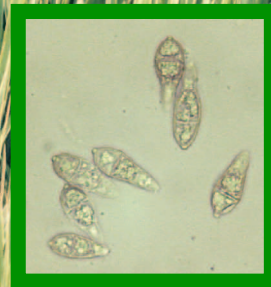


ESTRATÈGIES PER A LA MILLORA DE LA RESISTÈNCIA DE L'ARRÒS (*Oryza sativa* L) FRONT AL LEPIDÒPTER *Chilo suppressalis* I FRONT A FONGS FITOPATÒGENS

LAURA VILA UJALDÓN



Bellaterra 2003

Universitat Autònoma de Barcelona

**Estratègies per a la millora de la resistència de
l'arròs (*Oryza sativa* L) front al lepidòpter
Chilo suppressalis i front a fongs fitopatògens**

Memòria presentada per:

Laura Vila Ujaldón

Per a optar al grau de

Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat sota la direcció de la
Dra. Blanca San Segundo de los Mozos
al centre IBMB-CSIC de Barcelona

Dra Blanca San Segundo
Director de la tesi doctoral

Laura Vila Ujaldón

Dr Josep A. Biosca Vaqué
Tutor del Dept. Bioquímica
i Biologia Molecular

Bellaterra, 2003

Als quatre magnífics:

Lluís i Núria

Roger i Sebi

ÍNDEX GENERAL	i
ABREVIATURES	ii
OBJECTIUS	1
INTRODUCCIÓ	2
1. L'agricultura: la millora de les espècies vegetals	2
2. L'arròs i el seu cultiu en les zones mediterrànies	4
2.1 <i>Chilo suppressalis</i> , plaga de l'arròs	
2.2 <i>Magnaporthe spp</i> , patogen dels arrossars	
3. Les plantes ornamentals: el gerani	11
3.1 <i>Cacyreus marshalli</i> , la plaga del gerani	
4. Els mecanismes naturals de defensa de plantes	14
4.1 Interaccions planta-patogen	
4.2 Estratègies de defensa de les plantes	
4.3 Proteïnes relacionades amb patogènia (PRs)	
4.4 Resposta Sistèmica Adquirida (SAR) i Resistència Sistèmica Induïda (ISR)	
4.5 Fitohormones relacionades amb la resposta defensiva	
5. Resposta defensiva front l'atac d'insectes	27
5.1 Els inhibidors de proteases	
5.2 Classificació dels inhibidors de proteases	
5.2.1 Inhibidors de serinaproteases	
5.2.2 Inhibidors de cisteïnaproteases	
5.2.3 Inhibidors de aspartilproteases	
5.2.4 Inhibidors de metal·loproteases	
5.3 Les proteases digestives d'insectes	
5.4 L'inhibidor de proteases de blat de moro, <i>mpi</i>	
5.4.1 Activitat de la proteïna MPI front proteases digestives d'insectes	
5.4.2 El gen <i>mpi</i>	
6. Els pèptids antimicrobians i la seva aplicabilitat en la millora de la resistència de plantes a patògens	45
6.1 La cecropina A i els pèptids sintètics derivats de la mateixa	
6.2 Proteïnes antifúngiques produïdes per microorganismes del sòl	
6.2.1 Proteïnes secretades per <i>Aspergillus</i>	
7. Les tècniques de transformació de plantes	56
8. Cultius transgènics: del laboratori al camp de conreu	61
8.1 Plantes resistents a plagues: gens codificants per inhibidors de proteases	
8.2 Plantes resistents a fongs	

RESULTATS**71****I. EXPRESSIÓ DEL GEN *mpi* (Maize Proteinase Inhibitor) DE BLAT DE MORO EN PLANTES D'ARRÒS**

I.1 Expressió constitutiva del gen <i>mpi</i> (maize proteinase inhibitor) de blat de moro en plantes d'arròs	71
I.1.1 Preparació de les construccions per a la transformació	
I.1.2 Transformació de plantes d'arròs (varietats Sènia i Ariete)	
I.1.3 Anàlisi de les plantes d'arròs transgèniques	
I.1.3.1 Nivells d'acumulació de la proteïna MPI en plantes transgèniques	
I.1.3.2 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies d'arròs (varietat Ariete) seleccionades	
I.1.3.3 Activitat de l'inhibidor MPI de plantes transgèniques	
I.1.4 Bioassaigs amb plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen <i>mpi</i> front larves del lepidòpter <i>Chilo suppressalis</i>	
I.1.4.1 Resistència a la infestació amb larves de <i>Chilo suppressalis</i> de les plantes transgèniques	
I.1.4.2 Efectes de l'expressió del gen <i>mpi</i> en plantes transgèniques d'arròs, en el pes i el desenvolupament larvari de <i>Chilo suppressalis</i>	
I.1.4.2.a Larves alimentades en plantes transgèniques de la varietat Sènia	
I.1.4.2.b Larves alimentades en plantes transgèniques de la varietat Ariete	
I.2 Anàlisi funcional del promotor del gen <i>mpi</i> en plantes d'arròs	97
I.2.1 Preparació de les construccions per a la transformació	
I.2.2 Transformació de plantes d'arròs	
I.2.3 Anàlisi de les plantes transgèniques	
I.2.3.1 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies seleccionades	
I.2.3.2 Anàlisi histoquímic de l'expressió del gen <i>uidA</i> (enzim GUS) en plantes transgèniques	
I.2.3.3 Expressió del gen <i>uidA</i> en teixits de la planta d'arròs i en resposta a ferida mecànica	
I.2.3.3.a Cinètica d'inducció per ferida mecànica en fulla	
I.2.3.3.b Inducció per ferida mecànica a nivell local i sistèmic	
I.3 Expressió induïble del gen <i>mpi</i> en plantes d'arròs	114
I.3.1 Preparació de les construccions per a la transformació	
I.3.2 Transformació de plantes d'arròs (varietat Ariete)	
I.3.3 Anàlisi de les plantes transgèniques	
I.3.3.1 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies seleccionades	
I.3.3.2 Acumulació de la proteïna MPI en teixits ferits de plantes transgèniques	

I.3.4 Bioassaigs amb plantes arròs amb expressió induïble del gen <i>mpi</i> front larves del lepidòpter <i>Chilo suppressalis</i>	127
I.4 Efecte de l'expressió del gen <i>mpi</i> en plantes d'arròs sobre les proteases digestives de <i>Chilo suppressalis</i>	127
I.4.1 pH òptim de les activitats proteolítiques digestives de <i>Chilo suppressalis</i>	
I.4.2 Efecte de l'expressió transgènica del gen <i>mpi</i> en les proteases digestives de <i>Chilo suppressalis</i>	
I.5 Efecte de l'inhibidor <i>mpi</i> en les activitats proteolítiques digestives de <i>Cacyreus marshalli</i>	134
I.5.1 pH òptim de les activitats proteolítiques digestives de <i>Cacyreus marshalli</i>	
I.5.2 Efecte de l'inhibidor <i>mpi</i> sobre les activitats proteolítiques digestives de <i>Cacyreus marshalli</i>	
II. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA FRONT FITOPATÒGENS	
II.1 Activitat antifúngica de la cecropina A front fitopatògens	138
II.1.1 Assaigs antifúngics <i>in vitro</i> amb cecropina A front <i>Fusarium moniliforme</i> i <i>Magnaporthe grisea</i>	
II.1.2 Assaigs antifúngics <i>in vitro</i> amb el pèptid curts derivats de la cecropina A	
II.2 Activitat antifúngica de la proteïna AFP (Antifungal Protein) d'<i>Aspergillus giganteus</i> front fitopatògens	145
II.2.1 Efecte de la proteïna AFP en el creixement <i>in vitro</i> de <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> i <i>Phytophthora infestans</i>	
II.2.2 Efecte de la proteïna AFP en el creixement <i>in vitro</i> d'altres fongs fitopatògens	
II.2.3 Estabilitat de la proteïna AFP	
II.2.4 Viabilitat de protoplastes d'arròs en presència de la proteïna AFP	
II.2.5 Protecció de plantes d'arròs front <i>Magnaporthe grisea</i> mitjançant l'aplicació directe de proteïna AFP	
DISCUSSIÓ	157
I. EXPRESSIÓ DEL GEN <i>mpi</i> (<i>Maize Proteinase Inhibitor</i>) DE BLAT DE MORO EN PLANTES D'ARRÒS	157
II. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA FRONT FITOPATÒGENS	185

MATERIALS I MÈTODES **194**

A. MATERIALS **194**

1. Material biològic

- 1.1 Bacteris
- 1.2 Fongs i oomicets
- 1.3 Plantes
- 1.4 Insectes

2. Material nucleic

- 2.1 Plasmidis
- 2.2 Oligonucleòtids
- 2.3 Construccions

3. Anticossos**4. Medis de cultiu**

- 4.1 Bacteris
- 4.2 Fongs i oomicets
- 4.3 Plantes

5. Tampons i solucions

B. MÈTODES **198**

1. Relacionats amb àcids nucleics **198**

- 1.1 Extracció d'ADN genòmic
- 1.2 Obtenció d'ADN plasmídic
 - 1.2.1 A gran escala
 - 1.2.2 Minipreparacions
- 1.3 Subclonatge de fragments d'ADN en plasmidis
 - 1.3.1 Reaccions de modificació de l'ADN
 - 1.3.2 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa
- 1.4 PCR
 - 1.4.1 Condicions de PCR emprades en aquest treball
 - 1.4.2 Clonatge de fragments d'ADN amplificats per PCR
- 1.5 Transformació amb CaCl₂
- 1.6 *Cracking* per al ràpid cribratge de plasmidis recombinants
- 1.7 Cinètica de seleccions unidireccionals
- 1.8 Hibridació Southern
 - 1.8.1 Transferència de l'ADN a filtre de niló
 - 1.8.2 Hibridació
 - 1.8.3 Marcatge de la sonda

2. Relacionats amb proteïnes	204
2.1. Extracció de proteïnes totals	
2.1.1 Extracció de proteïnes totals de teixits vegetals	
2.1.2 Extracció de proteïnes totals d'intestins de larves de Lepidòpters	
2.2 SDS-PAGE	
2.3 Immunotransferència	
2.3.1 Transferència	
2.3.2 Immunodetecció	
2.4 Determinació d'activitats proteolítiques	
2.4.1 Activitat proteolítica total d'extractes proteics	
2.4.2 Inhibició de les activitats proteolítiques totals d'extractes proteics	
2.4.3 Activitat proteolítica d'extractes proteics utilitzant substrats específics (SA ₃ pNA i SA ₂ PPpNA)	
3. Transformació d'arròs	210
4. Bioassaigs	217
5. Anàlisis histoquímics de l'expressió del gen <i>uidA</i> (enzim GUS) en plantes transgèniques	218
6. Assaigs d'activitat antifúngica de pèptids i proteïnes	219
6. 1 Assaigs d'activitat antifúngica <i>in vitro</i>	
6. 2 Assaigs d'activitat antifúngica <i>in vitro</i> en presència d'ICF	
6.2.1 Extracció d'ICF d'arròs	
6.2.2 Assaig d'activitat antifúngica <i>in vitro</i> en presència d'ICF	
6. 3 Assaigs de resistència a patògens en arròs	
7. Viabilitat de protoplastes d'arròs	221
7.1 Obtenció de protoplastes d'arròs	
7.2 Viabilitat de protoplastes d'arròs en presència de la proteïna AFP	
CONCLUSIONS	223
BIBLIOGRAFIA	225
AGRAÏMENTS I MÉS	251

ABREVIATURES

ABA	àcid abscísic
Ac	anticòs
ADN	àcid desoxiribonucleic
AFP	<i>Antifungal Protein</i>
Amp	ampicilina
ANA	àcid naftalè acètic
APS	persulfat amònic
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatger
ARNr	àcid ribonucleic ribosomal
BAP	benzil amino purina
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
BrEt	bromur d'etidi
C-terminal	carboxiterminal
Da	daltons
DTT	ditiotreitòl
DMSO	dimetilsulfòxid
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
<i>Et al.</i>	<i>Et alter</i> , i col·laboradors
FDA	diacetat de fluoresceïna
GUS	β -glucuronidasa
Higro	higromicina
ICF	fluids intercel·lulars
ISR	resistència sistèmica induïda
JA	Jasmonat
Kan	kanamicina
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
L1, L2, L3...	estadi de desenvolupament larvari 1, 2... (insectes)
LB	Luria-Bertani
MeJA	Metiljasmonat
MPI	<i>Maize Protease Inhibitor</i>
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
N-terminal	aminoterminal
p.ex.	per exemple
p/v	pes/volum
pb	parells de bases
pBSK	<i>pBluescript SK</i>
PCI	<i>Potato Carboxipeptidase Inhibitor</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PRs	proteïnes de resistència
Rif	rifampicina
RNAsa	ribonucleasa
SA	àcid salicílic
SA ₂ PLpNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide</i>
SA ₃ pNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide</i>
SA ₃ PPpNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide</i>
SAR	resposta sistèmica adquirida
SBBI	<i>Soybean Bowman-Birk Inhibitor</i>
SDS	sodi dodecil sulfat
T0, T1, T2...	generació 0, 1, 2... (plantes)
TA	temperatura ambient
Temed	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
Tm	temperatura d'hibridació
ubi	ubiquitina
UV	ultraviolat
v	volum
X-GLU	5-bromo-4-clor-3-indol β -D-glucurònid

OBJECTIUS

L'objectiu del present treball s'enmarca dins d'un projecte més general dirigit a l'obtenció de plantes transgèniques d'arròs amb una millora de la resistència a l'atac d'insectes. Així mateix, es planteja evaluar la utilitat de determinades proteïnes i pèptids com a agents antifúngics, aplicables a la transformació de plantes (incloent l'arròs) i protecció front a fitopatògens. Per a la millora de la resistència de l'arròs a l'atac d'insectes, i centrant-nos en el lepidòpter *Chilo suppressalis*, s'utilitzà el gen de blat de moro que codifica per un inhibidor de proteases, el gen *mpi* (*Maize Proteinase Inhibitor*). Per altra banda, amb l'objectiu de la millora de la resistència de l'arròs a patògens, s'estudiaren les característiques antifúngiques de la Cecropina A i de pèptids sintètics derivats d'ella. Així mateix, s'analitzaren les propietats antifúngiques de la proteïna AFP (*Antifungal Protein*) d'*Aspergillus giganteus*.

Els objectius concrets d'aquest treball de recerca, encaminats vers l'assoliment d'aquest objectiu més general, són els que s'anumeren a continuació:

I. Expressió del gen *mpi* (*Maize Proteinase Inhibitor*) de blat de moro en plantes d'arròs:

- Expressió del gen *mpi* en plantes d'arròs sota control d'un promotor constitutiu i evaluació de les propietats de resistència de les plantes transgèniques a la infestació amb larves de *Chilo suppressalis*.
- Efecte de l'expressió del gen *mpi* en plantes transgèniques d'arròs, en el pes i desenvolupament larvari de *Chilo suppressalis*, i sobre les proteases digestives de *Chilo suppressalis*.
- Anàlisi funcional del promotor del gen *mpi* en plantes transgèniques d'arròs.
- Expressió del gen *mpi* sota control del seu propi promotor (expressió induïble) en plantes d'arròs, i efecte de la seva expressió en el pes i desenvolupament larvari de *Chilo suppressalis*.

II. Activitat antifúngica de proteïnes i pèptids d'origen no vegetal front fitopatògens:

- Activitat de la cecropina A i dels pèptids sintètics, Pep3 i Trimer-Pep3, derivats de la mateixa sobre fongs fitopatògens.
- Activitat de la proteïna AFP (*Antifungal Protein*) d'*Aspergillus giganteus* front fongs fitopatògens.