación de los valores de GA₄ durante la expresión de la dormición en estas líneas de sorgo. Teniendo en cuenta los patrones de expresión concordantes de *SbABI4*, *SbABI5* y *SbGA2ox3* y el perfil de acumulación de *SbABI5* en granos dormidos incubados (Rodríguez et al., 2009), simultáneamente con la identificación de un posible ABRC en el promotor de *SbGA2ox3*, en este capítulo se examinó la interacción *in vitro* entre las proteínas *SbABI4*, *SbABI5* y la región 5' regulatoria de *SbGA2ox3*. Se demostró que las proteínas recombinantes *SbABI4* y *SbABI5* son capaces de interactuar *in vitro* con un fragmento de la región 5' regulatoria de *SbGA2ox3*, sugiriendo la existencia de un *cross-talk* entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs durante la imbibición de granos inmaduros dormidos de sorgo. Además, los resultados obtenidos sugieren que estas interacciones podrían ser parte de un mecanismo regulatorio que no ha sido descrito previamente, de un grupo particular de GA₂oxidases de monocotiledóneas.

El análisis *in silico* realizado para el promotor de *SbGA2ox3* reveló la presencia de varios elementos *cis*-regulatorios incluyendo algunos relacionados a la señalización por ABA o GAs y a la expresión específica en semillas (Figura 3.2). Particularmente, los motivos ABRE y CE1 localizados cerca del TATA-box, que de manera conjunta conforman un ABRC, resultaron de especial interés. Estos elementos ABRE y CE han sido identificados en los promotores de otros genes de respuesta al ABA como los genes *HVA1* (Shen et al., 1996), *HVA22* (Shen y Ho, 1995), el gen de trigo *Em* (Guiltinan et al., 1990), y los genes de arroz *Rab16b* (Ono et al., 1996), *Rab17* (Busk et al., 1997), *Rab28* (Busk y Pagès, 1998) y *Osem* (Hattori et al., 1995).

En este capítulo, se demostró que los factores de transcripción *SbABI4* y *SbABI5*, son capaces de unirse a una sonda de *SbGA2ox3* de forma específica, generando dos complejos; esto indica la existencia de dos sitios de unión en el promotor de *SbGA2ox3* para cada una de las proteínas (Figura 3.3). Aunque son necesarios experimentos

adicionales, como ADN footprinting, para conocer los motivos regulatorios que están siendo reconocidos por estos factores de transcripción, los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel con las sondas “ABRE mutado” o “CE mutado”, demostraron que ambos elementos, ABRE y CE, están involucrados en la unión específica de SbABI4/SbABI5 al promotor de *SbGA2ox3*, ya que la interacción con la sonda de *SbGA2ox3* se vio marcadamente reducida cuando las secuencias del ABRE y del CE fueron mutadas. En esta misma dirección, de acuerdo a lo que se informó en maíz (Niu et al., 2002), un elemento candidato que puede ser reconocido por ABI4 sería el CE, localizado -218 pb río arriba del TATA box. Por otro lado, el ABRE (localizado -194 pb río arriba del TATA box) aparece como un motivo candidato adicional que podría ser reconocido por ABI4, ya que los ensayos de retardo en gel llevados a cabo con la sonda del promotor de *AtEm6* que contiene seis ABRE putativos, dio lugar a cinco complejos. De acuerdo a la información existente (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007), ABI5 podría unirse al elemento ABRE localizado en la región 5´regulatoria de *SbGA2ox3* generando uno de los complejos detectados, pero además, es posible que ABI5 esté reconociendo al elemento CE y de lugar al complejo adicional. En este sentido, (Casaretto y Ho, 2003) informaron que la proteína de cebada HvABI5 reconoce tanto el elemento ACGT-box (ABRE) como el CE3 del ABRC3, sugiriendo la posibilidad de que SbABI5 se esté uniendo a los elementos ABRE y CE1. En línea con esos resultados, aunque ambas proteínas SbABI4 y SbABI5 fueron capaces de unirse al promotor de *SbGA2ox3*, no tuvieron la habilidad de interactuar de manera simultánea con la sonda biotinilada, dando a entender que ambos factores de transcripción compiten por los mismos elementos de unión. Este resultado está en concordancia con lo observado por Cassaretto et al. (2003) como se describió más arriba y también con los resultados obtenidos por Reeves et al., (2011), quienes mostraron que los promotores de numerosos genes de Arabidopsis que son blancos de ABI4 y/o ABI5, están enriquecidos en motivos ABRE. Los resultados del presente capítulo mostraron además que se requirieron cantidades menores de SbABI4 que de SbABI5 para detectar complejos retardados. Gran parte de esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que es conocido que ABI5 actúa como homodímero o heterodímero (Finkelstein y Lynch, 2000) y por otro lado, se demostró que la fosforilación estabiliza a ABI5 y aumenta su actividad *in vivo* (Lopez-Molina et al., 2001; Piskurewicz et al., 2008), lo que llevaría a que sean necesarias mayores cantidades de SbABI5 que de SbABI4 para detectar unión *in vitro*. Teniendo en cuenta que tanto SbABI4 como SbABI5 tienen la capacidad de unirse al promotor de *SbGA2ox3*, ambos factores de transcripción podrían ser parte de un mecanismo de ajuste fino de la expresión de *SbGA2ox3* en granos dormidos durante su imbibición. En ese contexto, a pesar de que la expresión del gen *SbABI4* ya ha sido medida por Rodríguez et al. (2012), se necesitan nuevos experimentos para cuantificar la cantidad de proteína SbABI4 que se produce durante la incubación de granos dormidos, con el objetivo de tener un escenario más acertado del patrón de acumulación de este factor de transcripción durante la imbibición. Por otra parte, SbVP1/ABI3, un factor de transcripción de tipo B3 y conocido componente de la señalización del ABA, aparece como otro candidato fuerte a regular la expresión de *SbGA2ox3*. Esta posibilidad surge de trabajos que mostraron que VP1 reconoce elementos RY, como los identificados en el promotor de *SbGA2ox3* (Suzuki et al., 1997). La participación de VP1/ABI3 en la modulación transcripcional de genes regulados por ABA ya ha sido sugerida por Himmelbach et al. (2003), quienes propusieron la acción combinada de factores de transcripción con dominios de tipo bZIP, AP2 y B3. En ese sentido, VP1/ABI3 podría unirse a elementos RY y en combinación con motivos ABREs o CEs localizados en las cercanías, podría actuar

como un potenciador de la transcripción de genes regulados por ABA de una manera específica en semillas (Holdsworth et al., 2008). En este contexto, los elementos RY que se identificaron en el promotor de *SbGA2ox3*, especialmente el RY más próximo a los elementos ABRE y CE, refuerzan la posibilidad de que SbAVP1/ABI3 actúe como un potenciador de la transcripción de *SbGA2ox3* en la semilla.

De manera conjunta, los resultados mostrados en este capítulo permiten proponer que en semillas dormidas inmaduras, durante la expresión de la dormición, SbABI4 y/o SbABI5 (con la posible acción accesoria de SbVP1/ABI3) interactuarían con el promotor de *SbGA2ox3*, aumentando su transcripción, y conduciendo a la acumulación de proteína SbGA2ox3; ello resultaría en la degradación de GAs activas previniendo de esta forma la germinación de granos inmaduros dormidos. Por el contrario, los componentes de la señalización del ABA son escasamente acumulados en granos inmaduros no dormidos durante la imbibición, y el promotor de *SbGA2ox3* no podría ser activado por SbABI5 y/o SbABI4; ello conduciría a la acumulación de GAs activas (debido a una menor inactivación) y como resultado, aumentaría la germinación. De manera similar a lo que se sugiere en este capítulo, Lee et al. (2012) propusieron que durante la inhibición de la germinación dependiente de phyB en *Arabidopsis*, AtABI5 interactúa con los genes *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2*, pero suprime su expresión en lugar de aumentarla, cuyo resultado sería un menor nivel de GAs en la semilla.

El análisis filogenético y de arquitectura de dominios que se llevó a cabo en este capítulo, demostró que *SbGA2ox3* es probablemente la única GA2ox funcional dentro del grupo I, ya que *SbGA2ox4* aparece como una duplicación truncada de *SbGA2ox3*. La posible falta de funcionalidad de *SbGA2ox4* resalta el rol biológico central que tiene *SbGA2ox3* en sorgo granífero. El análisis filogenético y el alineamiento realizado, sugieren que *SbGA2ox3* no solo comparte una estructura/función con otros miembros del subgrupo M3, sino que además podrían compartir una regulación transcripcional común. De manera contraria, para el resto de los subgrupos D, M1 y M2 no se observaron complejos regulatorios comunes conservados con *SbGA2ox3*. Las GA2oxidases del subgrupo M3 mostraron dos secuencias conservadas, una de ellas incluyendo ambos elementos: ABRE y CE (ABRC). La funcionalidad del CE1-like representado en *BdGA2ox5* no se ha testeado aún en otros promotores, y por lo tanto no se puede considerar ese motivo como un elemento funcional hasta que se informen nuevas evidencias, pero sí se ha demostrado que el CE1-like detectado en el promotor de *BdGA2ox8* es funcional para la unión de ABI4 en los genes de maíz *ABI4*, *RAB28* y *RAB17* y en los de cebada *HVA22* y *HVA* (Niu et al., 2002). Estos hallazgos sugieren que las GA2oxs del subgrupo M3 podrían ser genes regulados por ABA y que el mecanismo de *cross-talk* propuesto para sorgo granífero podría también operar en arroz y *Brachypodium*, a través de la regulación transcripcional de los genes *OsGA2ox3*, *OsGA2ox4*, *BdGA2ox5* y *BdGA2ox8*. Además, la localización de elementos RY en los promotores de estos cuatro genes indica que la regulación de la transcripción por ABA en semillas podría estar mediada también por VP1/ABI3 en todos ellos.

En concordancia con estos últimos resultados, un análisis comparativo del contenido de ABA en granos de *Brachypodium* mostró que las semillas de genotipos con baja dormición y con alta dormición postmadurados en seco tienen menos ABA que los granos dormidos después de 4 días de imbibición. Sin embargo, el contenido de ABA en semillas secas del genotipo con menos dormición es mayor que en semillas del genotipo con elevada dormición (Barrero et al., 2012). Estos resultados sugieren que los niveles de ABA por si solos no pueden predecir la dormición en distintos genotipos de *Brachypodium*, y que la sensibilidad al ABA y otras hormonas como las GAs podrían estar teniendo un rol importante. No se han informado hasta el momento estudios sobre

los niveles de transcritos de genes de metabolismo de GAs o sensibilidad al ABA para *Brachypodium*, por lo tanto no se puede descartar que estos componentes tengan un rol en la expresión de la dormición de esta especie. Por otro lado, se ha propuesto que en arroz el contenido de ABA durante la imbibición y el desarrollo de la semilla no está directamente ligado al nivel de dormición. En cambio, la sensibilidad al ABA parece ser un componente importante del grado de dormición (Gianinetti y Vernieri, 2007). De manera conjunta, estos resultados sugieren que la expresión de la dormición en *Brachypodium* y arroz podría funcionar de manera similar a sorgo, en donde la señalización del ABA, y no el contenido de ABA, parecen explicar los patrones de salida de la dormición de los distintos genotipos. En ese sentido, el *cross-talk* propuesto para sorgo podría tener lugar en semillas dormidas de arroz y *Brachypodium*.

A pesar de que se necesitan ensayos adicionales para confirmar la ocurrencia *in vivo* de estas interacciones en el embrión de la semilla, la unión específica *in vitro* es la primera prueba que se requiere para determinar si es posible o no una interacción. Los esfuerzos futuros están orientados a estudiar la relevancia de estas interacciones *in vivo* en granos de sorgo inmaduros dormidos e identificar otros factores de transcripción que puedan interactuar con el promotor de *SbGA2ox3* en ensayos de simple híbrido. Como se mencionó anteriormente, la primera interacción entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs ha sido recientemente informado por Lee et al. (2012) en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, pero no se han descrito interacciones similares para ninguna especie de relevancia agronómica.

A modo de concluir, a pesar de que las enzimas del metabolismo de giberelinas están altamente conservadas en su estructura y probablemente en su función, la regulación de estos genes presenta gran variabilidad entre especies diferentes. La identificación de puntos de regulación en especies con relevancia agronómica resulta crucial para planificar estrategias de mejoramiento. En ese contexto, las líneas de sorgo IS9530 y RedlandB2 constituyen un sistema experimental basado en la variabilidad intraespecífica para el nivel de dormición y la respuesta al brotado pre-cosecha. El presente capítulo ofrece nuevos elementos en la regulación de un gen de catabolismo de GAs en sorgo (*SbGA2ox3*) que en trabajos previos había emergido como un candidato fuerte a regular los niveles de la giberelina activa GA₄ y la respuesta a la germinación. Es probable que el patrón contrastante de expresión del gen *GA2ox3* en ambas líneas dependa de la actividad diferencial de elementos de la vía de señalización del ABA como ABI4 y ABI5, más que de la existencia de variabilidad en la secuencia del promotor de *GA2ox3*. En este sentido, la activación del catabolismo de GAs por factores de señalización de la vía del ABA podría ser interpretada como una instancia adicional que contribuye a la inhibición de la germinación forzando el balance ABA/GA hacia la acción del ABA. Resultaría interesante investigar si este mecanismo está presente en otras monocotiledóneas en las cuales la sensibilidad al ABA, más que el metabolismo del ABA, esté controlando el nivel de dormición. Por ejemplo, la obtención de mutantes de TILLING en sorgo, *Brachypodium* o arroz, que estén afectados en genes de *GA2ox* que contengan un ABRC en sus promotores, resultaría muy útil para comprender la contribución de este gen (y su regulación por ABA) a la expresión de la dormición en especies de cereales.

CAPITULO 4

Discusión General

CAPITULO 4

Discusión General

Resumen

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en los capítulo 2 y 3 de esta tesis, de manera particular y de forma conjunta e integrada. Se incluye la contrastación de las hipótesis planteadas originalmente y el cumplimiento de los objetivos propuestos. Asimismo, se exponen las implicancias de los resultados obtenidos en el desarrollo de futuras investigaciones vinculadas a la dormición en sorgo granífero y se proponen posibles aplicaciones de los hallazgos, como vías para la manipulación de este carácter. Por último se propone un modelo integrado de los resultados obtenidos, identificando los elementos que se conocían antes de comenzar esta tesis, las cuestiones que fueron abordadas en este trabajo y aquellos interrogantes que aún restan por ser respondidos.

4.1. Contexto de la problemática abordada

La dormición de semillas posee un significado adaptativo bastante claro para especies silvestres, pero para especies domesticadas como los cereales, ajustar la salida de la dormición de las semillas a un determinado lapso de tiempo, se presenta muchas veces como una complicación. Si la dormición de un lote de semillas es muy persistente puede hacer fracasar su uso como simiente para un nuevo cultivo o su uso industrial en caso de que se requiera la germinación de los granos (como en el proceso de malteado durante la elaboración de cerveza). Por otro lado, una salida anticipada de la dormición expone a los granos a sufrir brotado pre-cosecha (Benech Arnold, 2006). En el caso del sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), el BPC es uno de los principales inconvenientes para su producción en la región central de Argentina, ya que la maduración del grano transcurre durante fines del verano o inicios del otoño cuando prevalecen condiciones lluviosas o de alta humedad ambiental. La complejidad que presenta el fenómeno de dormición, teniendo en cuenta la diversidad de mecanismos en diferentes especies, la cantidad de genes involucrados y el importante efecto que tiene el ambiente en su expresión, hacen que sea un carácter de difícil manipulación. Todo esto genera la necesidad de desarrollar estudios particulares para cada especie para comprender los mecanismos que operan durante la expresión de la dormición y poder identificar elementos que tengan un rol regulatorio en ese proceso.

La dormición en sorgo granífero ha sido detalladamente descrita desde un enfoque fisiológico (Steinbach et al., 1995; Steinbach et al., 1997; Benech-Arnold et al., 2003; Gualano et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). Estos estudios a nivel fisiológico permitieron identificar los componentes del balance hormonal ABA-GAs involucrados en la expresión de la dormición (i.e. la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs) y fueron la base de otros estudios a nivel molecular y que consistieron en el análisis de “genes candidatos” a nivel transcripcional y también de proteína en el caso de SbABI5 (Rodríguez, 2008; Rodríguez et al., 2009; Rodríguez et al., 2012). Los resultados de estos trabajos previos muestran un conjunto de genes cuya expresión es diferente entre ambas líneas de sorgo y que estarían siendo en parte responsables de las respuestas observadas. Sin embargo la evidencia indica que la regulación diferencial de estos genes ocurre en respuesta a un factor regulatorio de mayor jerarquía no identificado aún. A partir de los aportes generados en este campo, emergió la necesidad de, por un lado, proponer análisis alternativos que exploren la base genética de la dormición y su vinculación con los genes candidatos descritos o nuevos genes responsables del carácter y, por otra parte, buscar evidencia experimental que avale el mecanismo de acción propuesto para algunos de los genes candidatos ya identificados en la expresión de la dormición. En la presente tesis se concretó entonces un análisis de la estructura genética del carácter dormición, que resultó en la identificación de 3 QTL asociados con el nivel de dormición de granos maduros (capítulo 2) y, por otra parte, se puso a prueba la interacción puntual entre dos factores de transcripción de la vía del ABA (SbABI4 y SbABI5) y el promotor de un gen de catabolismo de GAs (*SbGA2ox3*), cuya expresión se correlacionó con los niveles de dormición en estudios previos con genes candidatos. Con respecto a esta interacción entre los factores SbABI4, SbABI5 y *SbGA2ox3*, se evaluó además la posibilidad de un mecanismo similar en otras especies (capítulo 3).

4.2. Dos aproximaciones con un mismo objetivo

La incorporación de niveles ajustados de dormición en planes de mejoramiento de cereales que sufren brotado pre-cosecha en condiciones de producción, ha sido históricamente una tarea complicada para los mejoradores, debido al origen cuantitativo de la variación fenotípica que se observa para el carácter, que implica efectos conjuntos del genotipo, el ambiente y la interacción genotipo x ambiente. Las condiciones ambientales que experimentará el cultivo durante el período de llenado de granos, se pueden manipular hasta cierta medida, modificando por ejemplo la fecha de siembra. Sin embargo, gran parte de la variabilidad ambiental a la que estarán sometidos esos granos durante su llenado y las condiciones que percibirán luego de la madurez fisiológica, son muchas veces difíciles de predecir y/o manejar. En cambio sí es posible caracterizar el componente de la variabilidad fenotípica que es atribuible al genotipo, como herramienta para la manipulación de la dinámica de salida de la dormición de esos granos. Para describir esa componente genotípica, se pueden considerar dos enfoques paralelos y complementarios: uno basado en la identificación de genes ó loci responsables de la variabilidad intra-específica observada (por ej., entre las líneas con respuesta contrastante al BPC) y un segundo enfoque centrado en la descripción detallada de la red de genes (y sus productos) que controlan la respuesta de germinación en granos embebidos. El primer enfoque está asociado a la identificación de QTL que expliquen la variabilidad entre individuos de una población segregante derivada de parentales contrastantes para el carácter dormición; el segundo enfoque se nutre de estudios fisiológicos combinados con análisis a nivel molecular, utilizando mutantes, genes candidatos, etc. En alguno de estos dos enfoques se han basado numerosos trabajos de investigación abocados al estudio de los mecanismos que operan durante la germinación y la dormición de semillas en especies modelo como *Arabidopsis*, cebada o tomate. La disponibilidad de mutantes en *Arabidopsis* afectados en el desarrollo, germinación o dormición de sus semillas, facilitó el trabajo y sirvió para proponer genes candidatos (Koornneef y Van der Veen, 1980; Hilhorst y Karszen, 1992; Bentsink y Koornneef, 2002). Los resultados obtenidos en estos trabajos con mutantes, junto con una caracterización fisiológica detallada de la dormición en especies de interés, dio el puntapié para comenzar a estudiar las bases moleculares de la dormición en otras especies de relevancia agronómica como los cereales (Bentsink et al., 2007). Sin embargo, sólo una proporción de loci específicos pudo y puede ser detectada a través de mutantes, debido entre otros motivos a que las mutaciones en genes con efectos pleiotrópicos muy grandes, no permiten la supervivencia de las plantas o a que la presencia de redundancia provoca que ciertos fenotipos sean reconocibles solo en algunos fondos génicos (genotipos) o en mutantes múltiples. Por eso, la identificación de QTL aparece como una estrategia que permite seguir avanzando en paralelo con esta búsqueda de genes o regiones genómicas responsables de la variabilidad observada en dormición. De esta forma, tanto el análisis de QTL llevado a cabo en esta tesis (capítulo 2) como la puesta a prueba de interacciones entre genes o proteínas hasta ahora candidatos para dormición en sorgo (capítulo 3), tienen como objetivo común confirmar el rol preponderante de ciertas regiones genómicas en la determinación del patrón de dormición de genotipos de sorgo.

En esta línea de razonamiento cabría esperar que alguno de los genes candidatos propuestos para cumplir un rol en la expresión de la dormición en granos de sorgo inmaduros (como *SbABI5*, *SbABI4* o *SbGA2ox3*) esté a su vez incluido dentro de algún QTL para el carácter. Si bien en el transcurso de esta tesis no se lograron identificar QTL para dormición en granos inmaduros (aunque para granos inmaduros sí se han propuesto genes candidatos), de haber podido localizar QTL, no necesariamente

incluirían a esos mismos genes. De la misma manera, los QTL identificados para granos maduros posiblemente incluyan genes con un rol en la expresión de la dormición que sean diferentes a los que se encuentren o hayan encontrado a través de aproximaciones moleculares. Ello se debe principalmente a que los distintos enfoques metodológicos podrían estar abordando diferentes escalones de los mecanismos de control de la dormición y sus resultados podrían superponerse o no, dependiendo de los casos puntuales. En esa dirección, no hay que perder de vista el hecho de que la presencia de genes con expresión diferencial entre ambas líneas de sorgo no garantiza en sí mismo un rol en el fenotipo observado, y mucho menos una participación en el origen genético de las diferentes respuestas. La presencia de regulación diferencial de varios de los genes candidatos analizados en trabajos previos no implica la existencia de variantes alélicas para estos genes (capaces de constituir un QTL), y podría ser consecuencia de otro factor “aguas arriba” en la cascada de eventos que conduce a una regulación diferencial de estos genes y a través de ellos, modula la respuesta de germinación. El análisis de QTL ofrece en ese caso una posibilidad de identificar algunos de esos otros factores que actúan “aguas arriba”. Al mismo tiempo, de la misma manera que las aproximaciones moleculares tienen sus limitaciones, el mapeo de QTL también tiene las suyas. Una de ellas surge del nivel de significancia que se utilice en el análisis. En ese sentido, en esta tesis se eligió trabajar con un nivel de significancia estricto, con lo cual, si bien se garantizó la confiabilidad de los QTL encontrados, se puede haber conspirado contra la detección de QTL de efecto menor que pudieron estar presentes (Bernardo, 2008). A modo de ejemplo, para el caso del gen *SbABI5*, si bien no se identificó un QTL que colocalice con su posición en el mapa físico de sorgo, el valor de LR obtenido en su marcador sugiere que aumentando el número de repeticiones (para disminuir el error experimental) en futuros análisis de mapeo, tal vez aumenten las posibilidades de identificar un QTL significativo en esa posición. En ese caso puntual, se estaría corroborando la relevancia del gen candidato (*ABI5*) en dos momentos del desarrollo diferentes, a través de dos aproximaciones que ofrecen información completamente complementaria: las dos estrategias refuerzan el carácter de “gen responsable”, pero a la vez una de ellas propone un mecanismo de acción para la proteína codificada por ese gen (por ej., regular la transcripción de un gen de catabolismo de GA) y la otra ofrece información adicional como es la magnitud del efecto del gen en el total de la variación fenotípica o la estabilidad de ese efecto en distintos ambientes. El hecho de no haber podido detectar QTL en granos inmaduros, implica que probablemente haya un elevado número de genes con un pequeño efecto individual actuando sobre el fenotipo de dormición en ese momento, que no pudieron ser detectados en la población utilizada. Una estrategia válida para lograr localizar esos QTL de efecto menor puede ser construir una población segregante de mayor número de individuos, elevar la cantidad de marcadores evaluados y utilizar metodologías estadísticas alternativas ajustadas a distribuciones alejadas de la normal como la propuesta por von Rohr y Hoeschele (2002). Sin embargo, en situaciones como esas, se podría aprovechar la variabilidad intraespecífica como la que existe entre las líneas IS9530 y RedlandB2, utilizando aproximaciones moleculares (como la expuesta en el tercer capítulo de esta tesis), que pongan a prueba el rol de genes candidatos identificados para dormición en granos inmaduros; pero nuevamente, sin perder de vista que con este tipo de aproximación molecular, no se asegura que estos genes tengan una participación en el origen genético de la variabilidad fenotípica observada en una población segregante.

Por último, y no menos importante, las dos estrategias utilizadas en esta tesis, generan herramientas que pueden ser utilizadas de distinta manera en la manipulación del nivel de dormición de genotipos de sorgo. Como se comenta en mayor detalle más

adelante, en la sección “Aplicaciones futuras”, el capítulo 2 de esta tesis brinda información valiosa que una vez corroborada, puede ser incorporada a planes de mejoramiento, por ejemplo a través de selección recurrente asistida por marcadores (MARS), ofreciendo una alternativa a la transgénesis, en cuyo caso, el capítulo 3 ofrece un buen candidato (*SbGA2ox3*) a ser manipulado genéticamente, por ej., aumentando su expresión en granos inmaduros.

4.3. Bases genéticas de la dormición en sorgo

Los resultados expuestos en el segundo capítulo de esta tesis, en primer lugar corroboraron la naturaleza cuantitativa del carácter bajo estudio, pudiéndose observar y cuantificar el espectro continuo de fenotipos de dormición que se hacen evidentes en una población segregante, comprendido entre individuos cuyos granos estaban profundamente dormidos e individuos con semillas prácticamente carentes de dormición al momento de muestreo. Asimismo, la elevada heredabilidad en sentido amplio que mostró el carácter para granos maduros en la localidad de Manfredi, da cuenta de la importancia que adquiere la caracterización de las bases genéticas que regulan la dormición. El hecho de no haber detectado QTL que explicaran parte de la variabilidad observada en dormición para granos inmaduros (34 DPA) imposibilitó poner a prueba la primer hipótesis de esta tesis, que establecía que *“Los QTL detectados serán diferentes dependiendo del tiempo de desarrollo de las semillas; es decir las regiones del genoma que estén vinculadas a la expresión de la dormición no serán las mismas en granos inmaduros (muestreados antes de madurez fisiológica) que en granos maduros (muestreados después de madurez fisiológica)”*. Posiblemente una combinación de estrategias, (una población de mayor tamaño, un mayor número de marcadores y otro tipo de análisis estadístico) posibilite en un futuro la obtención de resultados para granos inmaduros y su comparación con granos maduros. El análisis genético de la variabilidad observada en dormición para granos maduros aportó la identificación de tres QTL (*qDOR-5*, *qDOR-9* y *qDOR-10*). Todos ellos mostraron un efecto claramente aditivo, en concordancia con otros trabajos de identificación de QTL para dormición (Hori et al., 2007; Imtiaz et al., 2008; Bentsink et al., 2010). Los loci *qDOR-5* y *qDOR-9* pueden ser considerados como QTL de efecto mediano, mientras que para *qDOR-10* no se puede hacer ninguna sugerencia con respecto a su efecto debido a que la metodología que lo puso en evidencia no permite estimar la proporción de variabilidad explicada por el mismo. Además se podría sugerir que *qDOR-5* se mostró como un QTL ambiente-específico, mientras que *qDOR-9* y *qDOR-10* parecieran tener una estabilidad mayor, al haberse detectado en dos ambientes diferentes (noreste de la provincia de Córdoba y el noreste de la provincia de Buenos Aires). Por otra parte, ninguno de los QTL detectados incluyó en su intervalo de confianza alguno de los genes candidatos a tener un rol importante en la dormición de semillas inmaduras de sorgo (del metabolismo de GAs o de señalización de ABA), indicando que existen genes que hasta ahora no se han considerado en el sistema, y que tendrían un papel relevante en las diferencias de expresión de dormición de granos maduros que muestran las líneas IS9530 y RedlandB2. Por último, el análisis de QTL realizado en esta tesis, ofrece información acerca de una porción de la arquitectura genética de la expresión de la dormición en sorgo, ya que sólo fueron informativos o “mapeables” aquellos alelos que segregaron, es decir aquellos alelos que difirieron entre las líneas parentales IS9530 y RedlandB2. En ese sentido, resultaría altamente ventajoso contar con resultados de otras poblaciones de mapeo generadas con otras líneas parentales de sorgo, que permitan

obtener información por fuera del rango delimitado por las líneas IS9530 y RedlandB2 y poder ampliar el alcance de los resultados a nivel de la especie.

4.4. Interacción entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 mostraron que los factores de transcripción SbABI4 y SbABI5 (componentes de la señalización del ABA en semillas) tienen la capacidad de interactuar físicamente *in vitro* de manera específica con el promotor del gen *SbGA2ox3*, involucrado en el degradación de GAs activas. Estos resultados permiten concluir que durante la expresión de la dormición de granos de sorgo, la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs podrían tener puntos de contacto. Ello implica que los niveles de GAs activas durante la incubación de granos de sorgo podrían estar regulados por elementos pertenecientes a la vía de señalización del ABA. El hecho de haber hallado que estos dos elementos (SbABI4 y SbABI5) puedan unirse al promotor de *SbGA2ox3*, pero que no puedan hacerlo de manera simultánea, sugiere que podría existir un mecanismo de regulación fina, que permita modular la expresión del gen bajo distintas situaciones. Es decir, si los momentos de máxima producción de estos dos factores de transcripción en las células del embrión, durante la imbibición, no siguieran un patrón exactamente igual, ello otorgaría una cierta plasticidad para regular la transcripción del gen *SbGA2ox3* y la consecuente degradación de GAs activas, sin requerir la presencia de ambos factores de transcripción en forma simultánea para que esa regulación ocurra y así evitar la germinación de los granos dormidos. Esta idea se sustenta además en el hecho de que los posibles sitios de unión de SbABI4 y SbABI5 al promotor de *SbGA2ox3*, serían los mismos elementos, ABRE y CE, que conforman un ABRC, previamente identificado en numerosos promotores de genes regulados por ABA (Guiltinan et al., 1990; Hattori et al., 1995; Shen et al., 1996; Busk et al., 1997). En ese sentido, los niveles de proteína SbABI5 durante la incubación de granos de sorgo han sido evaluados por Rodríguez et al. (2009), pero aun resta medir la acumulación de proteína SbABI4 en esas mismas condiciones. A pesar de que es necesaria una corroboración *in vivo* de las interacciones detectadas, los resultados *in vitro* obtenidos en el tercer capítulo permitieron generar el modelo conceptual que se expone a continuación. Durante la incubación de semillas dormidas inmaduras, en las cuales la señalización del ABA está muy activa, SbABI4 o SbABI5 tendrían la capacidad de interactuar con el promotor de *SbGA2ox3*, induciendo su transcripción y provocando la acumulación de proteína SbGA2ox3. Esta proteína degradaría GAs activas ejerciendo un bloqueo a la germinación de granos inmaduros dormidos. En sentido contrario, durante la imbibición de granos inmaduros no dormidos, los componentes de la señalización del ABA son escasamente acumulados y por ende, el promotor de *SbGA2ox3* no podría ser inducido por SbABI5 o SbABI4, dando como resultado una acumulación de GAs activas producto de una menor inactivación, y la consecuente germinación. Sobre la base de los resultados obtenidos, es posible aceptar la segunda hipótesis planteada en esta tesis: “*Los factores de transcripción ABI4 (tipo AP2) y ABI5 (tipo bzip) interactúan in vitro con una porción de la región 5' regulatoria del gen que codifica para la GA 2-OXIDASA3 (SbGA 2-OXIDASA3), responsable de la inactivación de GAs activas en semillas de sorgo con dormición*”. La interacción entre ABI5 y ABI4 con el gen *SbGA2ox3* podría ser una de las explicaciones del elevado grado de dormición de la línea de sorgo IS9530, comparada con la línea RedlandB2: ABI5 y/o ABI4 regularían positivamente la expresión del gen *SbGA2ox3* y la GA 2-OXIDASA3 resultante sería responsable de degradar GAs activas en granos de sorgo con dormición.

Por otra parte, en este mismo capítulo, se mostraron resultados obtenidos a través de un análisis filogenético de genes de GA2oxidasas de distintas especies, a partir del cual se pudo observar que el ABRC (ABRE + CE) inicialmente identificado en la región promotora del gen *SbGA2ox3*, aparece como un módulo altamente conservado en algunas especies monocotiledóneas (*Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon* y *Oryza sativa*), pero ausente en dicotiledóneas. Las GA2oxs que presentaron el ABRC en sus promotores, fueron proteínas que comparten una similitud en su secuencia de aminoácidos, tal como lo demuestra el agrupamiento obtenido a través del análisis filogenético realizado. Estos resultados permiten sugerir que el mecanismo de *cross-talk* propuesto entre la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs en sorgo podría operar en otras especies, en las cuales al igual que en sorgo granífero, la sensibilidad al ABA, más que el contenido de ABA, estaría regulando el patrón de salida de dormición de las semillas.

4.5. Implicancias para futuras investigaciones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis surgen nuevos interrogantes que motorizan investigaciones futuras, tendientes a mejorar la comprensión de los mecanismos que operan durante la expresión de la dormición en semillas de sorgo granífero. Algunos de los interrogantes se plantean a continuación, acompañados de los posibles enfoques con los que se podrían intentar responder.

4.5.1. Corroboración de los QTL identificados y mapeo fino de los mismos

La identificación de QTL en esta tesis significó el primer paso en el estudio de la estructura genética de la dormición en cariopses de sorgo granífero. A continuación surge la necesidad de corroborar estos QTL identificados en distintos ambientes, es decir, poner a prueba la aparición de estos QTL de manera consistente. Ello permitirá discernir entre QTL que aparecen de manera repetida, bajo distintas condiciones ambientales, de aquellos que se hacen presentes únicamente bajo ciertas situaciones. Para abordar este objetivo en el futuro se generaron líneas endocriadas recombinantes (RILs) a partir de los individuos que formaron parte de la población de mapeo F_{2:3} utilizada en esta tesis. El carácter permanente de esta nueva población, permitirá realizar análisis de mapeo en distintos ambientes o bajo diversas condiciones, posibilitando además un aumento en el número de repeticiones, condición que su vez mejoraría el posicionamiento de los QTL, al disminuir la fuente de variación proveniente del error. Asimismo, se podría utilizar esta población de RILs para realizar un mapeo de QTL en granos inmaduros, utilizando alguna estrategia estadística alternativa a la utilizada en esta tesis. Una vez que se confirmen algunos o todos estos QTL, el paso siguiente será conocer la identidad de los polimorfismos responsables de esos QTL. Para lograrlo, se podría llevar a cabo un mapeo fino de esas regiones, a través de la utilización de poblaciones como NILs (near isogenic lines). Este tipo de poblaciones consisten en líneas con un mismo fondo genético, que difieren únicamente en la constitución alélica del fragmento del cromosoma correspondiente al QTL de interés. Debido a la ausencia de otros QTL segregando en simultáneo, el QTL de interés se vuelve la principal fuente de variación y se pueden obtener las medias fenotípicas de las clases genotípicas para el QTL. Bajo estas condiciones, el carácter se consideraría “mendelizarizado” (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000) y se podrían estimar las distancias entre el QTL y los marcadores más cercanos de manera más precisa, delimitando una región pequeña, cuya secuencia luego podría ser evaluada y comparada entre las líneas parentales, en busca de

los polimorfismos responsables de esos QTL. La construcción y evaluación de una población de NILs en sorgo no es una cuestión menor, y debería ser programada a largo plazo, ya que requiere de varias generaciones de cruzamientos, y un tamaño poblacional que supera ampliamente al evaluado en esta tesis, por lo que la fenotipificación, genotipificación y análisis de QTL también se verá notablemente magnificado.

4.2.5. *Cross-talk* entre señalización del ABA-catabolismo de GAs

A partir del mecanismo de acción propuesto para SbABI4/ABI5 y el promotor de *SbGA2ox3* en la determinación de distintos niveles de expresión de la dormición, los esfuerzos futuros deberían focalizarse en la posibilidad de que estas interacciones ocurran *in vivo*, (i.e. en embriones de cariopses de sorgo). Para poner a prueba esta posibilidad una estrategia posible sería realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguidos de PCR en tiempo real, en embriones inmaduros incubados provenientes de granos de la línea IS9530. Por otra parte, hasta el momento no se ha desarrollado un anticuerpo anti-SbABI4 para poder cuantificar los niveles de acumulación de esta proteína durante la imbibición, por lo cual resultaría apropiado llevar a cabo esa tarea, en paralelo a los ensayos de ChIP. En caso de llevar a cabo la técnica de inmunoprecipitación, se deberían diseñar anticuerpos apropiados, que tengan la capacidad de reconocer las formas nativas de SbABI4 y SbABI5, para lograr precipitar complejos ADN-proteína. Al mismo tiempo, se podrían llevar a cabo ensayos de simple híbrido, para identificar otros factores de transcripción expresados en embriones que interactúen con el promotor de *SbGA2ox3*. Los resultados de estos ensayos pueden sugerir proteínas de unión a este promotor hasta ahora desconocidas o factores de transcripción candidatos a regularlo junto con ABI4 y ABI5, como podría ser el caso de VP1/ABI3. Por otra parte, si bien es conocido que PKABA fosforila elementos de respuesta al ABA como ABI5 modulando su actividad (Johnson et al., 2002), emerge el interrogante de qué proteínas regulan la transcripción de los genes *SbABI4* y *SbABI5*. En ese sentido, Chen et al. (2008) informaron que la expresión de *AtABI5* es regulada positivamente por el factor de transcripción de tipo bZIP HY5 y recientemente Liu et al. (2012) mostraron que tres factores de transcripción de la familia WRKY tienen la capacidad de unirse a los promotores de *AtABI4* y *AtABI5* e inhibir su transcripción. Realizar análisis *in silico* de los promotores de *SbABI4* y *SbABI5* sería una primera aproximación para identificar posibles candidatos a estar regulando su transcripción, que luego deberían ser puestos a prueba con ensayos de unión *in vitro* e *in vivo*. Por último, se podría investigar si el mecanismo de interacción (señalización del ABA - catabolismo de GA) propuesto para sorgo, ocurre en las especies monocotiledóneas en las que se encontró el ABRC conservado (*Brachypodium distachyon* y arroz) y en las cuales al igual que en sorgo, la señalización del ABA y no el contenido de ABA, estaría controlando el nivel de dormición de las semillas. Estas especies, brindan la ventaja de tener disponibles poblaciones de mutantes de TILLING (*Targeting induced local lesions in genomes*), de las cuales se puede intentar adquirir mutantes que tengan afectados los genes *GA2ox* de interés (aquellos que mostraron tener un ABRC en su promotor) y realizar una caracterización fisiológica y molecular del comportamiento de dormición de las semillas, comparando los mutantes con el genotipo salvaje. La identificación de mutantes apropiados (en la región codificante y/o en el ABRC del promotor) no sólo aportaría información acerca de la expresión de la dormición en estas nuevas especies, sino que además aportaría evidencia genética de la importancia del catabolismo de GAs en la dormición y también del mecanismo de *cross-talk* ABA-GA propuesto para sorgo en esta tesis.

4.6. Aplicaciones futuras

Los resultados mostrados en esta tesis ahondaron en el conocimiento referido a las bases moleculares y genéticas que gobiernan la expresión de dormición en cereales, específicamente en sorgo granífero. Por un lado, la tesis aportó nuevas regiones del genoma de sorgo vinculadas a la expresión de la dormición, hasta ahora desconocidas. Si bien es necesario realizar una validación de los QTL para dormición que se encontraron en esta tesis, en caso de corroborarse y lograr acotar su tamaño, se podrían encontrar nuevos genes candidatos para dormición, que podrían ser sitios de manipulación genética. No se considera que los QTL puedan ser utilizados en planes de mejoramiento a través de selección asistida por marcadores (MAS) debido a que para caracteres como la dormición que están gobernados por muchos genes, se ha demostrado que esta metodología no suele ser demasiado exitosa. Alternativamente, la selección recurrente asistida por marcadores (MARS) aparece como una estrategia que ofrece mayores probabilidades de tener resultados exitosos (Bernardo et al., 2008). Mediante esta estrategia se busca enriquecer un fondo génico de interés agronómico con una sumatoria de QTL provenientes de una línea resistente al BPC, como IS9530, pero a diferencia de la MAS, cada QTL es ponderado de acuerdo a su efecto sobre el fenotipo, y se seleccionan recurrentemente (en varias generaciones de cruzamientos) aquellos individuos con mejor “performance”, sin focalizar el esfuerzo en que todos los alelos de interés estén presentes en esos individuos. De manera paralela, la identificación de los polimorfismos responsables de los QTL ofrecerá en un futuro genes candidatos que podrían ser manipulados en busca de ajustar el nivel de dormición de los genotipos a través de transgénesis. En esa dirección, los resultados de esta tesis refuerzan el rol preponderante que tiene la *SbGA2ox3* durante la expresión de la dormición de cariopses de sorgo, ofreciendo un blanco posible a manipular genéticamente para generar resistencia al BPC. En ese sentido es importante tener en cuenta que no es posible descartar un rol de *SbGA2ox3* en otros procesos del desarrollo de la planta, por lo cual posibles mutaciones podrían estar dirigidas a la secuencia correspondiente al ABRC del promotor, donde no se perdería la función de la proteína, sino que se afectaría su regulación a través de la vía del ABA. En su conjunto, la información generada en esta tesis aportó evidencias con significado biológico para la expresión de la dormición, pero además permite direccionar futuras investigaciones, en busca de adecuar la dinámica de la salida de la dormición en granos de sorgo.

4.7. Modelo integrado de los resultados obtenidos

En la figura 4.1 se muestra una integración de los componentes abordados en esta tesis, y su participación durante la dormición de cariopses embebidos. En los recuadros de doble línea se destacan los resultados aportados por la tesis, incorporados al marco conceptual general de la dormición en sorgo granífero. Los óvalos negros indican genes candidatos (o las proteínas codificadas por esos genes) y los signos de interrogación indican relaciones que deberían ser confirmadas en trabajos futuros. En ese contexto, la expresión de la dormición en sorgo granífero es un carácter típicamente continuo (cuantitativo), y como tal, está bajo la influencia de numerosos genes. En esta tesis se aportaron 3 QTL (*qDOR-5*, *qDOR-9* *qDOR-10*) que tendrían una participación en el origen genético de la variabilidad que se observa en la expresión de dormición de granos maduros. A partir de estas regiones genómicas se podrán identificar en trabajos futuros, los genes o los polimorfismos responsables. Pero al mismo tiempo, los QTL

identificados son una herramienta que puede ser incorporada en planes de mejoramiento a través de metodologías como MARS, y de esa forma poder manipular el nivel de dormición de los genotipos a través de una vía no transgénica. Asimismo, es posible enfocarse en genotipos que muestren un comportamiento de dormición ubicado en los extremos de esa distribución continua (como lo son las líneas parentales utilizadas en esta tesis), analizar las causas fisiológicas de ese diferente patrón de dormición y ahondar luego en la búsqueda de genes candidatos responsables en última instancia de esas diferencias. En ese sentido, la señalización del ABA y el metabolismo de las GAs parecen ser los procesos que mejor explican esas diferencias genotípicas en sorgo granífero. En esta tesis se propuso un *cross-talk* entre esas dos vías, a través de la interacción física entre ABI5 y ABI4 con el ABRC del promotor de *GA2ox3*, que conduciría a la degradación de GAs activas y el consecuente bloqueo de la germinación en granos inmaduros. Asimismo, se sugiere que este mecanismo podría funcionar en monocotiledóneas como *Oryza sativa* o *Brachypodium distachyon*, pero aun resta encontrar evidencias fisiológicas y moleculares que lo demuestren. Los distintos enfoques que se utilizaron en el transcurso de esta tesis indican que posiblemente algunos de los genes que operan durante la dormición en granos embebidos inmaduros sea diferente a los que operan en granos maduros, pero otros componentes podrían tener una función relevante en ambas situaciones. En ese sentido, nuevos análisis de QTL en ambientes adicionales permitirán evaluar por ejemplo si es factible que ABI5 tenga un rol en el bloqueo de la germinación en granos maduros.

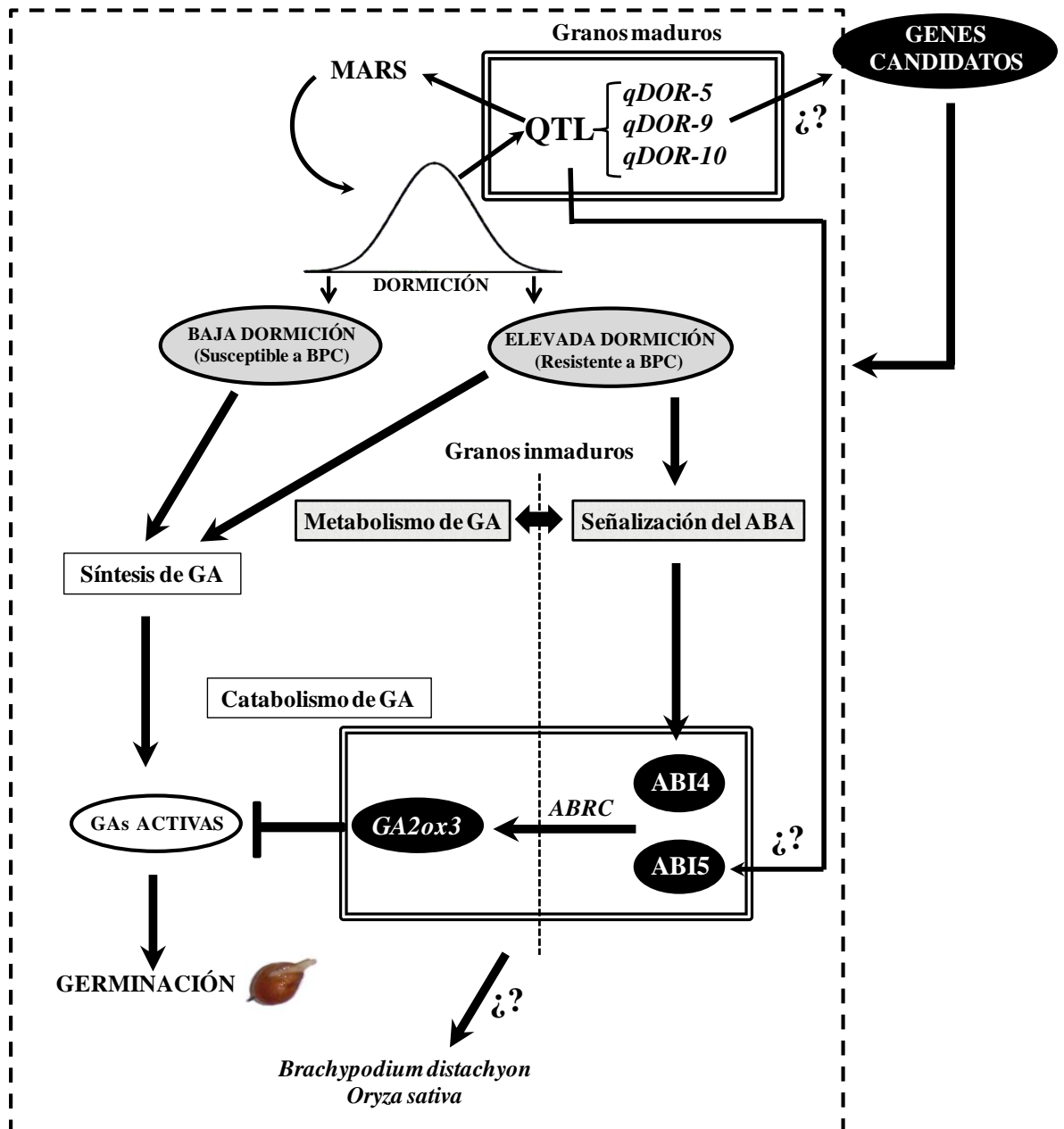


Figura 4.1. Modelo donde se muestran los distintos abordajes y los componentes resultantes, que tendrían un rol en la expresión de la dormición en cariopses de sorgo. En los recuadros de doble línea se indican los mecanismos puntuales evaluados en esta tesis. Los recuadros con fondo gris claro contienen los componentes fisiológicos que mejor explican las diferencias en dormición en sorgo (metabolismo de GAs y señalización del ABA) Los óvalos negros representan genes (o proteínas) candidatos evaluados y cuya expresión se correlacionó con el nivel de dormición en ambas líneas de sorgo. Los signos de interrogación señalan vínculos o mecanismos que fueron sugeridos en esta tesis, pero aún resta ponerlos a prueba. Para ver una explicación detallada del modelo, ver la sección 4.7 del presente capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C., Blankestijn-de Vries, H., Koornneef, M., 2003. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 164, 711-729.
2. Alonso-Blanco, C., Koornneef, M., 2000. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in plant science* 5, 22-29.
3. Anderson, J.A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., 1993. Detection of QTLs affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat by RFLPs. *Crop Science*. 33, 453-459.
4. Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* 37, W202-W208.
5. Barrero, J.M., Jacobsen, J.V., Talbot, M.J., White, R.G., Swain, S.M., Garvin, D.F., Gubler, F., 2012. Grain dormancy and light quality effects on germination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *New Phytologist* 193, 376-386.
6. Baskin, J.M., Baskin, C.C., 1998. In: Baskin JM, B.C. (Ed.), *Seeds, Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy, and Germination*. Academic Press, San Diego.
7. Baskin, J.M., Baskin, C.C., 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14, 1-16.
8. Benech-Arnold, R.L., Cristina Giallorenzi, M., Frank, J., Rodriguez, V., 1999. Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed Science Research* 9, 39-47.
9. Benech-Arnold, R.L., Enciso, S., Sánchez, R.A., Rodríguez, M.V., 2003. On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum (*S. bicolor*) caryopses. *New Phytologist* 160, 371-377.
10. Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., Forcella, F., Kruk, B.C., Ghersa, C.M., 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research* 67, 105-122.
11. Benech Arnold, R.L., 2006. Preharvest sprouting: the phenomenon. In: J.D. Bewley, M.B.a.P.H.e. (Ed.), *Encyclopedia of Seeds. Science, Technology and Uses*. CAB International., Oxon, Wallingford, UK
12. Benech Arnold, R.L., Fenner, M., Edwards, P.J., 1991. Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *New Phytologist* 118, 339-347.
13. Bentsink, L., Hanson, J., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H., Coltrane, C., Keizer, P., El-Lithy, M., Alonso-Blanco, C., de Andrés, M.T., Reymond, M., van Eeuwijk, F., Smeekens, S., Koornneef, M., 2010. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 4264-4269.
14. Bentsink, L., Koornneef, M., 2002. Seed dormancy and germination. In: C.R. Somerville and E.M., M. (Ed.), *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1-18.

15. Bentsink, L., Soppe, W., Koornneef, M., 2007. Genetic Aspects of Seed Dormancy. Annual Plant Reviews Volume 27: Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell Publishing Ltd, pp. 113-132.
16. Bentsink, L.n., Jowett, J., Hanhart, C.J., Koornneef, M., 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 17042-17047.
17. Bernardo, R., 2008. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the Last 20 Years All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Permission for printing and for reprinting the material contained herein has been obtained by the publisher. Crop Sci. 48, 1649-1664.
18. Bewley, J.D., 1997. Seed Germination and Dormancy. Plant Cell 9, 1055-1066.
19. Bhatramakki, D., Dong, J., Chhabra, A.K., Hart, G.E., 2000. An integrated SSR and RFLP linkage map of Sorghum bicolor (L.) Moench. Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada 43, 988-1002.
20. Brocard-Gifford, I.s.M., Lynch, T.J., Finkelstein, R.R., 2003. Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscisic Acid, Sugar, and Light Signaling. Plant Physiology 131, 78-92.
21. Busk, P.K., Jensen, A.B., Pagès, M., 1997. Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize. The Plant Journal 11, 1285-1295.
22. Busk, P.K., Pagès, M., 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant Molecular Biology 37, 425-435.
23. Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W.M., Finch-Savage, W.E., 2006. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. The Plant Journal 46, 805-822.
24. Cai, H., Morishima, H., 2002. QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. Theoretical and Applied Genetics 104, 1217-1228.
25. Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., M. Léon-Kloosterziel, K., Koornneef, M., Echeverria, Delseny, M., 2002. Regulation of Arabidopsis thaliana Em genes: role of ABI5. The Plant Journal 30, 373-383.
26. Carrari, F., Perez-Flores, L., Lijavetzky, D., Enciso, S., Sanchez, R., Benech-Arnold, R., Iusem, N. 2003. Plant Molecular Biology 45(6), 631-640.
27. Carrari, F., Benech-Arnold R., Osuna-Fernandez, R., Hopp, E., Sanchez, R., Iusem, N., Kijavetzky, D. 2003. Genetic mapping of the Sorghum bicolor vp1 gene and its relationship with preharvest sprouting resistance. Genome 46(2), 253-258.
28. Casaretto, J., Ho, T.-h.D., 2003. The Transcription Factors HvABI5 and HvVP1 Are Required for the Abscisic Acid Induction of Gene Expression in Barley Aleurone Cells. Plant Cell 15, 271-284.
29. Castor, L.L., Frederiksen, R.A., 1977. Seed moulding of grain sorghum: is caused by Fusarium and Curvularia. Proceedings of the Annual Phytopathology Society 4, 151.
30. Clercx, E.J.M., El-Lithy, M.E., Vierling, E., Ruys, G.J., Blankestijn-De Vries, H., Groot, S.P.C., Vreugdenhil, D., Koornneef, M., 2004. Analysis of Natural Allelic Variation of Arabidopsis Seed Germination and Seed Longevity Traits

- between the Accessions Landsberg erecta and Shakdara, Using a New Recombinant Inbred Line Population. *Plant Physiol.* 135, 432-443.
31. Chandrasekharan, M.B., Bishop, K.J., Hall, T.C., 2003. Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *The Plant Journal* 33, 853-866.
 32. Chen, H., Zhang, J., Neff, M.M., Hong, S.-W., Zhang, H., Deng, X.-W., Xiong, L., 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 4495-4500.
 33. Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-971.
 34. Daszkowska-Golec, A., Szarejko, I., 2013. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought.
 35. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2010. InfoStat, versión 2010. In: Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba (Ed.), Argentina.
 36. Ezcurra, I., Ellerström, M., Wycliffe, P., Stålberg, K., Rask, L., 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 Molecular Biology* 40, 699-709.
 37. Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501-523.
 38. Finkelstein, R., 1994. Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the abi3 mutations. *The Plant Journal* 5, 765-771.
 39. Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., Steber, C., 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy*. *Annual Review of Plant Biology* 59, 387-415.
 40. Finkelstein, R.R., Lynch, T.J., 2000. The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *Plant Cell* 12, 599-610.
 41. Finkelstein, R.R., Rock, C.D., 2002. Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, e0058.
 42. Finkelstein, R.R., Somerville, C.R., 1990. Three Classes of Abscisic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of Arabidopsis Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses. *Plant Physiology* 94, 1172-1179.
 43. Flintham, J.E., 2000. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. *Seed Science Research* 10, 43-50.
 44. Gianinetti, A., Vernieri, P., 2007. On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. *Journal of Experimental Botany* 58, 3449-3462.
 45. Gosti, F.o., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A.R., Vartanian, N., Giraudat, J.r.m., 1999. ABI1 Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell Online* 11, 1897-1909.
 46. Groos, C., Gay, G., Perretant, M.R., Gervais, L., Bernard, M., Dedryver, F., Charmet, G., 2002. Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white-red grain bread-wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 39-47.
 47. Groot, S.P.C., Karssen, C.M., 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171, 525-531.

48. Groot, S.P.C., Karssen, C.M., 1992. Dormancy and Germination of Abscisic Acid-Deficient Tomato Seeds : Studies with the *sitiens* Mutant. *Plant Physiol.* 99, 952-958.
49. Gualano, N., Carrari, F., Verónica Rodríguez, M., Pérez-Flores, L., Sánchez, R., Iusem, N., Benech-Arnold, R., 2007. Reduced embryo sensitivity to abscisic acid in a sprouting-susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with altered ABA signalling. *Seed Science Research* 17, 81-90.
50. Guiltinan, M., Marcotte, W., Quatrano, R., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271.
51. Han, F., Ullrich, S.E., Clancy, J.A., Jitkov, V., Kilian, A., Romagosa, I., 1996. Verification of barley seed dormancy loci via linked molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 87-91.
52. Hattori, T., Terada, T., Hamasuna, S., 1995. Regulation of the *Osem* gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *The Plant Journal* 7, 913-925.
53. Haussmann, Haussmann, B., Mahalakshmi, Mahalakshmi, V., Reddy, Reddy, B., Seetharama, Seetharama, N., Hash, Hash, C., Geiger, Geiger, H., 2002. QTL mapping of stay-green in two sorghum recombinant inbred populations. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106, 133-142.
54. Hedden, P., Phillips, A.L., 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in plant science* 5, 523-530.
55. Hilhorst, H.W.M., 1997. Seed dormancy. *Seed Science Research* 7, 221-223.
56. Hilhorst, H.W.M., Karssen, C.M., 1992. Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regul* 11, 225-238.
57. Himmelbach, A., Yang, Y., Grill, E., 2003. Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 470-479.
58. Hofmann, P., Steiner, A.M., 1994. Seed quality as cause for differences in longevity behaviour after seed pretreatment in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Science Research* 4, 323-328.
59. Holdsworth, M.J., Finch-Savage, W.E., Grappin, P., Job, D., 2008. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends in plant science* 13, 7-13.
60. Hori, K., Sato, K., Takeda, K., 2007. Detection of seed dormancy QTL in multiple mapping populations derived from crosses involving novel barley germplasm. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 115, 869-876.
61. Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
62. Imtiaz, M., Ogbonnaya, F.C., Oman, J., van Ginkel, M., 2008. Characterization of Quantitative Trait Loci Controlling Genetic Variation for Preharvest Sprouting in Synthetic Backcross-Derived Wheat Lines. *Genetics* 178, 1725-1736.
63. Jansen, R.C., 1994. Controlling the Type I and Type II Errors in Mapping Quantitative Trait Loci. *Genetics* 138, 871-881.
64. Jiang, C., Zeng, Z.B., 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140, 1111-1127.
65. Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D., Walker-Simmons, M.K., 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 Physiology* 130, 837-846.
66. Karsen, C.M., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., Breekland, A.E., Koornneef, M., 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 157, 158-165.
 67. Kim, M., Kim, J.-K., Shin, J., Suh, M., 2007. The SebHLH transcription factor mediates trans-activation of the SeFAD2 gene promoter through binding to E- and G-box elements. *Plant Molecular Biology* 64, 453-466.
 68. Koornneef, M., Reuling, G., Karsen, C.M., 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61, 377-383.
 69. Koornneef, M., Van der Veen, J.H., 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. . *Theoretical and Applied Genetics* 58, 257-263.
 70. Kosambi, D.D., 1943. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12, 172-175.
 71. Kronholm, I., Picó, F.X., Alonso-Blanco, C., Goudet, J., Meaux, J.d., 2012. Genetic basis of adaptation in *Arabidopsis Thaliana*: local adaptation at the seed dormancy QTL DOG1. *Evolution* 66, 2287-2302.
 72. Lander, E.S., Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199.
 73. Lander, E.S., Schork, N.J., 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2047.
 74. Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., 2005. Molecular Cloning of GA 2-Oxidase3 from Spinach and Its Ectopic Expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology* 138, 243-254.
 75. Lee, K.P., Piskurewicz, U., Tureškov, V., Carat, S., Chappuis, R., Strnad, M., Fankhauser, C., Lopez-Molina, L., 2012. Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes & Development* 26, 1984-1996.
 76. Lijavetzky, D., Carolina Martínez, M., Carrari, F., Esteban Hopp, H., 2000. QTL analysis and mapping of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum*. *Euphytica* 112, 125-135.
 77. Lin, S.Y., Sasaki, T., Yano, M., 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 96, 997-1003.
 78. Liu, Z.-Q., Yan, L., Wu, Z., Mei, C., Lu, K., Yu, Y.-T., Liang, S., Zhang, X.-F., Wang, X.-F., Zhang, D.-P., Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes ABI4 and ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63, 6371-6392.
 79. Liu, Z.-Q., Yan, L., Wu, Z., Mei, C., Lu, K., Yu, Y.-T., Liang, S., Zhang, X.-F., Wang, X.-F., Zhang, D.-P., 2012. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes ABI4 and ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63, 6371-6392.
 80. Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Chua, N.-H., 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the

- ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4782-4787.
81. Mace, E.S., Rami, J.F., Bouchet, S., Klein, P.E., Klein, R.R., Kilian, A., Wenzl, P., Xia, L., Halloran, K., Jordan, D.R., 2009. A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput diversity array technology (DArT) markers. *BMC Plant Biology* 9, 13.
 82. Menz, M.A., Klein, R.R., Unruh, N.C., Rooney, W.L., Klein, P.E., Mullet, J.E., 2004. Genetic Diversity of Public Inbreds of Sorghum Determined by Mapped AFLP and SSR Markers. *Crop Sci* 44, 1236-1244.
 83. Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J., 2001. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal* 25, 295-303.
 84. Miura, K., Lin, S., Yano, M., Nagamine, T., 2002. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 981-986.
 85. Mori, M., Uchino, N., Chono, M., Kato, K., Miura, H., 2005. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and the group 4 chromosomes, and their combined effect. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1315-1323.
 86. Nakamura, S., Abe, F., Kawahigashi, H., Nakazono, K., Tagiri, A., Matsumoto, T., Utsugi, S., Ogawa, T., Handa, H., Ishida, H., Mori, M., Kawaura, K., Ogihara, Y., Miura, H., 2011. A Wheat Homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 Acts in the Regulation of Germination. *The Plant Cell Online*.
 87. Nakamura, S., Komatsuda, T., Miura, H., 2007. Mapping diploid wheat homologues of Arabidopsis seed ABA signaling genes and QTLs for seed dormancy. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 1129-1139.
 88. Nambara, E., Marion-Poll, A., 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends in plant science* 8, 213-217.
 89. Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., Kamiya, Y., 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* 20, 55-67.
 90. Niu, X., Helentjaris, T., Bate, N.J., 2002. Maize ABI4 Binds Coupling Element1 in Abscisic Acid and Sugar Response Genes. *Plant Cell* 14, 2565-2575.
 91. Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., 2003. Gibberellin Biosynthesis and Response during Arabidopsis Seed Germination. *The Plant Cell Online* 15, 1591-1604.
 92. Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.-S., Sun, T.-p., Kamiya, Y., Choi, G., 2007. PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* 19, 1192-1208.
 93. Ono, A., Izawa, T., Chua, N.H., Shimamoto, K., 1996. The rab16B Promoter of Rice Contains Two Distinct Abscisic Acid-Responsive Elements. *Plant Physiology* 112, 483-491.
 94. Ooms, J.J.J., Leon-Kloosterziel, K.M., Bartels, D., Koornneef, M., Karssen, C.M., 1993. Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity in Seeds of Arabidopsis thaliana (A Comparative Study Using Abscisic Acid-Insensitive abi3 Mutants). *Plant Physiology* 102, 1185-1191.
 95. Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., Giraudat, J., 1994. Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *The Plant Cell Online* 6, 1567-1582.

96. Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.-f.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.-K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., Cutler, S.R., 2009. Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324, 1068-1071.
97. Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberler, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Otiillar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob ur, R., Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S., 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457, 551-556.
98. Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S., Graham, I.A., 2006. Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 Regulates Lipid Mobilization in the Embryo and Reveals Repression of Seed Germination by the Endosperm. *The Plant Cell Online* 18, 1887-1899.
99. Perez-Flores, L., Carrari, F., Osuna-Fernandez, R., Rodriguez, M.V., Enciso, S., Stanelloni, R., Sanchez, R.A., Bottini, R., Iusem, N.D., Benech-Arnold, R.L., 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, 2071-2079.
100. Picot, E., Krusche, P., Tiskin, A., Carré, I., Ott, S., 2010. Evolutionary analysis of regulatory sequences (EARS) in plants. *The Plant Journal* 64, 165-176.
101. Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., Lopez-Molina, L., 2008. The Gibberellic Acid Signaling Repressor RGL2 Inhibits Arabidopsis Seed Germination by Stimulating Abscisic Acid Synthesis and ABI5 Activity. *Plant Cell* 20, 2729-2745.
102. Powell, W., Machray, G.C., Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science* 1, 215-222.
103. Prada, D., Ullrich, S.E., Molina-Cano, J.L., Cistué, L., Clancy, J.A., Romagosa, I., 2004. Genetic control of dormancy in a Triumph/Morex cross in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 62-70.
104. Ramu, P., Kassahun, B., Senthilvel, S., Ashok Kumar, C., Jayashree, B., Folkertsma, R.T., Reddy, L.A., Kuruvinashetti, M.S., Haussmann, B.I.G., Hash, C.T., 2009. Exploiting rice's "sorghum synteny for targeted development of EST-SSRs to enrich the sorghum genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 119, 1193-1204.
105. Reeves, W., Lynch, T., Mobin, R., Finkelstein, R., 2011. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Molecular Biology* 75, 347-363.
106. Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P., 2008. The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *The Plant Journal* 53, 488-504.

107. Rodríguez, M.V., 2008. Bases fisiológicas y moleculares de la dormición en cariopses de sorgo granífero: indetificación de sitios regulatorios del metabolismo de giberelinas y de la sensibilidad al ABA. Tesis doctoral.
108. Rodríguez, M.V., Margineda, M., González-Martín, J.F., Insausti, P., Benech-Arnold, R.L., 2001. Predicting Preharvest Sprouting Susceptibility in Barley: A Model Based on Temperature during Grain Filling. *Agronomy Journal* 93, 1071-1079.
109. Rodríguez, M.V., Mendiondo, G.M., Cantoro, R., Auge, G.A., Luna, V., Masciarelli, O., Benech-Arnold, R.L., 2012. Expression of Seed Dormancy in Grain Sorghum Lines with Contrasting Pre-Harvest Sprouting Behavior Involves Differential Regulation of Gibberellin Metabolism Genes. *Plant and Cell Physiology* 53, 64-80.
110. Rodríguez, M.V., Mendiondo, G.M., Maskin, L., Gudesblat, G.E., Iusem, N.D., Benech-Arnold, R.L., 2009. Expression of ABA signalling genes and ABI5 protein levels in imbibed Sorghum bicolor caryopses with contrasting dormancy and at different developmental stages. *Ann Bot* 104, 975-985.
111. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
112. Satish, K., Srinivas, G., Madhusudhana, R., Padmaja, P.G., Nagaraja Reddy, R., Murali Mohan, S., Seetharama, N., 2009. Identification of quantitative trait loci for resistance to shoot fly in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics* 119, 1425-1439.
113. Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.-p., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Nambara, E., 2006. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* 48, 354-366.
114. Shen, Q., Casaretto, J., Zhang, P., Ho, T.-H., 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 Molecular Biology* 54, 111-124.
115. Shen, Q., Ho, T.H.D., 1995. Functional Dissection of an Abscisic Acid (ABA)-Inducible Gene Reveals Two Independent ABA-Responsive Complexes Each Containing a G-Box and a Novel cis-Acting Element. *Plant Cell* 7, 295-307.
116. Shen, Q., Zhang, P., Ho, T.H.D., 1996. Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *Plant Cell* 8, 1107-1119.
117. Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58, 221-227.
118. Silady, R.A., Effgen, S., Koornneef, M., Reymond, M., 2011. Variation in Seed Dormancy Quantitative Trait Loci in Arabidopsis thaliana Originating from One Site. *Plos One* 6, e20886.
119. Stalberg, K., Ellerstöm, M., Ezcurra, I., Ablov, S., Rask, L., 1996. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta* 199, 515-519.
120. Steinbach, H.S., Benech-Arnold, R.L., Kristof, G., Sanchez, R.A., Marcucci-Poltri, S., 1995. Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in

- Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting-resistant and -susceptible varieties. *J. Exp. Bot.* 46, 701-709.
121. Steinbach, H.S., Benecch-Arnold, R.L., Sanchez, R.A., 1997. Hormonal Regulation of Dormancy in Developing Sorghum Seeds. *Plant Physiol.* 113, 149-154.
 122. Sugimoto, K., Takeuchi, Y., Ebana, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hara, N., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Ban, Y., Hattori, T., Yano, M., 2010. Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5792-5797.
 123. Suzuki, A., Suzuki, T., Tanabe, F., Toki, S., Haruhiko, W., Wu, C.-Y., Takaiwa, F., 1997. Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* 198, 393-398.
 124. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
 125. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic acids research* 25, 4876-4882.
 126. Van Ooijen, J.W., 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics* 84, 803-811.
 127. Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E., 2001. JoinMap 3.0 Software for the calculation of genetic linkage maps. In: International, P.R. (Ed.), Wageningen, Netherlands.
 128. von Rohr, P., Hoeschele, I., 2002. Bayesian QTL mapping using skewed Student-t distributions. *Genetics Selection Evolution* 34, 1 - 21.
 129. Walker-Simmons, M., 1987. ABA Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. *Plant Physiol.* 84, 61-66.
 130. Wan, J.M., Cao, Y.J., Wang, C.M., Ikehashi, H., 2005. Quantitative Trait Loci Associated with Seed Dormancy in Rice. *Crop Sci* 45, 712-716.
 131. Wang, S., Basten, C.J., Z.B., Z., 2006. Windows QTL Cartographer 2.5. . In: Department of Statistics, N.C.S.U. (Ed.), Raleigh, NC.
 132. Watson, J.C., Thompson, W.F., 1986. Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Methods Enzymol.* 118
 133. 57-75.
 134. White, C.N., Proebsting, W.M., Hedden, P., Rivin, C.J., 2000. Gibberellins and Seed Development in Maize. I. Evidence That Gibberellin/Abscisic Acid Balance Governs Germination versus Maturation Pathways. *Plant Physiol.* 122, 1081-1088.
 135. Wu, C.-Y., Washida, H., Onodera, Y., Harada, K., Takaiwa, F., 2000. Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *The Plant Journal* 23, 415-421.
 136. Yonemaru, J., Ando, T., Mizubayashi, T., Kasuga, S., Matsumoto, T., Yano, M., 2009. Development of genome-wide simple sequence repeat markers using whole-genome shotgun sequences of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *DNA Research* 16, 187-193.

137. Zeng, Z.B., 1993. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10972-10976.
138. Zeng, Z.B., 1994. Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136, 1457-1468.

APÉNDICE

Tabla suplementaria 2.1. Genes candidatos vinculados al metabolismo de las giberelinas o a la señalización del ABA. Se muestran los códigos de identificación y ubicación en el genoma para cada uno de ellos.

Gen	Código de identificación	Ubicación
<i>ABI1</i>	Sobic.009G213000	Chr09: 55864627 - 55867488
<i>ABI2</i>	Sobic.003G198200	Chr03: 52436269 - 52441575
<i>ABI3</i>	Sobic.003G398200	Chr03: 70784295 - 70789518
<i>ABI4</i>	Sobic.009G103800	Chr09: 41717837 - 41718610
<i>ABI5</i>	Sobic.004G309600	Chr04: 63980825 - 63985039
<i>pKABA</i>	Sobic.006G279100	Chr06: 61855891 - 61857741
<i>GA2ox2</i>	Sobic.009G142400	Chr09: 50000656 - 50005651
<i>GA2ox1</i>	Sobic.001G005300	Chr01: 450531 - 452935
<i>GA2ox3</i>	Sobic.003G379500	Chr03: 69354859 - 69357641
<i>GA3ox1</i>	Sobic.003G045900	Chr03: 4213496 - 4215999
<i>GA3ox2</i>	Sobic.009G064700	Chr09: 6922298 - 6923624
<i>SbGID1</i>	Sobic.009G134600	Chr09: 48980261 - 48983253
<i>SbEKO</i>	Sobic.010G172700	Chr10: 50476551 - 50482229
<i>SbEKAH</i>	Sobic.010G007700	Chr10: 616990 - 621030
<i>GA2ox1</i>	Sobic.009G053700	Chr09: 5482618 - 5487585
<i>GA2ox2</i>	Sobic.003G154100	Chr03: 16728989 - 16735073
<i>GA2ox3</i>	Sobic.003G300800	Chr03: 63204531 - 63207037

Tabla suplementaria 2.2. Marcadores microsatélites utilizados para la construcción del mapa de ligamiento. Se muestra el código tal como se informó en la tesis, el código público correspondiente y los primers utilizados para su amplificación.

Código	Código público	Forward primer	Reverse primer
<i>SgMS0001</i>	<i>Xtxp1</i>	TTGGCTTTTGTGGAGCTG	ACCCAGCAGCACTACACTAC
<i>SgMS0003</i>	<i>Xtxp4</i>	AATACTAGGTGTCAGGGCTGTG	ATGTAACCGCAACAACCAAG
<i>SgMS0008</i>	<i>Xtxp10</i>	ATACTATCAAGAGGGGAGC	AGTACTAGCCACACGTCAC
<i>SgMS0009</i>	<i>Xtxp11</i>	TCGAGAAATTC AACATGCTG	GCTAGACCGACGAGATAAG
<i>SgMS0012</i>	<i>Xtxp14</i>	GTAATAGTCATGACCGAGG	TAATAGACGAGTGAAAGCCC
<i>SgMS0016</i>	<i>Xtxp18</i>	ACTGTCTAGAACAAGCTGCG	TTGCTCTAGCTAGGCATTTC
<i>SgMS0017</i>	<i>Xtxp19</i>	CTTCAATCGGTTCCAGAC	CTTCCACCTCCGTA CT
<i>SgMS0018</i>	<i>Xtxp20</i>	TCTCAAGGTTTGTATGGTTGG	ACCCATTATTGACCGTTGAG
<i>SgMS0027</i>	<i>Xtxp29</i>	TAGGGCAGTGGTTAGTCGTG	TACAAGTGGTGGTCCGAGG
<i>SgMS0035</i>	<i>Xtxp38</i>	ACAAACCGCGACGAAGTAAC	ACAAGGCAAAGCACAAAGC
<i>SgMS0040</i>	<i>Xtxp45</i>	CTCGGCGGCTCCCTCTC	GGTCAAAGCGCTCTCTCTCTC
<i>SgMS0041</i>	<i>Xtxp46</i>	GGGCAATCTTGATGGCGACAT	AGGTGTGGCTCGGGGAGAAC
<i>SgMS0042</i>	<i>Xtxp47</i>	CAATGGCTTGACATGTCCTA	GGTGCAGCTAGTTAAGTGGG
<i>SgMS0044</i>	<i>Xtxp50</i>	TGATGTTGTTACCCTTCTGG	AGCCTATGTATGTGTTCTGTC
<i>SgMS0053</i>	<i>Xtxp61</i>	GATGCCCATGCCTTGC	CCCCTAACTAAAGCGGACA
<i>SgMS0054</i>	<i>Xtxp63</i>	CCAACCGCGTCGCTGATG	GTGGACTCTGTGGGGCACTG
<i>SgMS0055</i>	<i>Xtxp65</i>	CACGTCGTCACCAACCAA	GTTAAACGAAAGGGAAATGGC
<i>SgMS0059</i>	<i>Xtxp71</i>	CATAACGGCCGGAAGCAGTG	TTGTCCATGACCCTCCACAG
<i>SgMS0060</i>	<i>Xtxp72</i>	TTATGGAAGCAAAATGAC	CGAATCTTAATTGAGGTAAGC
<i>SgMS0062</i>	<i>Xtxp77</i>	ACTGGACGTATGGCATTATTG	TGCAGGACAGTAGCGTAGG
<i>SgMS0065</i>	<i>Xtxp80</i>	GCTGCACTGTCCTCCACAA	CAGCAGGCGATATGGATGAGC
<i>SgMS0071</i>	<i>Xtxp88</i>	CGTGAATCAGCGAGTGTGG	TGCGTAATGTTCTGCTC
<i>SgMS0078</i>	<i>Xtxp96</i>	GCTGATGTCATGTTCCCTCAC	CATTCTGGACTCTGTGCGG
<i>SgMS0087</i>	<i>Xtxp107</i>	CAAAGTGAGCGTGGTC	GGACAGGGATAACATAACATA
<i>SgMS0095</i>	<i>Xtxp123</i>	TCGGCGAGCATCTTACA	TACGTAGCGGTTGGATT
<i>SgMS0098</i>	<i>Xtxp130</i>	TGGGAAGCAGCTCAGG	AGGGTGGTATGTAGGGA
<i>SgMS0102</i>	<i>Xtxp136</i>	GCGAATAGCATCTTACAACA	ACTGATCATTGGCAGGAC
<i>SgMS0106</i>	<i>Xtxp145</i>	GTTCCTCCTGCCATTACT	CTTCCGCACATCCAC
<i>SgMS0112</i>	<i>Xtxp159</i>	ACCCAAAGCCCAAATCAG	GGGGGAGAAACGGTGAG
<i>SgMS0118</i>	<i>Xtxp177</i>	GCCGTTGTGACTTG	TTAAAGCGATGGGTGTAG
<i>SgMS0125</i>	<i>Xtxp204</i>	TCGTGCGGTCATCGTGT	GCATGTGCCACAAGATTCAA
<i>SgMS0129</i>	<i>Xtxp210</i>	CGTTTTCTGAAAATATTAAGGAC	GATGAGCGATGGAGGAGAG
<i>SgMS0130</i>	<i>Xtxp211</i>	TCAACGGCCAATGATTTCTAAC	AGGTTGCGAATAAAAAGGTAATGTG
<i>SgMS0137</i>	<i>Xtxp218</i>	CCGAAAACCTGCTACTG	ACGCCGGAAGGAGAAG
<i>SgMS0139</i>	<i>Xtxp221</i>	GCAACGGGAACCAAAA	TGACGACGGCGAGAG
<i>SgMS0145</i>	<i>Xtxp230</i>	GCTACCGCTGCTGCTCT	AGGGGGCATCCAAGAAAT
<i>SgMS0152</i>	<i>Xtxp262</i>	TGCCTGCCCGACCTG	TTGCTGTCTCCGCTTTCC
<i>SgMS0157</i>	<i>Xtxp270</i>	AGCAAGAAGAAGGCAAGAAGAAGG	GCGAAATTATTTGAAATGGAGTTGA
<i>SgMS0165</i>	<i>Xtxp285</i>	ATTTGATTCTTCTTGCTTTGCTTGT	TTGTCATTTCCCTTCTTTCTTTT

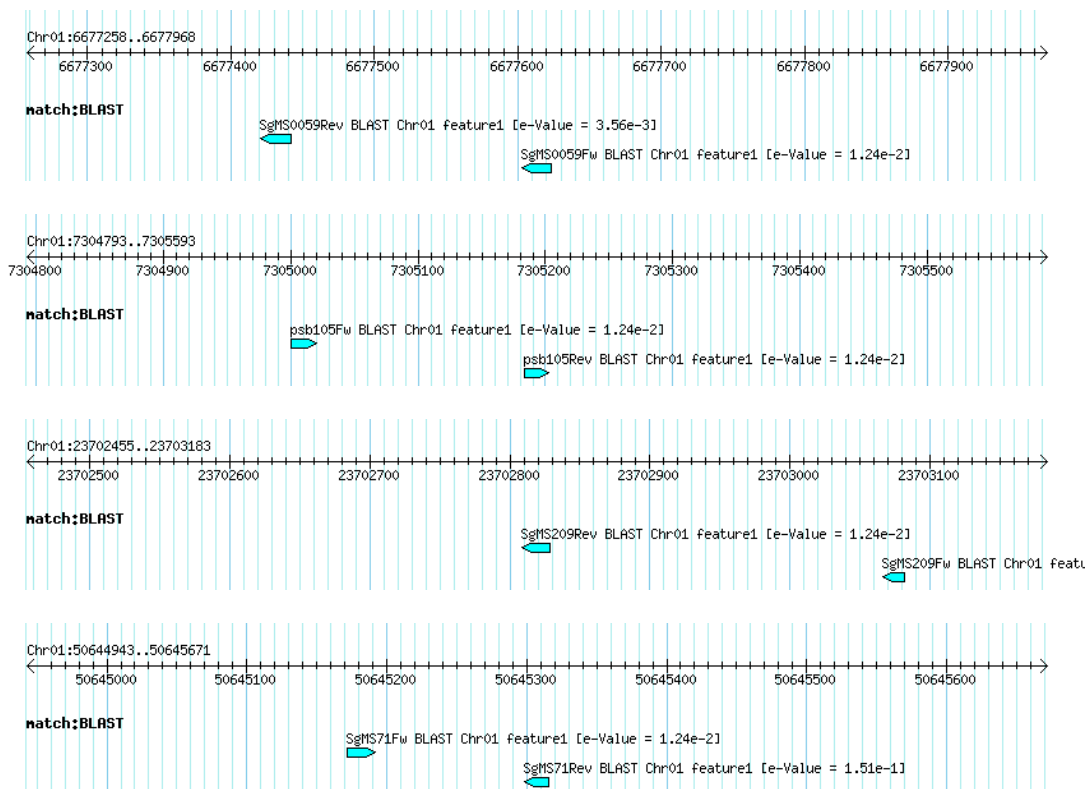
<i>SgMS0166</i>	<i>Xtxp286</i>	AGCAGCAGCAGCAACAG	GCGTGGTCTTTGTGGTTC
<i>SgMS0173</i>	<i>Xtxp295</i>	AAATCATGCATCCATGTTCTGCTTC	CTCCCCTACAAGAGTACATTCATAGCTTA
<i>SgMS0175</i>	<i>Xtxp297</i>	GACCCATATGTGGTTTAGTCGCAAAG	GCACAATCTTCGCCTAAATCAACAAT
<i>SgMS0176</i>	<i>Xtxp298</i>	GCATGTGTCAGATGATCTGGTGA	GCTGTTAGCTTCTTCTAATCGTCGGT
<i>SgMS0179</i>	<i>Xtxp303</i>	AATGAGGAAAATATGAAACAAGTACCAA	AATAACAAGCGCAACTATATGAACAATAAA
<i>SgMS0182</i>	<i>Xtxp312</i>	CAGGAAAATACGATCCGTGCCAAGT	GTGAACTATTCCGGAAGAAGTTTGGAGGAAA
<i>SgMS0184</i>	<i>Xtxp316</i>	CCAGCTTCACTTACGAGGAGATG	ATGCCCGTTTTCTAATCTTCTACT
<i>SgMS0187</i>	<i>Xtxp321</i>	TAACCCAAGCCTGAGCATAAGA	CCCATTACACATGAGACGAG
<i>SgMS0189</i>	<i>Xtxp324</i>	GCAAGAGTAACCTGCATTAATAA	ACATAACACAAGCAGGGAGAG
<i>SgMS0191</i>	<i>Xtxp327</i>	ACCACTGCTCACGCTCAC	GCGGTGTACAGCTTCGTC
<i>SgMS0191</i>	<i>Xtxp327</i>	ACCACTGCTCACGCTCAC	GCGGTGTACAGCTTCGTC
<i>SgMS0192</i>	<i>Xtxp328</i>	ACGACGACGAGGTGG	TTCAACAAAGGAAAGGATTC
<i>SgMS0196</i>	<i>Xtxp336</i>	CAGCGAGCACCGACGAC	CCACCCAACCTGACCTTCT
<i>SgMS0197</i>	<i>Xtxp337</i>	GGGGATCAACTTATTG	CCAAACTATAGCTGAGAG
<i>SgMS0206</i>	<i>Xtxp353</i>	CTCCAACATGCTCTGCTG	GGATCAACTTATTGGGGATG
<i>SgMS0207</i>	<i>Xtxp354</i>	TGGGCAGGGTATCTAACTGA	GCCTTTTTCTGAGCCTTGA
<i>SgMS0209</i>	<i>Xtxp357</i>	CGCAGAAATACGATTG	GCTATCTGGAGTAACTGTGT
<i>SgMS0211</i>	<i>Xgap1⁵</i>	TCCTGTTTGACAAGCGCTTATA	AAACATCATACGAGCTCATCAATG
<i>SgMS0214</i>	<i>Xgap42⁵</i>	TTTTCTCTTTCAGATAACCGTA	CCCACCAAGGGCATC
<i>SgMS0215</i>	<i>Xgap57⁵</i>	ACAGGGCTTTAGGGAAATCG	CCATCACCGTCGGCATCT
<i>SgMS0216</i>	<i>Xgap84⁵</i>	CGCTCTCGGGATGAATGA	TAACGGACCACTAACAAATGATT
<i>SgMS0217</i>	<i>Xgap236⁵</i>	GCCAAGAGAAACACAAACAA	AGCAATGTATTTAGGCAACACA
<i>SgMS0221</i>	<i>Sb4-15</i>	GCTGCTAAGCCGTGCTGA	TTATTTGGGTGAAGTAGAGGTGAACA
<i>SgMS0222</i>	<i>Sb4-32</i>	CTCGGCGGTTAGCACAGTCAC	GCCCATAGACAGACAGCAAAGCC
<i>SgMS0224</i>	<i>Sb4-121</i>	GAAAAATCTCCGTCAATCCCAAAATAA	CGCTGAACAACGAAAGGAATAAGTG
<i>SgMS0225</i>	<i>Sb5-206</i>	ATTCATCATCCTCATCTCGTAGAA	AAAAACCAACCCGACCCACTC
<i>SgMS228</i>	<i>Xcup05</i>	GGAAGGTTTGCAAGAACAGG	CCAGCCCAACAAGTGCTATC
<i>SgmS288</i>	<i>Dsenhsbm7</i>	AGGTAGCAATTCGTCGTTGC	ACGGGTGACCTCAACTGAAC
<i>SgMS291</i>	<i>Dsenhsbm14</i>	GTGGCTTGGAGAAAAGGAAG	TGCCACCTCAGTTCATGACTAT
<i>SgMs294</i>	<i>Dsenhsbm19</i>	CATGATGCAGCAACAACAGC	GAAACCAGAACCGAACCTGA
<i>SgMs324</i>	<i>Xtxp41</i>	TCTGGCCATGACTTATCAC	AAATGGCGTAGACTCCCTTG
<i>ABI5</i>	<i>gen ABI5</i>	TCCTGTCGCTAAGCCACTCT	CGCGACGTTGTGTATCTCCT
<i>psb105</i>	<i>Xcup06</i>	GGCAGTAGCAGGCGTTTAAG	AACTGAATCAGGTCATGGGC
<i>psb1802</i>	<i>Xcup14</i>	TACATCACAGCAGGGACAGG	CTGGAAGCCGAGCAGTATG
<i>SAMIV33</i>	<i>SAMIV2_59099</i>	CCAAGATAGCAATCGTTAATG	CCCACGTAGTGAGTTTGC
<i>SAMIV48</i>	<i>SAMIV2_08616</i>	GGTGGATTCAGATTTTCAGA	GATGGAAGCGTGATCTTG
<i>SAMIV55</i>	<i>SAMIV2_76442</i>	ACCCCAAAAATCAAAAAGC	TCCGGTACCCTCCTCTTC
<i>SAMIV9</i>	<i>SAMIV2_76426</i>	TGCACATTTTAATTTGTTTCG	GGAGCTTAATTGCATCTGTT

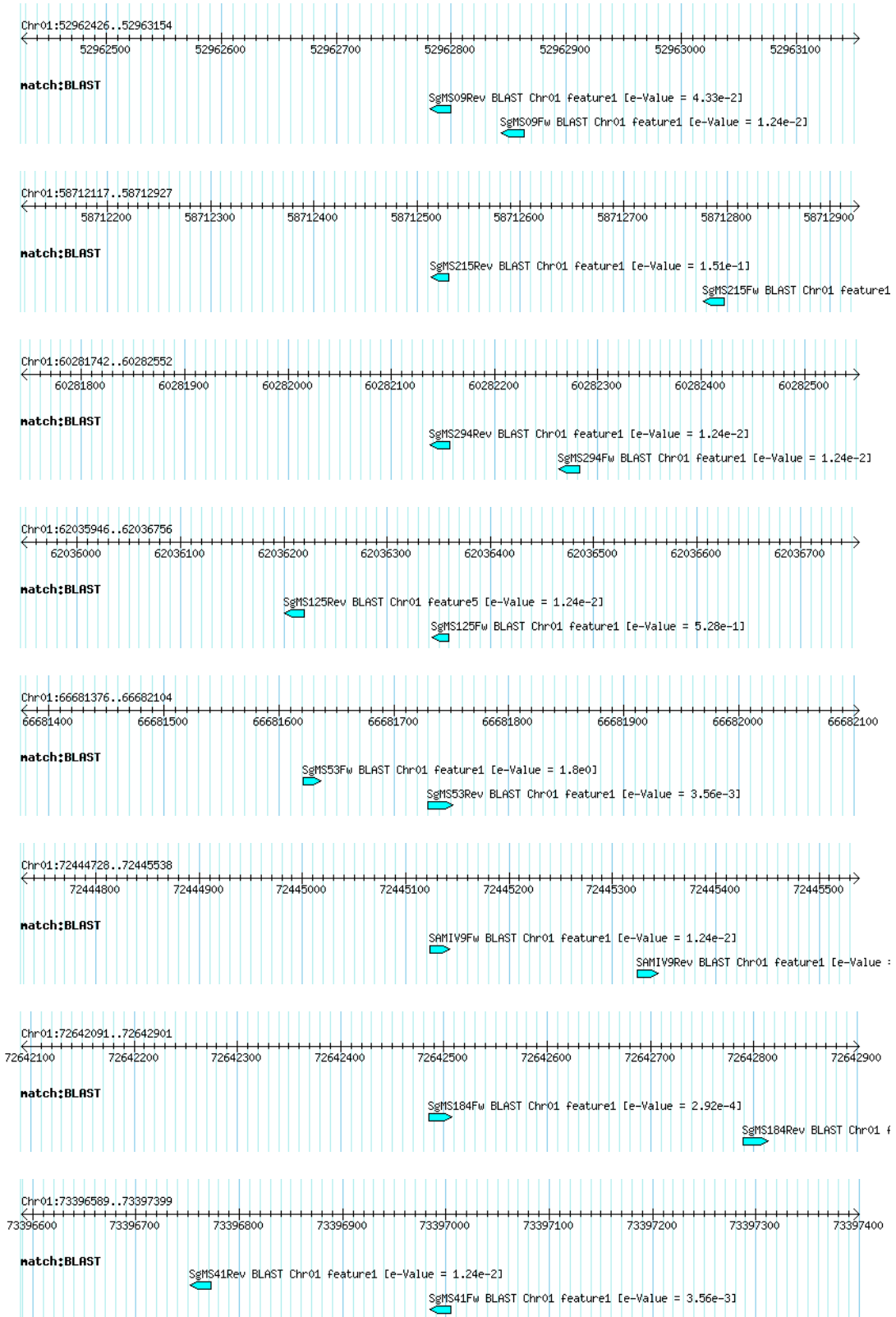
Figura suplementaria 2.1. Alineamiento de las primeras 360 pb del gen *ABI5*, para los genotipos IS9530 y RedlandB2. En la posición +40 (a partir del ATG) se observa un InDel de 6 pb.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
IS9530	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
RedlandB2	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
	91	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
IS9530	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
RedlandB2	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
	181	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
IS9530	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
RedlandB2	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
	271	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
IS9530	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
RedlandB2	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										

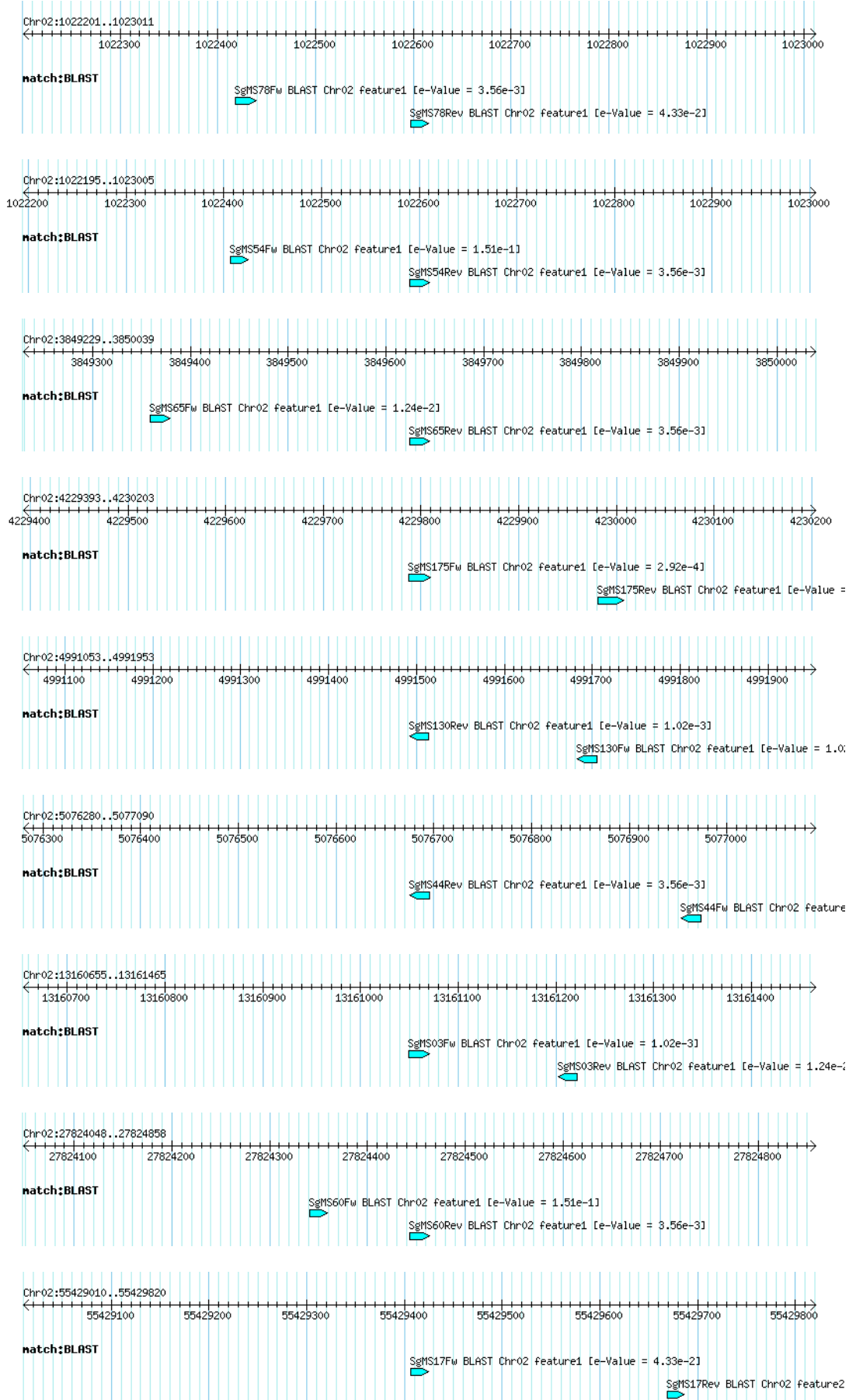
Figura suplementaria 2.2. Posición física de los “primers” utilizados para amplificar cada uno de los SSR incluidos en el mapa genético. Para cada marcador se muestra la posición física a lo largo del genoma de sorgo de los primer “forward” y “reverse” utilizados para amplificar cada marcador. Los casos en que se informa la ubicación de un único “primer” se deben a falta de información en la secuencia de referencia del genoma de sorgo (*i.e.* posiciones con algunas bases desconocidas). Se indican los cromosomas en forma consecutiva y dentro de cada uno de ellos los marcadores en su correspondiente orden físico y genético.

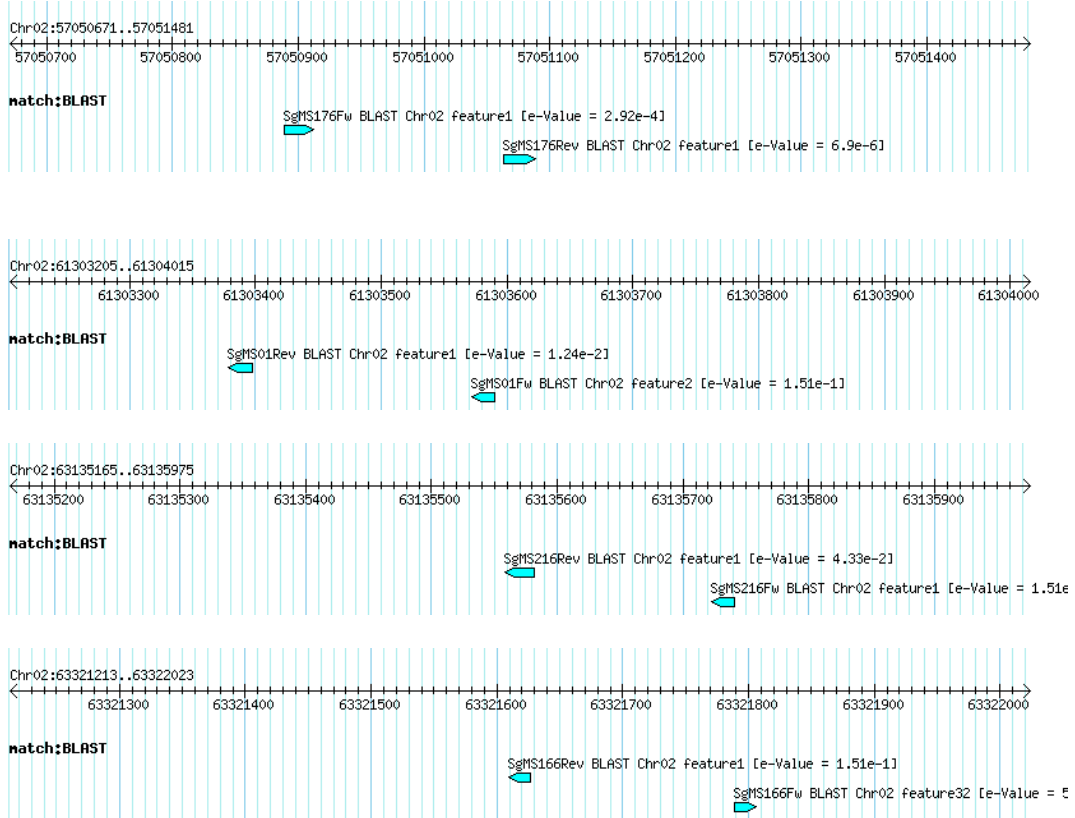
Cromosoma 1



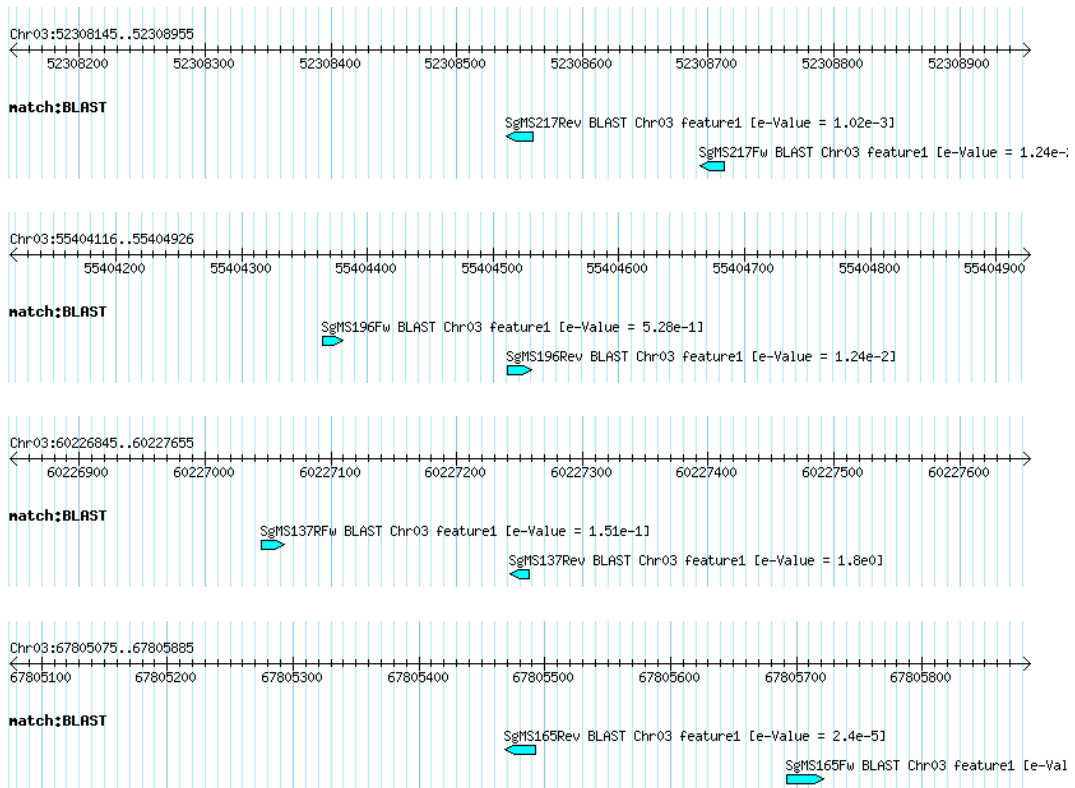


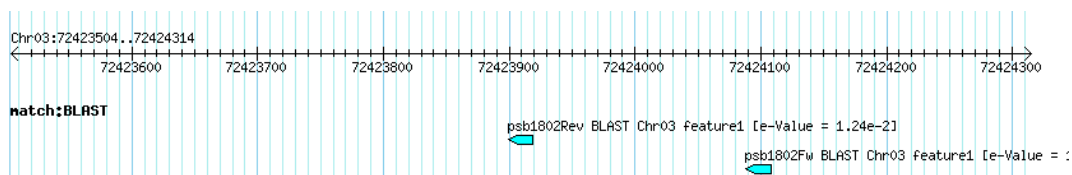
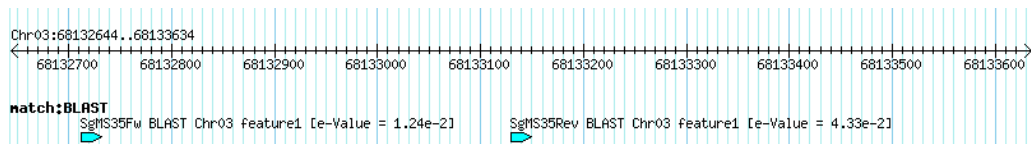
Cromosoma 2



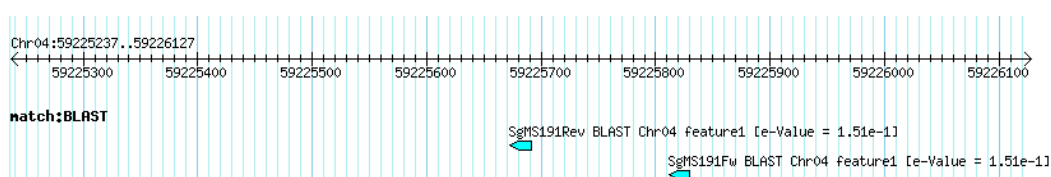
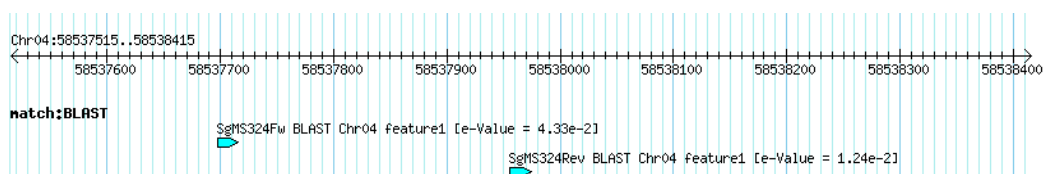
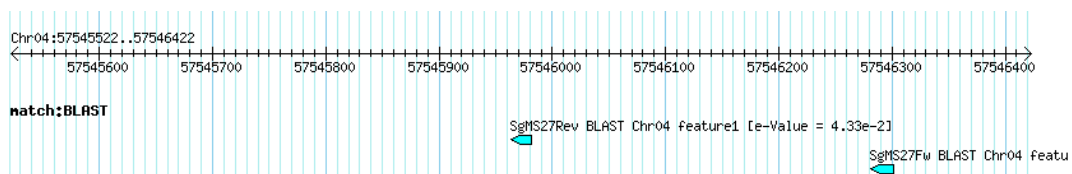
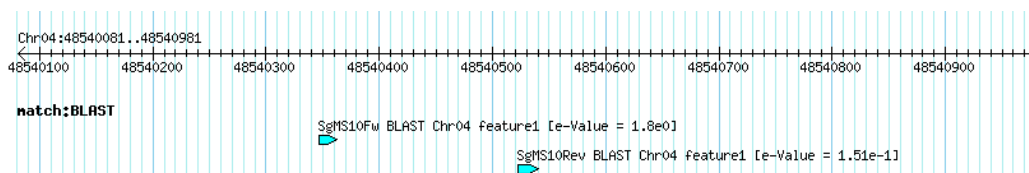
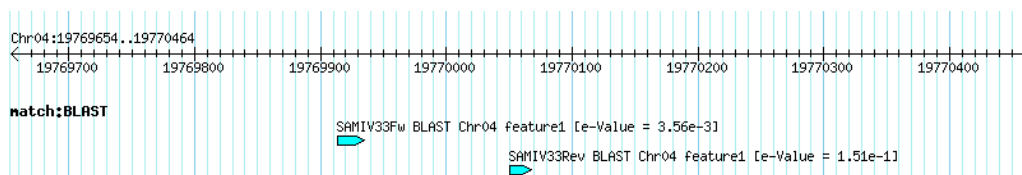
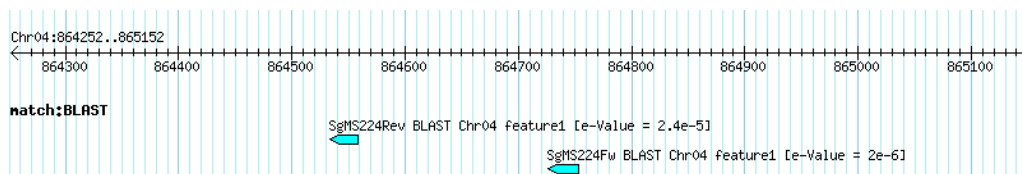
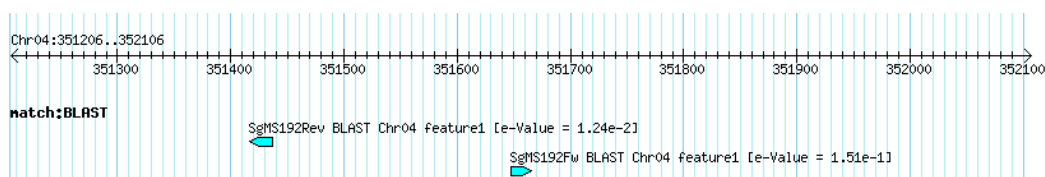


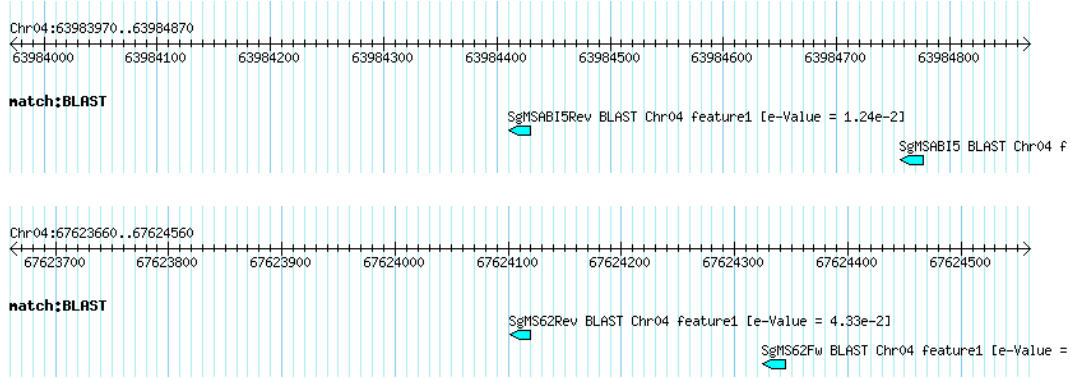
Cromosoma 3



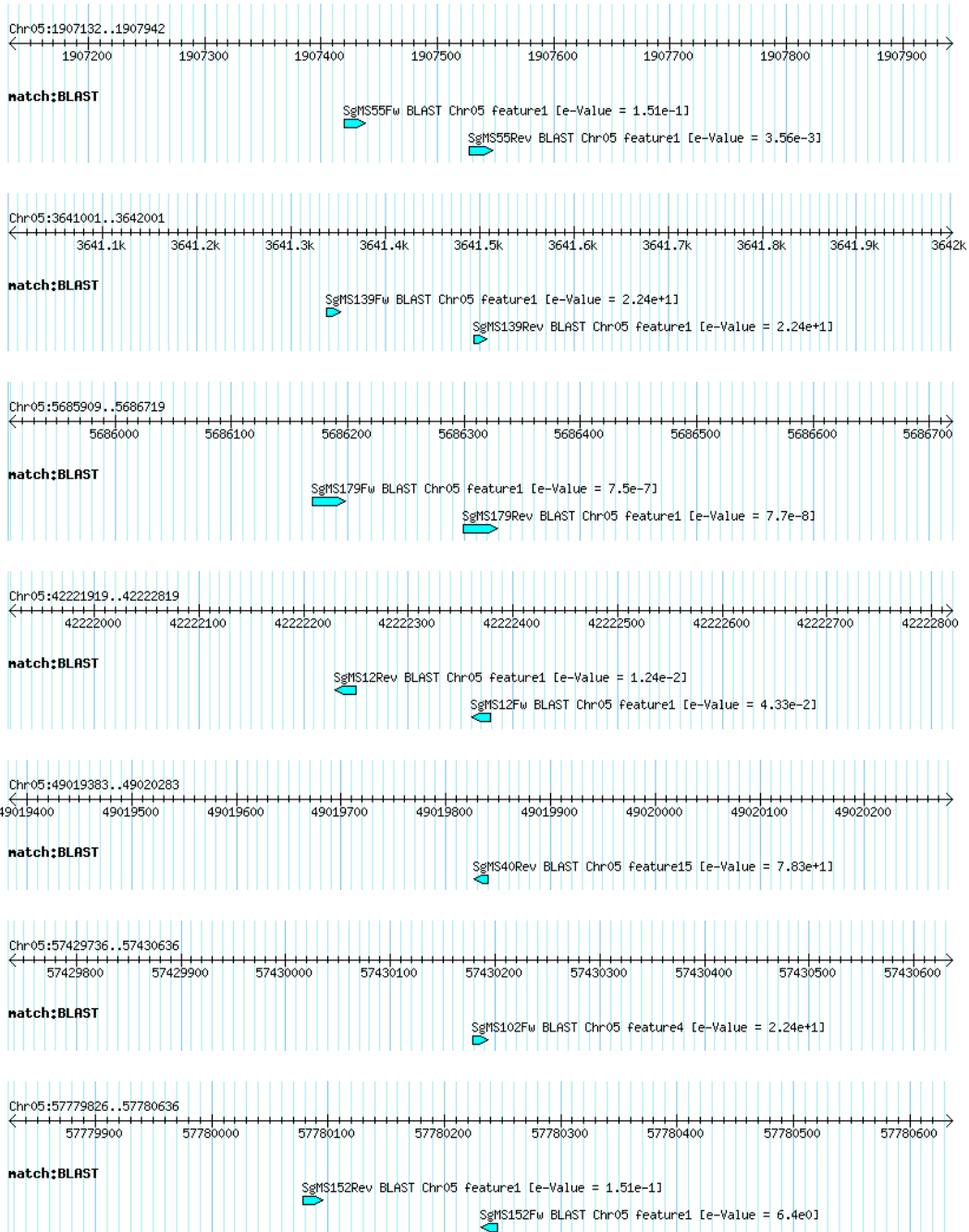


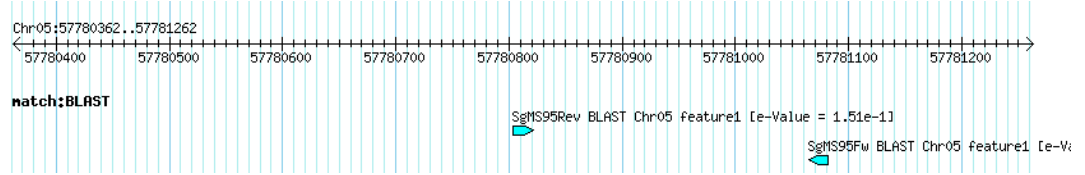
Cromosoma 4



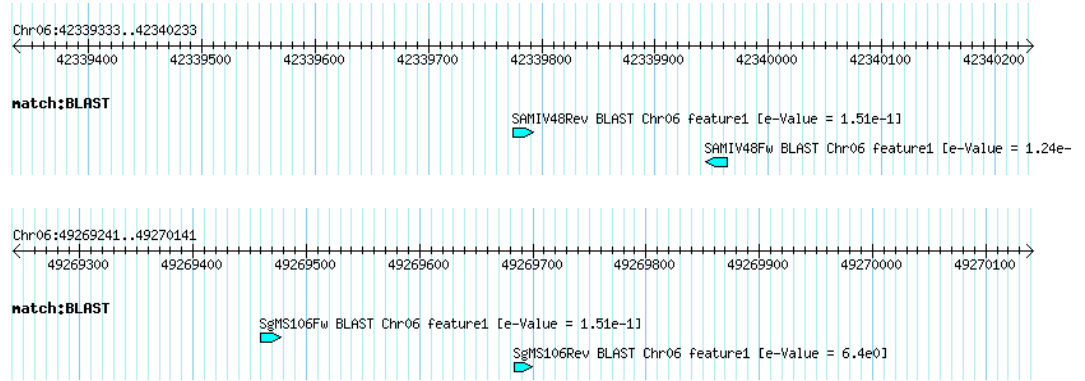


Cromosoma 5

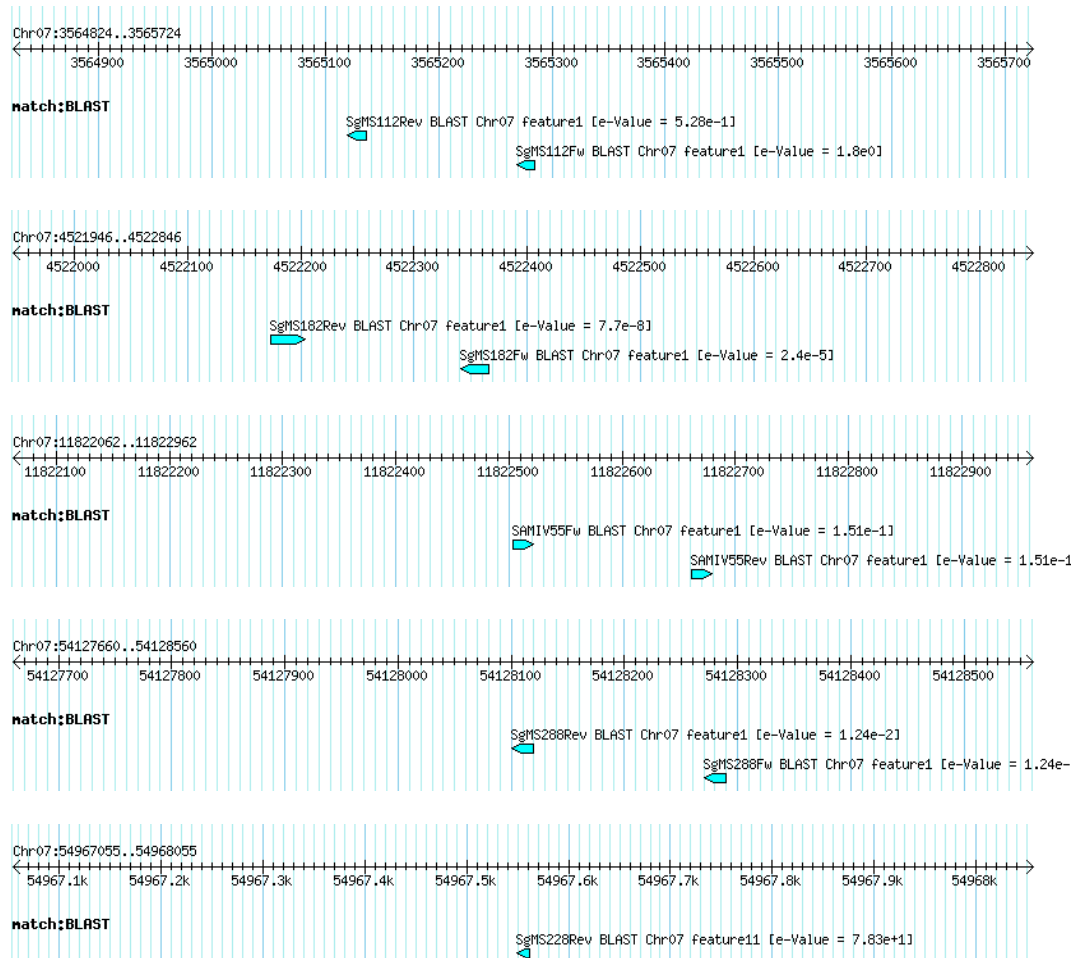


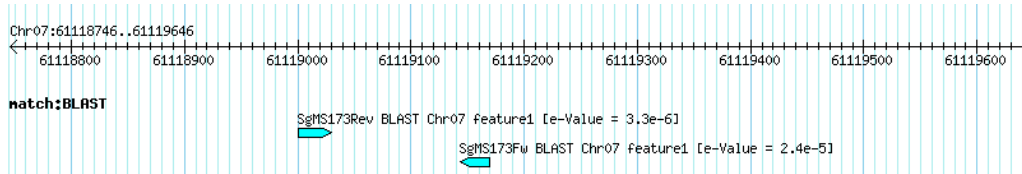


Cromosoma 6

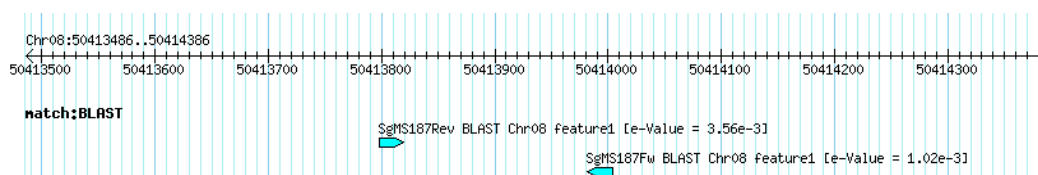
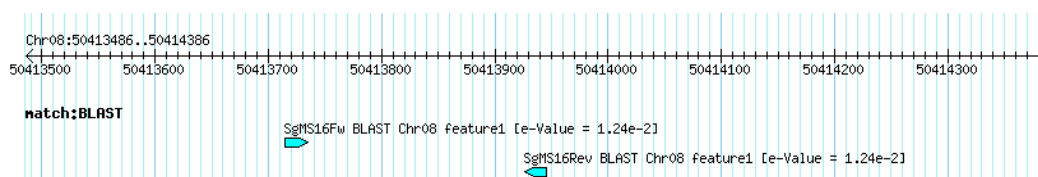
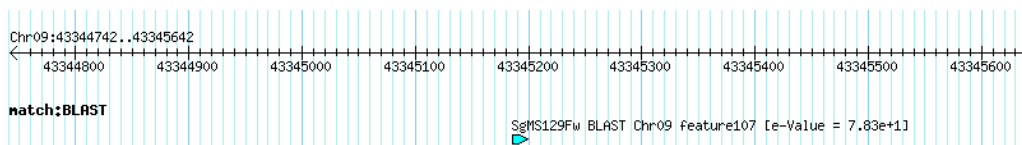
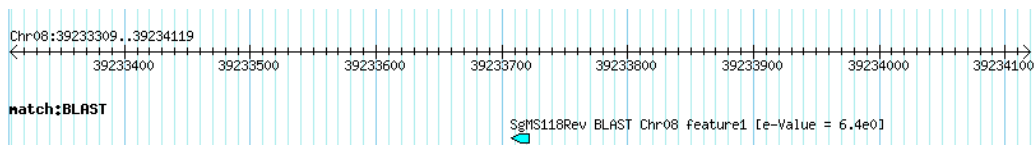
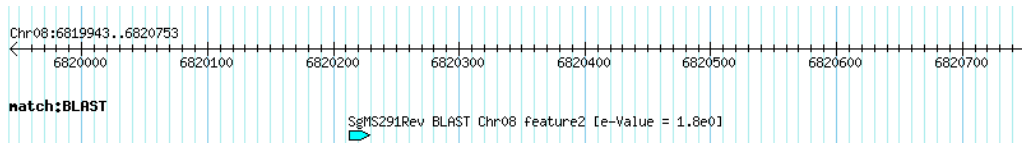
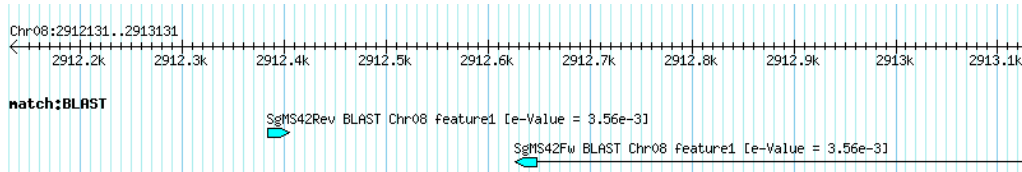


Cromosoma 7

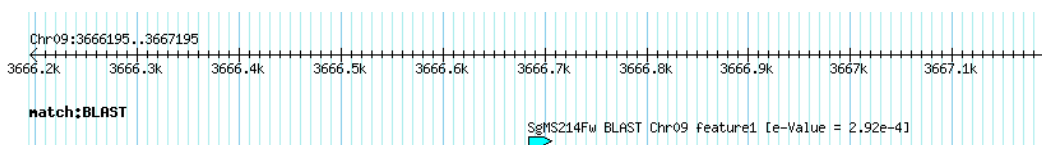


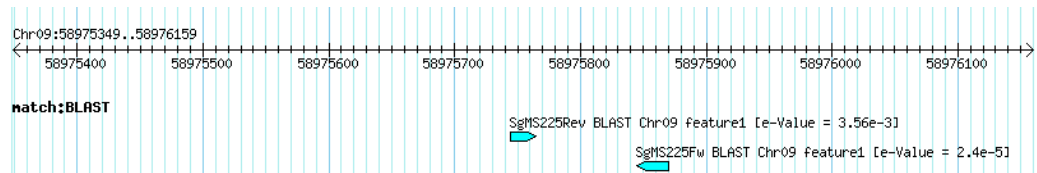
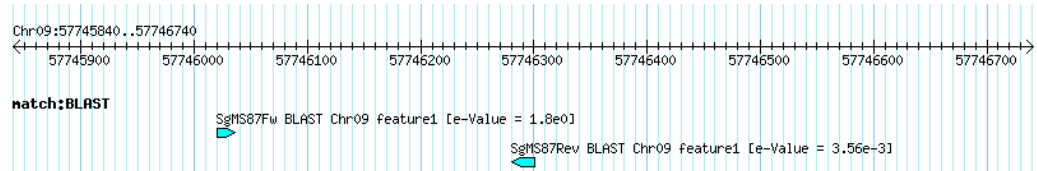
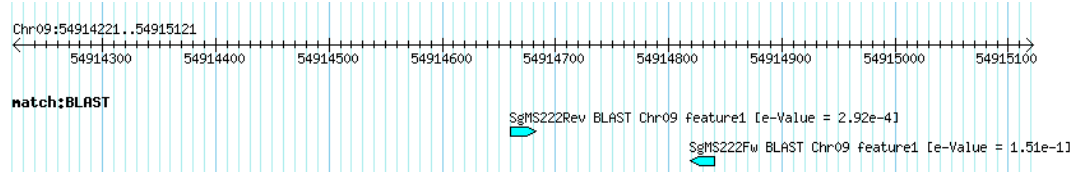
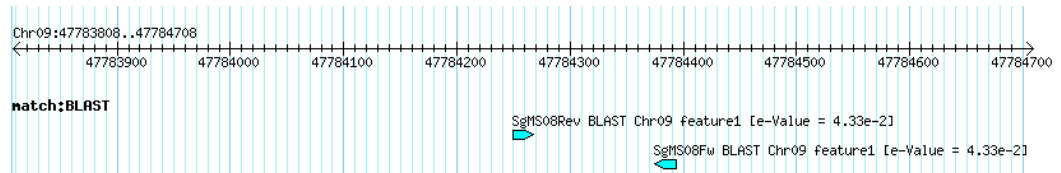
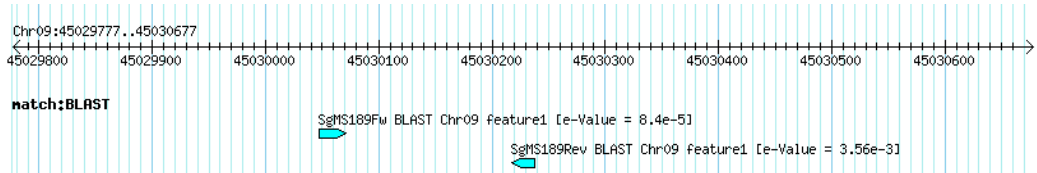
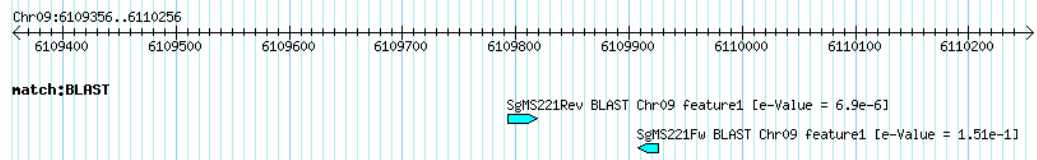
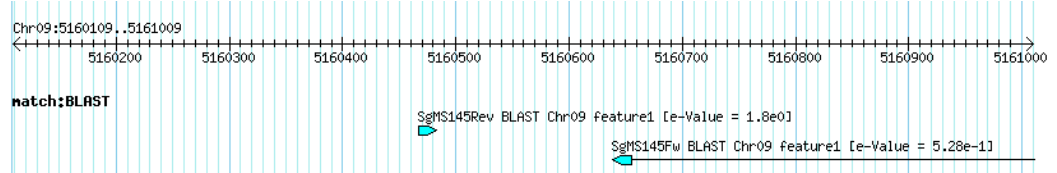


Cromosoma 8

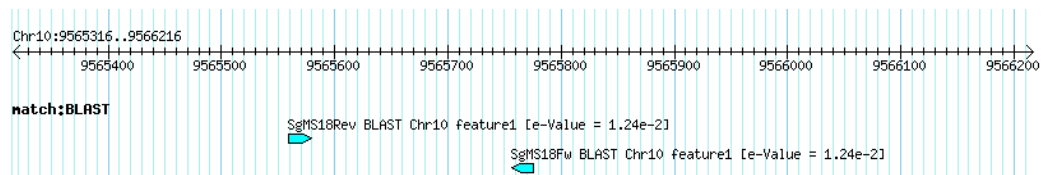


Cromosoma 9





Cromosoma 10



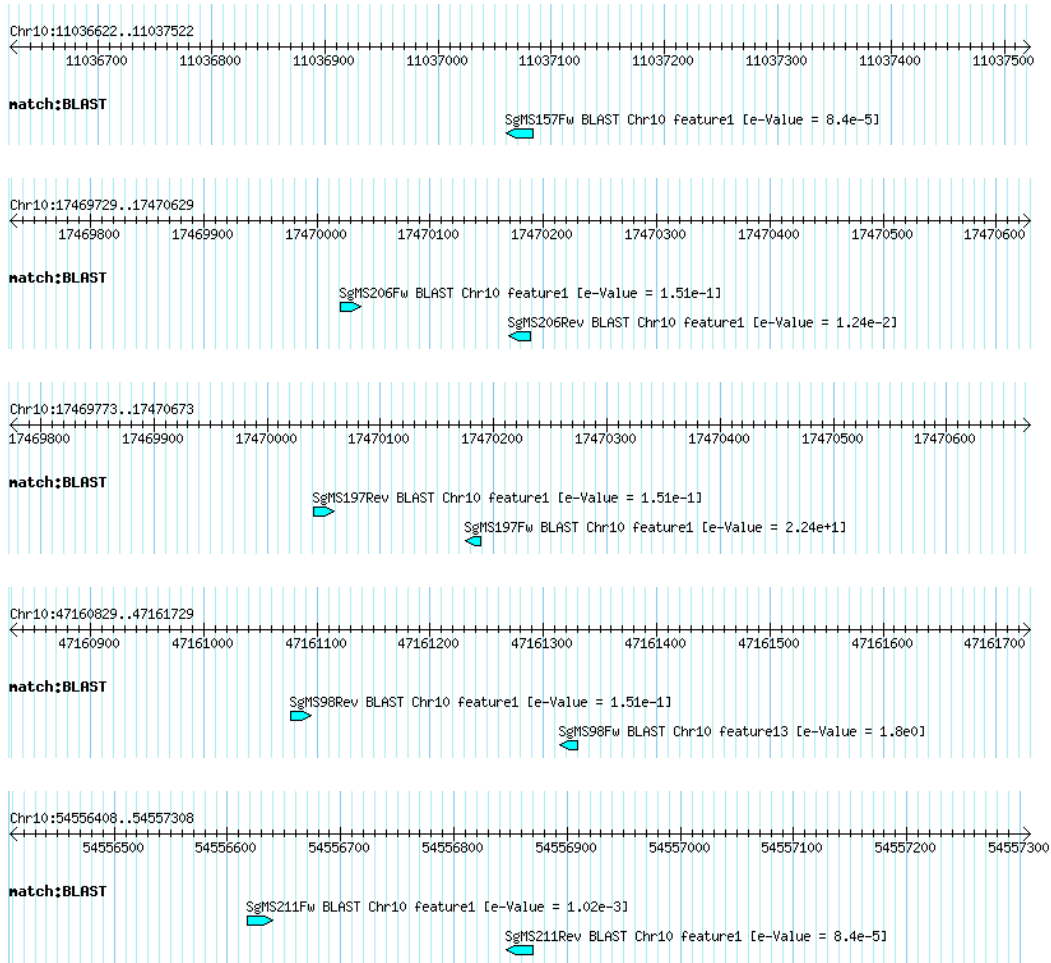


Figura suplementaria 2.3. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 5, para el análisis CIM, con los datos fenotípicos IG2. El valor de LR crítico (18.4) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.

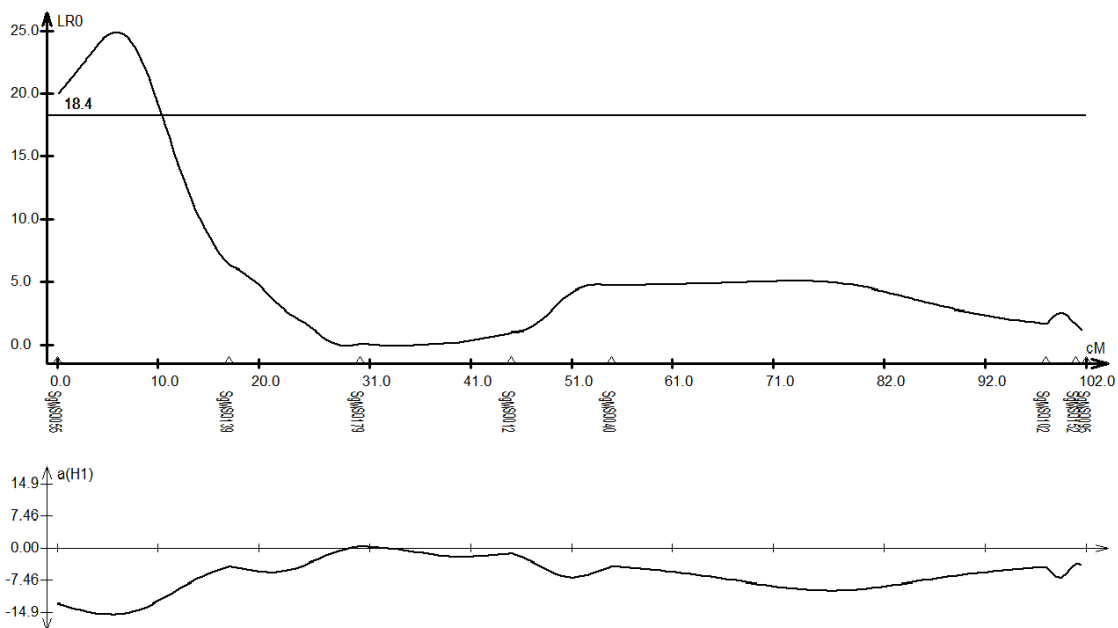


Figura suplementaria 2.4. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 9, para el análisis CIM, con los datos fenotípicos IG3. El valor de LR crítico (18.4) se indica con una línea horizontal de trazo grueso. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.

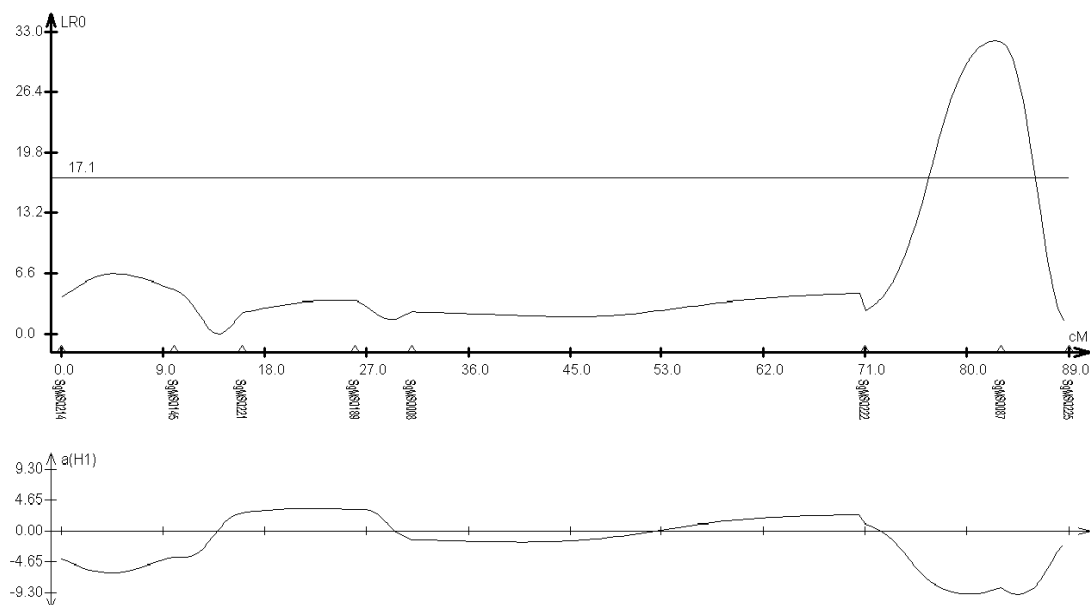


Figura suplementaria 2.5. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 9, para el análisis MTM, con los datos IG2 (gris claro) e IG3 (gris oscuro) y “joint trait” (negro). El valor de LR crítico se indica para cada caso con una línea horizontal del color correspondiente. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.

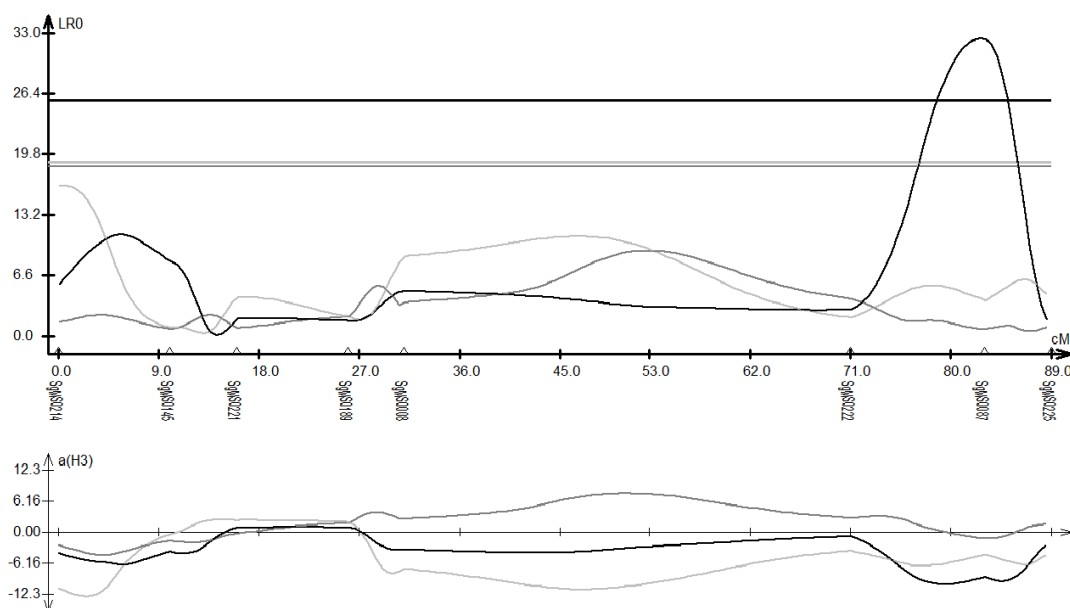


Figura suplementaria 2.6. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 10, para el análisis MTM, con los datos IG2 (gris claro) e IG3 (gris oscuro) y “joint trait” (negro). El valor de LR crítico se indica para cada caso con una línea horizontal del color correspondiente. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.

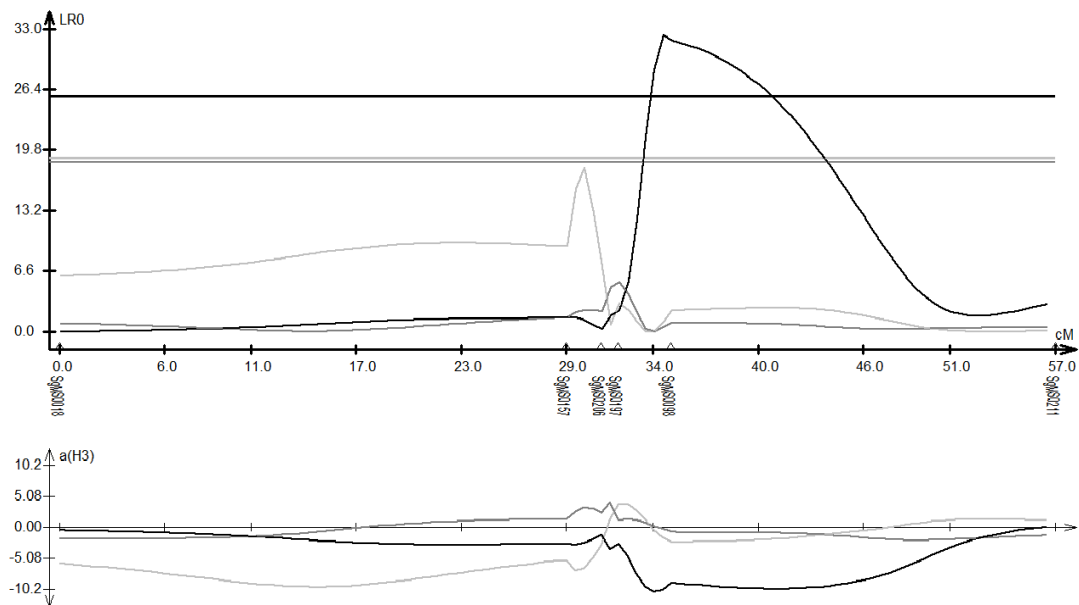


Figura suplementaria 2.7. Gráfico construido a partir de los valores del estadístico LR (eje de ordenadas) en función de la posición genética (en cM, eje de abscisas, nombre de los marcadores incluidos) del cromosoma 4, para el análisis MTM, con los datos IG2 e IG3 (“joint trait”). El valor de LR crítico en este caso fue de 25.8. Debajo, gráfico construido a partir de los valores de aditividad en cada posición del cromosoma.

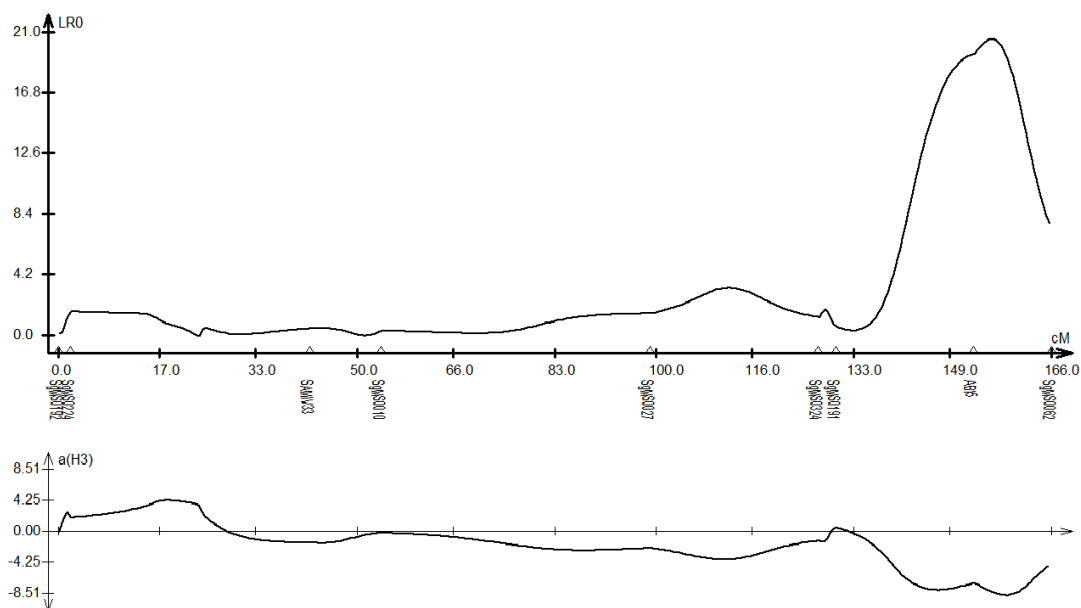


Tabla suplementaria 2.3. Análisis *in silico* de las regiones genómicas comprendidas por los QTL identificados. Se detalla para cada QTL (*qDOR-5*, *qDOR-9* y *qDOR-10*) el código de identificación de cada gen incluido y su anotación. En el caso de genes con función desconocida, se los identificó con la palabra “No” en la columna de anotación.

qDOR-5

Genes Sobic.005G	Anotación
020300	AMP dependent ligase/synthetase
020400	Similar to 'putative iNositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase'
020500	No
020600	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 AND BUBR1
020700	Uncharacterized membrane protein, predicted efflux pump
020800	Similar to GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein, expressed
020900	Engulfment and cell motility
021000	Similar to AP2 domain containing protein, expressed - Nombres en At:WRI, WRI1,ASML1,ATWRI1
021100	No
021200	No
021300	No
021400	No
021500	No
021600	No
021700	Similar to Nse1 Non-SMC component of SMC5-6 complex family protein, expressed
021800	Late embryogenesis abundant protein
021900	No
022000	Peroxisomal membrane protein 2, PXMP2
022100	Glucose-6-phosphate/phosphate and phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter
022200	Similar to Putative 5'-3' exoribonuclease
022300	No
022400	GATA zinc finger
022500	Similar to Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminus family protein, expressed
022600	Pectinesterase activity
022700	No
022800	GTP-binding protein-related
022900	No
023000	No
023100	F-box domain
023200	No
023300	No
023400	No
023500	No
023600	No
023700	No
023800	No
023900	No
024000	Rhamnogalacturonate lyase family
024100	Rhamnogalacturonate lyase family
024200	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase related
024300	Calcium binding protein
024400	WD40 repeat family

024500	No
024600	Pentatricopeptide repeat-containing protein
024700	Sugar (and other) transporter
024800	Sugar (and other) transporter
024900	Sugar (and other) transporter
025000	No
025100	No
025200	Ubiquinol-Cytochrome C reductase complex, subunit X
025300	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
025400	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase related
025500	No
025600	No
025700	Splicing factor U2AF-associated protein 2
025800	Similar to Dual specificity phosphatase, catalytic domain containing protein, expressed
025900	Similar to Probable auxin efflux carrier component
026000	No
026100	Similar to Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial, putative, expressed
026200	No
026300	Transferase
026400	Pentatricopeptide repeat-containing protein
026500	Pentatricopeptide repeat-containing protein
026600	Phosphoglycerate mutase
026700	No
026800	Phosphoglycerate mutase
026900	Pentatricopeptide repeat-containing protein
027000	Similar to Kelch motif family protein, expressed
027100	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
027200	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
027300	Similar to Ribosomal protein L24 containing protein, expressed
027400	RNA-binding protein
027500	No
027600	Pentatricopeptide repeat-containing protein
027700	Pentatricopeptide repeat-containing protein
027800	Pentatricopeptide repeat-containing protein
027900	Pentatricopeptide repeat-containing protein
028000	Auxin responsive protein
028100	Nucleolar complex 2 and RAD4-related
028200	Pentatricopeptide repeat-containing protein
028300	Pentatricopeptide repeat-containing protein
028400	Similar to Probable calcium-transporting ATPase 4
028500	No apical meristem (NAM) protein
028600	Similar to Zinc finger protein-like
028700	Ca ²⁺ -binding protein, EF-Hand protein superfamily
028800	Similar to Saccharopine dehydrogenase family protein, expressed
028900	Cytochrome C biogenesis protein transmembrane region
029000	No
029100	Similar to TAP42-like family protein, expressed
029200	Calmodulin
029300	No
029400	Strictosidine synthase-related
029500	No
029600	Similar to GRAS family transcription factor containing protein

029700	Similar to Ankyrin repeat family protein, putative, expressed
029800	Apoptotic ATPase
029900	Similar to Strictosidine synthase family protein
030000	Protein phosphatases PP1 regulatory subunit
030100	Isopropylmalate synthase related
030200	Ring finger protein 24-related
030300	No
030400	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
030500	Sensor histidine kinase-related
030600	similar to RNA polymerase Rpb5, N-terminal domain containing protein, expressed
030700	No
030800	Pentatricopeptide repeat-containing protein
030900	Pentatricopeptide repeat-containing protein
031000	Gulonolactone oxidase
031100	No
031200	No
031300	No
031400	No
031500	No
031600	No
031700	Similar to Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 4, putative, expressed
031800	No
031900	No
032000	Similar to Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase, putative, expressed
032010	No
032200	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
032300	Ubiquitin-like protein
032400	Trithorax protein ASH2
032500	Trithorax protein ASH2
032600	No
032700	Similar to Lipase family protein
032800	Red protein (IK FACTOR) (CYTOKINE IK)
032900	Meiotic recombination protein DMC1
033000	RIBOSE-5-PHOSPHATE ISOMERASE
033100	similar to AMP-binding enzyme family protein, expressed
033200	No
033300	Microfibril-associated protein
033400	Copper transport protein ATOX1-related
033500	No
033600	Copper transport protein ATOX1-related
033700	Copper transport protein ATOX1-related
033800	No
033900	similar to Flavonol 3-O-glucosyltransferase, putative, expressed
034000	similar to Stem-specific protein TSJT1, putative, expressed
034100	No
034200	F-box domain
034300	similar to Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type family protein, expressed
034400	Pyruvate kinase
034500	Serine-Threonine protein kinase
034600	No
034700	PHD/F-BOX containing protein
034800	No

034900	No
035000	No
035100	Leucine-rich repeat-containing protein
035200	No
035300	Similar to Putative phytosulfokine peptide precursor
035400	RING ZINC FINGER PROTEIN
035500	No
035600	No
035700	Ring finger protein 11
035800	Ring finger protein 11
035900	Similar to S-receptor kinase-like protein, putative
036000	Pollen proteins Ole e I like
036100	Similar to Phosphoglycerate mutase family, putative
036200	No
036300	No
036400	Similar to RING zinc finger protein, putative
036500	Serine-Threonine protein kinase
036600	No
036700	No
036800	No
036900	No
037000	Cytochrome pP450
037100	Serine-Threonine protein kinase
037200	Similar to Putative anthocyanin 5-aromatic acyltransferase
037300	Predicted transporter ADD1
037400	No
037500	No
037600	No
037700	No
037800	Similar to Sialyltransferase-like protein
037900	Similar to Sialyltransferase-like protein
038000	No
038100	Similar to Sialyltransferase-like protein
038200	No
038300	No
038400	Phosphatidylethanolamine-binding protein
038500	Pentatricopeptide repeat-containing protein
038600	Pten-related phosphatase (PLIP)
038700	BZIP transcription factor
038800	Serine-Threonine protein kinase
038900	Carbonic anhydrase
039000	No
039100	No
039200	No
039300	Leucine-rich repeat-containing protein
039400	No
039500	GTPase containing family of signal recognition particle proteins
039600	No
039700	Similar to Rac GTPase activating protein 1
039800	No
039900	No
040000	No

qDOR-9

Genes Sobic.009G	Anotación
198800	No
198900	Trehalose-6-phosphate synthase
199000	Protease family C26 Gamma-Glutamyl hydrolase
199100	Protease family C26 Gamma-Glutamyl hydrolase
199200	Protease family C26 Gamma-Glutamyl hydrolase
199300	No
199400	No
199500	Ribosomal protein L27
199600	No
199700	No
199800	Cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
199900	Phosphatidylethanolamine-binding protein
200000	No
200100	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
200200	Trehalose-6-phosphate synthase
200300	No
200400	No
200500	Homeobox protein
200600	No
200700	No
200800	Serine-Threonine protein kinase
200900	No
201000	Alkaline ceramidase-related
201100	Matrix metalloproteinase
201200	WD40-repeat-containing subunit of the 18S rRNA processing complex
201300	No
201400	Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GV
201500	Similar to Heat shock protein 101
201600	No
201700	Similar to Putative oligosaccharyl transferase STT3 subunit
201800	No
201900	Peptidyl-tRNA hydrolase, PTH2 family
202000	Transcription factor activity/GATA
202100	No
202200	No
202300	No
202400	No
202500	No
202600	Anciente ubiquituous protein
202700	Predicted E3 ubiquitin ligase
202800	No
202900	Two-component phosphorelay intermediate involved in MAP kinase cascade regulation
203000	ATP-dependent protease
203100	No
203200	Pectinesterase
203300	Late embryogenesis abundant protein
203400	Myosin I, high molecular weight form

203500	Hexokinase
203600	Serine-Threonine protein kinase
203700	Similar to Auxin-responsive protein IAA18
203800	Ribosomal protein L2
203900	Profilin
204000	Profilin
204100	No
204200	Similar to Dual-specificity protein-like phosphatase 4
204300	Serine-Threonine protein kinase
204400	U3 small nucleolar ribonucleoprotein (sNoRNP) subunit - Mpp10p
204500	Metalloprotease
204600	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase
204700	Serine-Threonine protein kinase
204800	Serine-Threonine protein kinase
204900	Serine-Threonine protein kinase
105000	Pentatricopeptide repeat-containing protein

qDOR-10

Genes Sobic.010G	Anotación
129700	Hidrolase
129800	No
129900	No
130000	Similar to Putative LYST-interacting protein LIP5
130100	Bactericidal Permeability-increasing (BPI) protein-related
130200	BACTERICIDAL PERMEABILITY-INCREASING (BPI) PROTEIN
130300	Similar to Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 6 precursor
130400	SAM dependent carboxyl methyltransferase
130500	SAM dependent carboxyl methyltransferase
130600	No
130700	Serine threonin kinase
130800	Similar to Putative adenine monophosphate binding protein 1 AMPBP1
130900	Similar to Glycine-rich protein GRP5
131000	Protein of unknown function (DUF632)
131100	No
131200	No
131300	Similar to Putative elongation factor 1A binding protein
131400	RHO GDP-dissociation inhibitor-related
131500	Similar to Sodium/hydrogen exchanger
131600	Similar to ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor
131700	Membrane-associated guanylate kinase (MAGUK)
131800	No
131900	Similar to Putative makorin RING finger protein
132000	No
132100	No
132200	Serine protease inhibitor activity
132300	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3
132400	Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase, and related proteins
132500	No
132600	Uncharacterized ACR, YdiU/UPF0061 family
132700	No
132800	No

132900	No
133000	Late embryogenesis abundant (LEA) group 1
133100	Oligopeptide transporter-related
133200	No
133300	Sugar transporter
133400	Pantothenate kinase
133500	weakly similar to Putative AT-hook DNA-binding protein
133600	No
133700	No
133800	No
133900	No
134000	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase
134100	MAM33, mitochondrial matrix glycoprotein
134200	Peroxiredoxin-5
134300	No
134400	Similar to Putative mono- or diacylglycerol acyltransferase
134500	3'-5' Exonuclease ERI1-related
134600	Pentatricopeptide repeat-containing protein
134700	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
134800	No
134900	Domain of unknown function (DUF296)
135000	Similar to Thioredoxin reductase
135100	No
135200	No
135300	No
135400	No
135500	No
135600	No
135700	No
135800	No
135900	No
136000	No
136100	No
136200	No
136300	Phosphatidylethanolamine binding protein
136400	No
136500	No
136600	No
136700	No
136800	No
136900	Transporter, ABC superfamily (Breast cancer resistance protein)
137000	No
137100	No
137200	No
137300	Serine threonin kinase
137400	Serine threonin kinase
137500	Leucine-rich repeat-containing protein
137600	No
137700	No
137800	No
137900	No
138000	Similar to Cryptochrome 2

138100	No
138200	Similar to AlphaSNBP(B)-like
138300	No
138400	Uncharacterized membrane protein, predicted efflux pump
138500	Serine threonin kinase
138600	No
138700	Pentatricopeptide repeat-containing protein
138800	No
138900	Cytosine deaminase
139000	similar to Putative SWAP
139100	Serine threonin kinase
139200	Photosystem II protein
139300	No
139400	No
139500	Cation transporter ATPase
139600	Similar to Putative oxidative-stress responsive/ Protein tyrosine kinase
139700	No
139800	No
139900	No
140000	No
140100	No
140200	No
140300	No
140400	No
140500	Ubiquitin-protein ligase activity
140600	Similar to BOLA-like
140700	Similar to Class III peroxidase 79 precursor
140800	No
140900	No
141000	No
141100	No
141200	No
141300	No
141400	DNA Topoisomerase/Gyrase
141500	SENTRIN/SUMO-specific protease
141600	Similar to Formate dehydrogenase, mitochondrial precursor
141700	FAR1 DNA-binding domain
141800	Cysteine-type peptidase activity
141900	No
142000	No
142100	No
142200	No
142300	No
142400	No
142500	No
142600	No
142700	No
142800	No
142900	Oleosin
143000	No
143100	No
143200	No

143300	No
143400	Heat shock protein binding/DNAJ/HSP40
143500	Pyruvate phosphate dikinase, PEP/pyruvate binding domain
143600	Zinc finger CW-type coiled-coil domain protein 3
143700	No
143800	No
143900	Glycosyl transferase
144000	Vesicle coat complex AP-3, delta subunit
144100	No
144200	No
144300	Ribonuclease H activity
144400	Glycosyl transferase
144500	No
144600	No
144700	No
144800	No
144900	Similar to Putative fiber protein Fb34
145000	No
145100	No
145200	No
145300	No
145400	No
145500	Plant transposase (Pta/En/Spm family)
145600	No
145700	No
145800	PolyC-binding proteins alphaCP-1 and related KH domain proteins
145900	Similar to Phosphatidylinositol 3-and 4-kinase-like
146000	Sellulose synthase (UDP-forming) activity
146100	Aquaporin transporter
146200	No
146300	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase
146400	Similar to Auxin-responsive protein IAA21
146500	Apoptotic ATPase
146600	Similar to Cyclin-dependent kinase F-1
146700	Aminoacid transporter
146800	Rtr1/RPAP2 family
146900	No
147000	TESMIN/TSO1-related
147100	Cytosolic sorting protein GGA2/TOM1/intracellular protein transport
147200	Response to aluminum ion
147300	CCR4-ASSOCIATED FACTOR
147400	CCR4-Associated factor
147500	Similar to N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase
147600	Reticulon
147700	WD repeat and HMG-box DNA binding protein
147800	No
147900	WD40 repeat protein PRL1/PRL2-related
148000	No
148100	MADS box protein
148200	Calmodulin
148300	No
148400	MADS box protein

148500	No
148600	WRKY DNA -binding domain
148700	No
148800	WRKY DNA -binding domain
148900	No
149000	No
149100	No
149200	Similar to Metal-dependent membrane protease-like
149300	Similar to Sumo-conjugating enzyme UBC9
149400	No
149500	Kelch-related proteins
149600	No
149700	response to oxidative stress/Peroxidase
149800	No
149900	No
150000	No
150100	No
150200	No
150300	Protein binding/ FBOX domain
150400	Ribosomal S subunit
150500	No
150600	No
150700	RNA binding
150800	No
150900	No
151000	Similar to Putative CMP-sialic acid transporter
151100	No
151200	No
151300	No
151400	No
151500	No
151600	ATP-binding cassette transporter
151700	Similar to Extra-large G-protein-like
151800	No
151900	Ribonuclease P protein subunit POP4
152000	No
152100	No
152200	No
152300	Glycosyl transferase
152400	Glycosyl transferase
152500	Glycosyl transferase
152600	No
152700	Similar to Basic helix-loop-helix-like
152800	No
152900	Similar to Glycosyl hydrolase family 3 C terminal domain containing protein
153000	No
153100	B-cell receptor-associated protein and related proteins
153200	No
153300	Dead box ATP-dependent RNA helicase
153400	Protein phosphatase 2C
153500	ATP-dependent helicase
153600	Pentatricopeptide repeat-containing protein

153700	Voltage and ligand gated potassium channel
153800	No
153900	Similar to Spermidine synthase 2
154000	E3 ubiquitin-protein ligase UBR7
154100	No
154200	No
154300	No
154400	No
154500	No
154600	Serine protease family S10 serine carboxypeptidase
154700	No
154800	No
154900	No
155000	No apical meristem (NAM) protein
155100	No apical meristem (NAM) protein
155200	No
155300	VQ motif
155400	Serine-Threonine protein kinase
155500	Glycosyl hydrolases family 17
155600	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis
155700	No
155800	No
155900	PRK1-associated zinc finger protein
156000	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
156100	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase
156200	No
156300	ADP binding
156400	No
156500	No
156600	No
156700	Ring finger protein 11
156800	Ring finger protein 11
156900	No
157000	No
157100	Ring finger protein 11
157200	No
157300	Ring finger protein 11
157400	No
157500	Ring finger protein 11
157600	No
157700	No
157800	No
157900	No
158000	No
158100	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
158200	No
158300	Ring finger protein 11
158400	Ring finger protein 11 (SID 1669)
158500	Ring finger protein 11
158600	Anaphase-promoting complex (APC), subunit 11
158700	Ring finger protein 11
158800	No

158900	No
159000	No
159100	No
159200	No
159300	No
159400	Aminoacid transporter
159500	Protease inhibitor/seed storage/LTP family
159600	Ribonuclease P protein subunit P38-relate
159700	Triacylglycerol lipase activity
159800	No
159900	Triacylglycerol lipase activity
160000	Triacylglycerol lipase activity
160100	No
160200	No
160300	RNA-binding protein
160400	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent
160500	Dead box ATP-dependent RNA helicase
160600	Copeer transport protein ATOX1-related
160700	Phosphoenolpyruvate carboxylase activity

Tabla suplementaria 3.1. Sondas utilizadas en los ensayos de EMSA. Se indica nombre, característica, largo y secuencia de cada sonda.

Sonda	Característica	Tamaño (pb)	Secuencia
<i>SbGA2ox3</i>	Normal	242	GGGCGCCGT GGGAAAAC T GCT AT T GGCCG GCGT GCCAT CGCCT CGT AT CGT AT GCGT C T CCCAT GGAGCCAT GCAT GCAGCGCGGCG GGCCGACCT GCCACCGGT GGAT CGCGT CCG GACACGT CGCGCCCCGGACCCCGACT GCCC T GGCT CCAT CGGCACCGT GCACCCAAAGC GAT CCCACCCCGAT GCAT CCT T T T CGT C T CCCT GT CAGCT GGGT CCCAT CCAGCCAG GT GCCGCC
<i>SbGAMyb</i>	Control negativo	183	T CT GGAAGAACCAACAACCAT CCGT CCG AAGT T CAAGT T CT T CT GCT GGCACACCT T GT GAGACT ACT ACGGT GGT T AGCCAGAG GT T T GAT AT GGGCCAGGAAT AT T GGGAA GAACAGCCT GGT T CT T T CCT CAGT GAAT AT GCT CAT T T T AGT GGAAT T CT T T GAC CGAAT CCACT CCT
<i>AtEm6</i>	Control positivo	186	AGT T AAAGAACACGCGGCGAAGAAGT ACG GCCACT ACCACGT T CAAAGT AT ACGT CAG CT AAT AAAGT CAGACACGT GGCAT GT CA CCAAGAAAAGAGCAT ACGT AT GACGT ACCGAT T GT CCCT GAGT CACCACGT CGAA CAT CCACGAT GCAACACAACCAAAAACGCC CT CCGGAT T GA
<i>SbGA2ox3</i> “a”	ABRE y CE intactos	131	GGGCGCCGT GGGAAAAC T GCT AT T GGCCG GCGT GCCAT CGCCT CGT AT CGT AT GCGT C T CCCAT GGAGCCAT GCAT GCAGCGCGGCG GGCCGACCT GCCACCGGT GGAT CGCGT CCG GACACGT CGCGCCC
<i>SbGA2ox3</i> “b”	ABRE mutado y CE intacto	131	GGGCGCCGT GGGAAAAC T GCT AT T GGCCG GCGT GCCAT CGCCT CGT AT CGT AT GCGT C T CCCAT GGAGCCAT GCAT GCAGCGCGGCG GGCCGACCT GCCACCGGT GGAT CGCGT CCG GACAAT T CGCGCCC
<i>SbGA2ox3</i> “c”	CE mutado y ABRE no incluido	114	GGGCGCCGT GGGAAAAC T GCT AT T GGCCG GCGT GCCAT CGCCT CGT AT CGT AT GCGT C T CCCAT GGAGCCAT GCAT GCAGCGCGGCG GGCCGACCT GCT T CCGGT GGAT CGCGT

Tabla suplementaria 3.2. Nombre y código de identificación de proteínas GA2ox para 8 especies. Se indica además la base de datos correspondiente.

Especie	Nombre	Código de identificaciónID	Base de datos
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GA2ox1	ath:AT1G78440	KEGG
	GA2ox2	ath:AT1G30040	
	GA2ox3	ath:AT2G34555	
	GA2ox4	ath: AT1G47990	
	GA2ox6	ath: AT1G02400	
	GA2ox7	ath: AT1G50960	
	GA2ox8	ath:AT4G21200	
	GA3ox1	ath:AT1G15550	
	GA3ox2	ath:AT1G80340	
	GA3ox3	ath:AT4G21690	
	GA3ox4	ath:AT1G80330	
	GA20ox1	ath:AT4G25420	
	GA20ox2	ath:AT5G51810	
	GA20ox3	ath:AT5G07200	
	GA20ox4	ath:AT1G60980	
	GA20ox5	ath:AT1G44090	
<i>Vitis vinifera</i>	GA2ox1	vvi:100258599	KEGG
	GA2ox2	vvi:100248676	
	GA2ox3	vvi: 100244543	
	GA2ox4	vvi:100264177	
	GA2ox5	vvi:100248356	
<i>Medicago truncatula</i>	GA2ox1	MTR_1g086550	KEGG
	GA2ox2	MTR_2g019370	
	GA2ox3	MTR_2g033270	
	GA2ox4	MTR_4g096840	
<i>Oryza sativa</i>	GA2ox1	LOC_Os05g06670	Rice Genome Annotation Project Database
	GA2ox2	LOC_Os01g22920.1	
	GA2ox3	LOC_Os01g55240.1	
	GA2ox4	LOC_Os05g43880.1	
	GA2ox5	LOC_Os07g01340.1	
	GA2ox6	LOC_Os04g44150.1	
	GA2ox7	LOC_Os01g11150.1	
	GA2ox8	LOC_Os05g48700.1	
	GA2ox9	LOC_Os02g41954.1	
	GA2ox10	LOC_Os05g11810.1	
	GA2ox11	LOC_Os04g33360.1	
<i>Sorghum bicolor</i>	GA2ox1	Sb09g004520	
	GA2ox2	Sb03g013450	
	GA2ox3	Sb03g035000	
	GA2ox4	Sb09g006490	

<i>Populus trichocarpa</i>	GA2ox1	POPTR_550316	KEGG
	GA2ox2	POPTR_409194	
	GA2ox3	POPTR_758699	
	GA2ox4	POPTR_765885	
	GA2ox5	POPTR_723959	
	GA2ox6	POPTR_822902	
	GA2ox7	POPTR_245496	
<i>Zea mays</i>	GA2ox1	zma:100281860	KEGG
	GA2ox5	zma:100285694	
	GA2ox6	zma:100280480	
	GA2ox7	zma:100272456	
	GA2ox8	zma:100192514	
	GA2ox9	zma:100284370	

Figura suplementaria 3.1. Contexto genómico para el gen *SbGA2ox3*. Se muestra la ubicación, polaridad y distancia (en pb) de los genes próximos a *SbGA2ox3* (Sobic.003G300800).

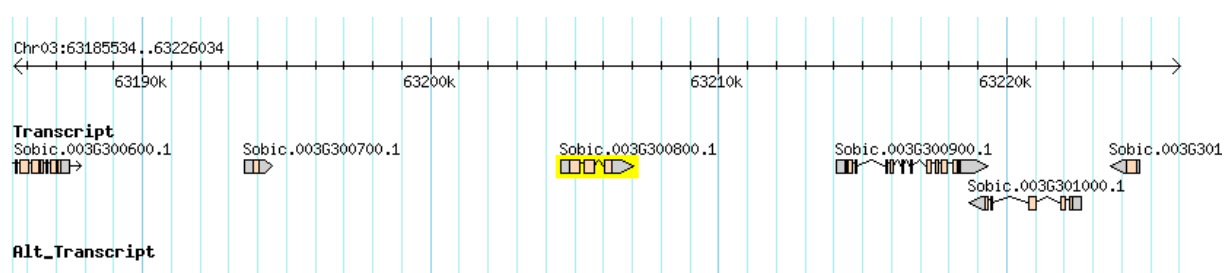


Figura suplementaria 3.2. Relaciones filogenéticas para proteínas GA2oxs. Las GA3oxs y GA20oxs de *Arabidopsis thaliana* fueron incluidas para poder comparar con un grupo externo. Las secuencias completas de las proteínas fueron alineadas usando Clustal WC (Thompson et al. 1997). Se utilizó MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) para construir un árbol filogenético por inferencia bayesiana, con 1.500.000 generaciones. Se indican los valores de brostrap. Las GA2oxs se dividieron en tres grupos diferentes: I, II y III. Los miembros de los grupos I y II catabolizan C19-GAs, mientras que los del grupo III catabolizan C20-GAs. At: *Arabidopsis thaliana*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Mt: *Medicago truncatula*; Os: *Oryza sativa*; Pt: *Populus trichocarpa*; Sb: *Sorghum bicolor*; Vv: *Vitis vinifera*; Zm: *Zea mays*.

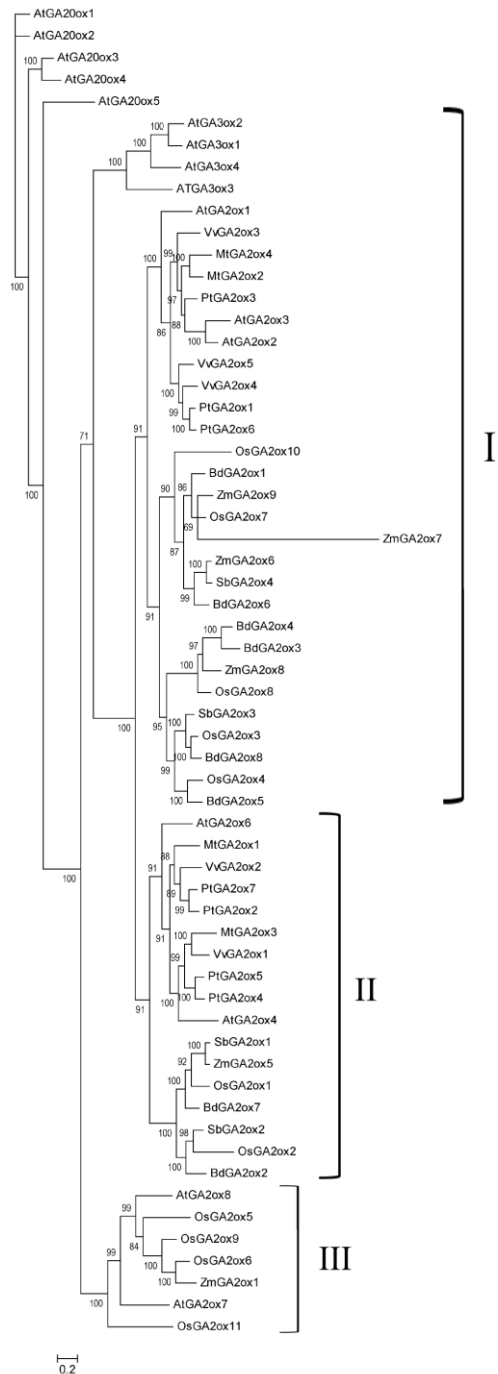


Figura suplementaria 3.3. Alineamiento de la secuencia de la sonda *SbGA2ox3* para los genotipos de *Sorghum bicolor* IS9530 y RedlandB2. Las secuencias se alinearon completamente con el software Clustal W (Thompson et al., 1997).

```

IS9530      -505  GGGCGCCGTGGGAAAAGTCTATTGGCCGGCGTGCCATCGCCTCGTATCGTATGCGTCTC
RedlandB2  -505  GGGCGCCGTGGGAAAAGTCTATTGGCCGGCGTGCCATCGCCTCGTATCGTATGCGTCTC
*****

IS 9530      CCATGGAGCCATGCATGCAGCGCGGCGGGCCGACCTGCCACCGGTGGATCGCGTCCGGAC
RedlandB2    CCATGGAGCCATGCATGCAGCGCGGCGGGCCGACCTGCCACCGGTGGATCGCGTCCGGAC
*****

IS9530      ACGTCGCGCCCCGGACCCCGACTGCCCTGGCTCCATCGGCACCGTGCACCCAAAGCGATC
RedlandB2    ACGTCGCGCCCCGGACCCCGACTGCCCTGGCTCCATCGGCACCGTGCACCCAAAGCGATC
*****

IS9530      CCACCCCGATGCATCCTTTTCGTCTCCCTGTCAGCTGGGTCCCATCCAGCCAGGTGCCG
RedlandB2    CCACCCCGATGCATCCTTTTCGTCTCCCTGCCAGCTGGGTCCCATCCAGCCAGGTGCCG
*****

IS9530      CC -263
RedlandB2    CC -263
**

```

Figura suplementaria 3.4. Arquitectura de dominios de las proteínas GA2oxs de monocotiledóneas del grupo I. Se muestra la similitud en composición y ubicación de los dominios. La *SbGA2ox4* aparece como una versión truncada de la *SbGA2ox3*.

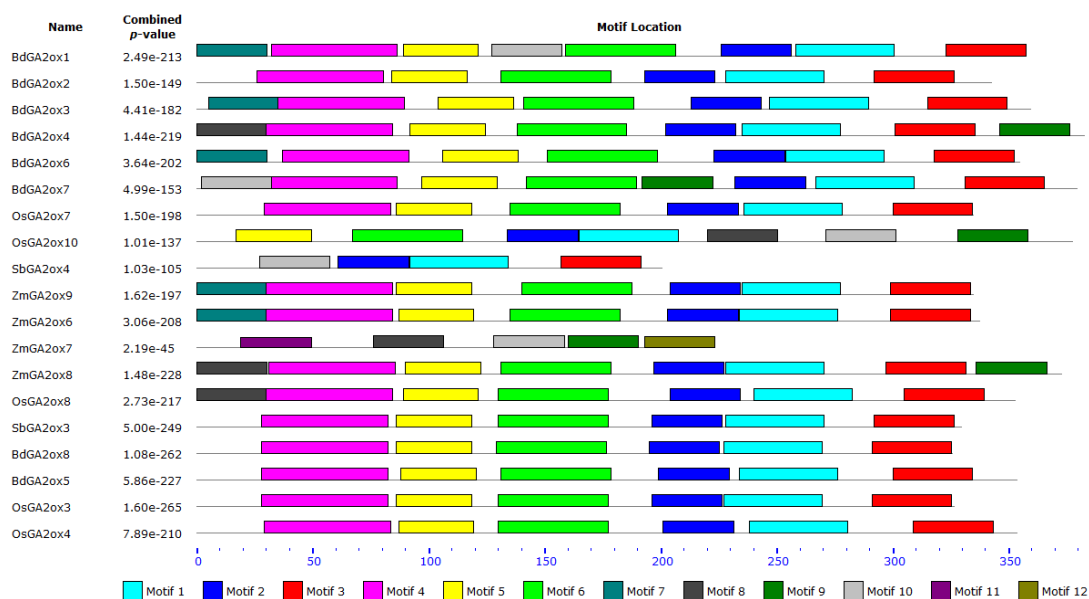


Figura suplementaria 3.5. Comparaciones entre los promotores de cada uno de los miembros del grupo M3 (BdGA2ox5, BdGA2ox8, OsGA2ox3 y OsGA2ox4) y el promotor de SbGA2ox3, realizadas con la herramienta EARS. La línea punteada indica el p valor de corte (0.0001), sugiriendo la existencia de los picos significativos 1 y 2 en todos los casos.

