

### 5.4.2 El gen *mpi*

En el nostre laboratori es va estudiar l'expressió del gen *mpi* en la planta d'origen, el blat de moro (Cordero *et al.*, 1994), podent-se comprovar que l'expressió d'aquest gen és induïble per ferida mecànica, i es dona inducció local i sistèmica (en fulles de la planta on no hi ha hagut ferida). També es pogué determinar que tractaments amb les fitohormones àcid abscísic i metiljasmonat estimulen l'acumulació d'ARNm d'MPI, essent més forta en el cas del metiljasmonat (Cordero *et al.*, 1994). Aquests resultats suggereixen que la inducció del gen *mpi* en blat de moro sembla correspondre a la resposta defensiva de plantes a l'atac d'insectes per la via dels àcids octadecanoides, descrita en plantes dicotiledònies (veure introducció de l'*Apartat 5*). Quant larves del lepidòpter *Spodoptera littoralis* eren alimentades en fulles de blat de moro (plàntules), l'MPI s'acumulava a les zones adjacents a la zona on s'alimentava la larva. El nivell d'acumulació de l'inhibidor MPI és més alt en les fulles en què s'alimentaven les larves, que en les fulles ferides mecànicament. Així mateix, quant el període d'alimentació de les larves era més llarg, el nivell d'acumulació d'inhibidor MPI en la fulla era més gran (Tamayo *et al.*, 2000).

Tot i que no es coneix encara el mecanisme molecular exacte pel qual l'àcid jasmònic (JA) estimula l'expressió dels gens de defensa en resposta a ferida, s'han identificat diferents seqüències en els promotors d'alguns gens, que actuarien com elements *cis* associats a la resposta a ferida o, més concretament, a resposta a JA o MeJA, el seu metil·èster. La *Taula 22* mostra les seqüències dels principals elements *cis* de resposta a ferida o JA proposats per diversos autors.

En varis d'aquests estudis, s'ha descrit que moltes d'aquestes seqüències consens apareixen per duplicat o formant multímers (de forma directe o inversa), i requereixen certa proximitat en la seqüència del promotor, per a un correcte posicionament dels factors de transcripció (Rouster *et al.*, 1997; Eulgem *et al.*, 2000). Cal esmentar que la W-box (veure (\*\*)) a la *Taula 22* és l'element *cis* on s'uneixen els factors de transcripció de plantes de la superfamília WRKY. Aquests factors de transcripció es veuen representats en moltes espècies vegetals i actuen en gran nombre de processos fisiològics que inclouen la defensa front patògens, senescència, desenvolupament de tricomes... (Eulgem *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002).

En el nostre laboratori s'aïllà i caracteritzà un fragment de 689 pb, de la regió promotora del gen *mpi* (Cordero *et al.*, 1994). En aquest fragment de la zona promotora s'identificà una caixa TATA (TATAAATA). El punt d'inici de transcripció està situat 23 pb riu avall de la caixa TATA. Així mateix s'identificà un intró de 108 nucleòtids en la regió 5' no traduïda del gen *mpi* (veure *Figura 1 de Resultats I*).

Treballs posteriors, realitzats en col·laboració amb el Dr. Emmanuel Guiderdoni, al CIRAD-Montpellier, es centraren en l'estudi d'aquest fragment del promotor (més l'intró) del gen *mpi*, que anomenaren C1 (fragment -689/+197). Es volgué determinar si aquest fragment del promotor del gen *mpi* era funcional, i conservava la seva inductivitat per ferida en plantes transgèniques d'arròs. Així mateix, es volgué determinar si aquest fragment de promotor permetia uns nivells suficients d'expressió d'un gen insecticida (gen *cry1B* de *Bacillus thuringiensis*), que permetessin protegir les plantes d'arròs transgèniques front el lepidòpter *Chilo suppressalis* (Breitler *et al.*, 2001). Aquests estudis permeteren determinar que el fragment -689/+197 del gen *mpi*, és funcional en arròs i que permet assolir un nivells suficients d'expressió del gen insecticida *cry1B*. Aquests nivells d'expressió, induïble per ferida, permeten obtenir el 100% de mortalitat en larves de *C. suppressalis* (estadi L2) després de 8 dies d'alimentació de les larves en les plantes transgèniques (Breitler *et al.*, 2001).

<b>Gen</b>	<b>Seqüència consens</b>	<b>Espècie on s'ha aïllat</b>	<b>Referència</b>
<b>pin2</b> (inhibidor de proteases de patata)(*)	<b>CACGTGG</b>	patata	Kim (1992)
<b>lox1</b> (lipoxigenasa 1)	<b>TGACG i CGTCA</b>	ordi	Rouster (1997)
<b>wun1</b> (gen induïble per ferida)	<b>GAGTA</b>	patata	Siebertz (1989)
<b>cd1</b> (inhibidor de la catepsina D)	<b>GAGTA i TACTC</b>	patata	Ishikawa (1994)
<b>lap 17.1 i lap 17.2</b> (leucin-aminopeptidases)	<b>GAGTA</b>	tomàquet	Ruíz-Rivero (1998)
<b>FAD7</b> ( $\omega$ -3 àcid gras desaturasa)	<b>TAACAAA</b>	<i>Arabidopsis</i>	Nishiuchi (1999)
<b>altres gens de defensa(**)</b>	<b>(T)(T)TGAC(C/T)</b>	ordi, tabac	Eulgem (2000)

**Taula 22: Elements cis de resposta a àcid jasmònic i/o ferida, aïllats en promotors de gens implicats en la resposta defensiva de plantes. (\*) G-box; (\*\*) W-box.**

Estudis realitzats mitjançant fusió al gen informador *gus* en plantes transgèniques d'arròs han permès conèixer una altra característica interessant d'aquest fragment C1, i és que no presenta activitat en l'endosperm d'arròs. Aquesta característica fa el promotor *mpi* encara més interessant de cara a la seva utilització, juntament amb gens insecticides, en la transformació d'una espècie destinada al consum humà com és l'arròs, des del punt de vista de la seva acceptació per part del consumidor. A més a més, aquest promotor no és funcional en el pol·len, aspecte també important des del punt de vista mediambiental ja que limitaria el risc d'efectes no desitjats en la població d'insectes no perjudicials.

Fins a l'actualitat, en la majoria de cultius transgènics obtinguts, l'expressió del transgen es troba sota control de promotors constitutius. L'aïllament i caracterització de promotors induïbles i la seva utilització en transgènia permetrien, doncs, una expressió dels gens insecticides només quan la planta fos atacada, evitant així el malbaratament de recursos i desgast del metabolisme de la planta, que es dona en expressions constitutives.

Els estudis en plantes transgèniques d'arròs anteriorment citats (Breitler *et al.*, 2001), indicaven que els nivells d'inducció del gen *mpi* per ferida no eren molt elevats comparant-los amb la inductibilitat que s'observà per aquest gen en blat de moro (Cordero *et al.*, 1994). Es va considerar la possibilitat de que en la regió 5' distal del promotor del gen *mpi* existissin elements *cis*, com elements potenciadors de la resposta front ferida.

Així doncs, el present estudi s'ha centrat en la caracterització de la regió promotora del gen *mpi*, més enllà de la posició -689. S'han transformat plantes d'arròs amb fragments més llargs de la regió promotora fusionats al gen informador  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*). Amb aquestes plantes transgèniques s'han dut a terme estudis per la funcionalitat del promotor *mpi*, en diferents teixits i en resposta a ferida mecànica, en plantes d'arròs.

## **6. Els pèptids antimicrobians i la seva aplicabilitat en la millora de la resistència de plantes a patògens**

---

Dins dels sistemes de defensa que han desenvolupat els éssers vius front l'atac de microorganismes, la producció de pèptids antimicrobians és un dels recursos defensius més estesos. Fins a l'actualitat s'ha descrit més de 500 pèptids antimicrobians procedents de gran varietat d'organismes: bacteris, fongs, insectes, plantes, vertebrats... Aquesta extensa distribució suggereix que, aquests pèptids antimicrobians, han jugat un paper important en l'evolució dels organismes superiors multicel·lulars, arribant a formar part del sistema immunitari innat dels vertebrats (Zasloff, 2002).

La majoria d'aquest pèptids antimicrobians són petits (< 50 aminoàcids), molt bàsics (presenten molts residus de lisina i arginina) i contenen aproximadament el 50% dels

aminoàcids hidrofòbics (Hancock & Diamond, 2000). Tenen càrrega positiva a pH fisiològic, aquesta càrrega positiva facilita l'atracció electrostàtica a superfícies carregades negativament com per exemple l'envolta de gran varietat de virus, bacteris o fongs (Van der Biezen, 2001).

Molts d'aquests pèptids antimicrobians deriven de precursors més llargs, que inclouen una seqüència senyal. Les modificacions post-transcripcionals que pateixen aquests precursors inclouen processament proteolític, i en alguns casos glicosilació, amidació carboxiterminal i/o isomerització d'aminoàcids (Zasloff, 2002).

Així mateix, molts d'aquests pèptids formen estructures secundàries amfipàtiques, que els permeten interaccionar amb membranes de diferents microorganismes, mitjançant interaccions electrostàtiques. Els tipus més comuns d'estructura secundària que adopten els pèptids antifúngics són l'estructura en fulles- $\beta$ , estabilitzades mitjançant de 2 a 4 ponts de disulfur; i l'estructura d'hèlix- $\alpha$  (que adopten en entrar en contacte amb una membrana). L'estructura dels pèptids antifúngics ha estat el criteri seguit per a la classificació d'aquests pèptids en diferents famílies, tal com és mostra en la *Taula 23*.

<b>Classificació dels pèptids antimicrobians</b>	
<b>hèlix-<math>\alpha</math></b>	cecropina A <sup>1</sup> , magainin <sup>2</sup> , melitina <sup>1</sup>
<b>1 pont disulfur</b>	<i>bactenecin</i> <sup>3</sup> , <i>thanatin</i> <sup>1</sup> , <i>ranalexin</i> <sup>2</sup>
<b>2 ponts disulfur</b>	<i>tachyplestin</i> <sup>5</sup> , androctonina <sup>4</sup>
<b>3 ponts disulfur</b>	$\alpha$ , $\beta$ , $\theta$ -defensines <sup>3</sup> , tionina <sup>6</sup>
<b>4 ponts disulfur</b>	defensina <sup>6</sup> , <i>drosomicin</i> <sup>1</sup>
<b>lineal, no hèlix-<math>\alpha</math></b>	<i>apidaecin</i> <sup>1</sup> , PR-39 <sup>3</sup> , <i>indolicidin</i> <sup>3</sup>

**Taula 23:** Classificació dels pèptids antimicrobians de plantes i animals, segons la seva estructura. Es citen alguns dels pèptids que pertanyen als diferents grups i se n'indica l'origen: <sup>1</sup> insecte; <sup>2</sup> amfibi; <sup>3</sup> mamífer; <sup>4</sup> artròpode; <sup>5</sup> crustaci; <sup>6</sup> planta (segons Zasloff, 2002).

L'estructura en fulles- $\beta$  és típica de les defensines, mentre que l'estructura en hèlix- $\alpha$  és el motiu típic dels pèptids de la família de la magainin i de les cecropines (Lehrer *et al.*, 1993; Boman, 1995).

Les defensines són pèptids antimicrobians àmpliament representats en vertebrats ( $\alpha$  i  $\beta$ -defensines del sistema immunitari), plantes i insectes. Les defensines de plantes pertanyen a la família PR-12 de les proteïnes de defensa PR (veure apartat 4.3).

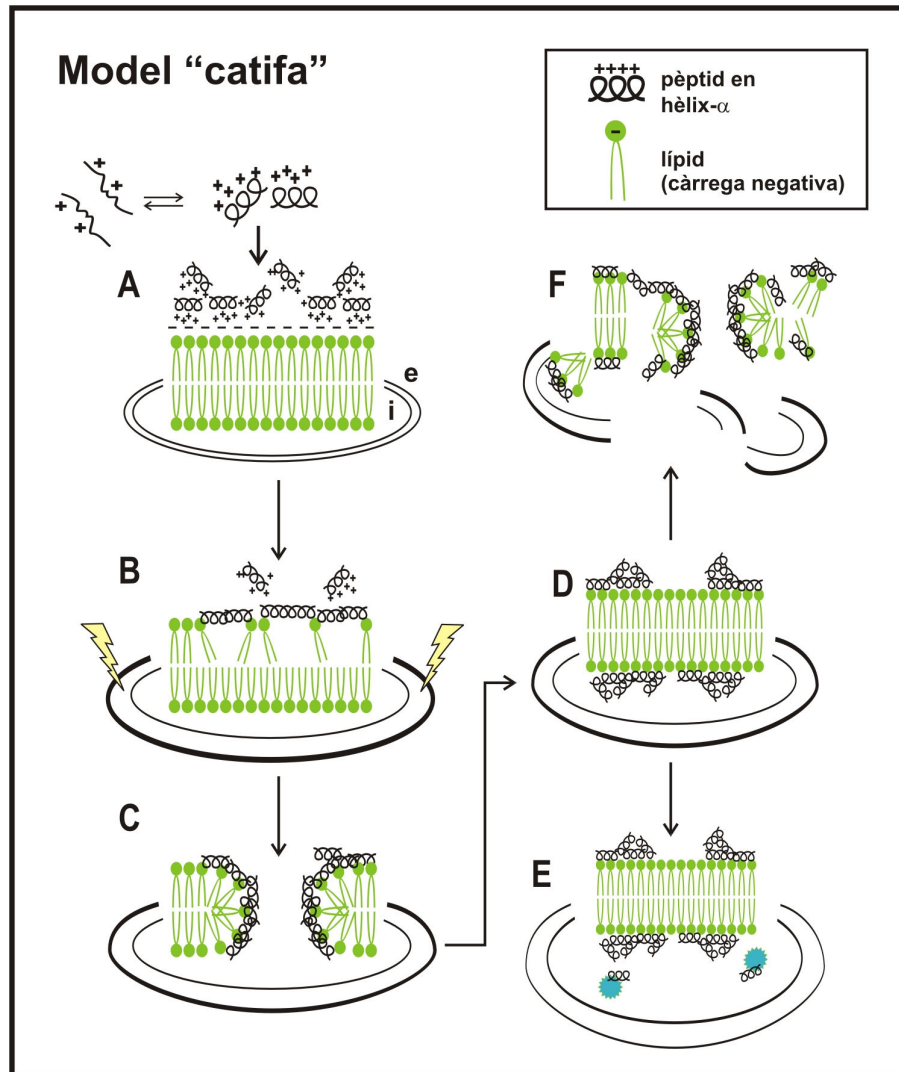
Les tionines de plantes pertanyen a la família PR-13 de les proteïnes de defensa (veure apartat 4.3).

Les magainines presenten una estructura típica d'hèlix- $\alpha$ . La magainin fou aïllada per primera vegada de la pell de la granota africana *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987). Mostra un ampli espectre d'activitat antimicrobiana contra bacteris, fongs i protozous, generalment a una concentració en el rang de 10-100  $\mu\text{g/ml}$ ; contràriament és necessària una concentració d'1 mg/ml per lliar cèl·lules de mamífer, com per exemple eritròcits; per tant, aquests pèptids presenten toxicitat selectiva contra microorganismes (Matsuzaki, 1999). Estudis recents amb anàlegs de la magainin, han permès demostrar l'augment de la resistència de plantes de tabac transgèniques, tant front bacteris com fongs patògens (Li *et al.*, 2001).

La melitina, principal component del verí de les abelles, és un pèptid amfipàtic de 26 aminoàcids (Habermann, 1972). L'estructura de la melitina és, com en el cas de la magainin i de les cecropines, d'hèlix- $\alpha$ . La melitina presenta una forta activitat antimicrobiana, però també és tòxica per a les cèl·lules eucariòtiques (Hancock *et al.*, 1999). Per altra banda, anàlegs de la melitina presenten activitat contra virus de plantes (Marcos *et al.*, 1995).

Les cecropines són components clau de la resposta immune dels insectes; les cecropines foren aïllades, per primera vegada, de l'hemolimfa immune de la papallona nocturna *Hyalophora cecropia* (Steiner *et al.*, 1981). Fins a l'actualitat s'ha descrit l'existència de varis tipus de cecropines: la cecropina A, la B i la D. Diferents estudis han demostrat que, a concentracions baixes (0,1-5  $\mu\text{M}$ ), les cecropines presenten activitat antibacteriana contra gran nombre de bacteris gramnegatius i grampositius, però no contra cèl·lules eucariòtiques (Sharma *et al.*, 2000). Aquestes característiques fan de les cecropines uns bons candidats per a la millora de la resistència de plantes contra microorganismes, mitjançant tècniques de transgènia (veure més endavant).

El mode d'acció dels pèptids antifúngics amb estructura hèlix- $\alpha$ , com per exemple les cecropines, ha estat objecte de nombrosos estudis en els darrers anys. L'acció antimicrobiana es basa en la permeabilització i/o disrupció de la membrana i que condueix a la mort de la cèl·lula. Malgrat que han anat apareixent diferents hipòtesis, actualment el model que millor explica l'activitat de la majoria dels pèptids antimicrobians coneguts és el model de Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Silvestro & Axelsen, 2000; Matsuzaki, 2001; Zasloff, 2002). Aquest model proposa la interacció del pèptid amb la membrana, seguit d'un desplaçament dels lípids, l'alteració de l'estructura de la membrana i, en certs casos, l'entrada del pèptid a l'interior de la cèl·lula diana (Zasloff, 2002). La *Figura 24* mostra el mecanisme d'acció dels pèptids antifúngics segons el model SMH, model també anomenat de "catifa".



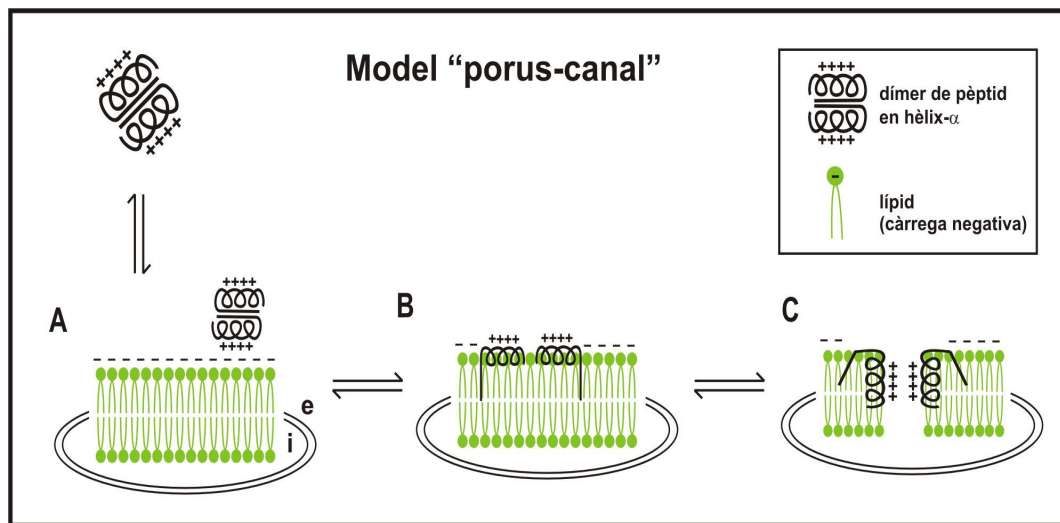
**Figura 24:** Mecanisme d'acció dels pèptids hèlix- $\alpha$  antimicrobians segons el model Shai-Matsuzaki-Huang (SMH), model “catifa”. **A**, els pèptids adopten la conformació d'hèlix- $\alpha$  en entrar en contacte amb la membrana del microorganisme, i es situen, segons el model de “catifa”, en la capa exterior de la bicapa lipídica; **B**, la integració dels pèptids en la membrana condueix a l'engruiximent de la capa exterior, la superfície d'aquesta s'expandeix en relació a la capa interior, resultant en una forta tensió dins la bicapa (fletxes dentades grogues); **C**, fase de transició i formació transitòria de porus toroïdals; **D**, transport de lípids i pèptids des de la capa exterior a la interior; **E**, difusió dels pèptids cap a dianes intercel·lulars; **F**, o col·lapse i trencament físic de la membrana diana. S'indiquen les capes exterior (e) i interior (i) de la bicapa lipídica. (Adaptat de Zasloff, 2002).

Un altre dels possibles mecanismes d'acció dels pèptids capaç de provocar la mort cel·lular és el model de formació de porus-canal, que es presenta a la *Figura 25*. Aquest model es basa en la multimerització de monòmers de cecropina que formaran, i recobriran, el porus en la membrana de la cèl·lula (situació equivalent a la mostrada en el model SMH, a

la *Figura 24-C*). La formació dels porus condueix a l'alliberament del contingut citoplasmàtic i a la lisi cel·lular (Christensen *et al.*, 1988; Shai, 1995).

L'esdeveniment exacte que condueix a la mort del microorganisme, per acció del pèptid, està encara sota discussió; actualment existeixen diferents hipòtesis que inclouen els següents esdeveniments com a possibles causes: la despolarització irreversible de la membrana microbiana, la creació de forats físics que conduirien a la fuga del contingut cel·lular, l'activació de processos de mort cel·lular (com és ara la inducció d'hidrolases que degraden la paret cel·lular), la distribució anormal dels lípids dins la bicapa lipídica (que desembocaria a disfuncions de la membrana), o el dany de dianes intercel·lulars crítiques després de la internalització del pèptid (Zasloff, 2002).

Els pèptids que actuen segons el model SMH, presenten unes concentracions mínimes inhibidores front bacteris del rang de  $\mu\text{M}$ . La incorporació d'aquests pèptids forans a la bicapa lipídica imposa una curvatura a la membrana; quant la quantitat de pèptids acumulats supera una proporció 1:10 respecte als lípids de membrana, es sol donar una desestructuració de la membrana irreversible (Matsuzaki, 2001).



**Figura 25:** Mecanisme d'acció dels pèptids hèlix- $\alpha$  antimicrobians segons el model "porus-canal". **A**, els dímers de pèptids entren en contacte amb la membrana del microorganisme, i es situen en la capa exterior de la bicapa lipídica; **B**, la unió dels dímers a la membrana condueix a la separació d'aquests i a l'internalització dels monòmers; **C**, fase formació de porus-canal, que conduirà a l'alliberament del contingut citoplasmàtic i a la lisi cel·lular. S'indiquen les capes exterior (e) i interior (i) de la bicapa lipídica.

Cal destacar que els paràmetres que poden determinar l'activitat (o el grau d'aquesta) i la especificitat del pèptid front diferents tipus de cèl·lules (a part de les característiques de les membranes d'aquestes últimes) són l'helicoidalitat, la hidrofobicitat, el moment hidrofòbic, la

càrrega i les dimensions del domini hidrofòbic/ hidrofílic. Així, l'elevada càrrega catiònica de les cecropines fan que aquestes presentin una gran activitat contra membranes de bacteris però que no siguin actives contra les membranes neutres, per exemple la membrana dels eritròcits (Dathe & Wieprecht, 1999).

### **6.1 La cecropina A i els pèptids sintètics derivats de la mateixa**

Les cecropines són un grup de potents pèptids bàsics antimicrobians, descoberts inicialment en insectes, i que més tard han sigut aïllats en altres animals, incloent també els mamífers (Boman & Hultmark, 1987; Lehrer *et al.*, 1993).

En els insectes, les cecropines són sintetitzades com a preproteïnes, que són posteriorment processades, i que adopten l'estructura d'hèlix- $\alpha$  amfipàtica a l'interaccionar amb membranes microbianes (Sharma *et al.*, 2000). La química dels pèptids sintètics, que han permès sintetitzar cecropines i anàlegs a les cecropines, ha tingut un paper molt important per poder estudiar les seves seqüències primàries i la seva estructuració secundària, així com els diferents passos en el processament de les pre-cecropines biosintètiques (Merrifield *et al.*, 1994).

Les característiques estructurals de les cecropines inclouen un extrem N-terminal altament bàsic, una regió central flexible que conté Gly, Pro o ambdós aminoàcids, i un extrem C-terminal hidrofòbic.

És remarcable el fet que les cèl·lules vegetals i animals siguin resistents a l'acció de les cecropines (Steiner *et al.*, 1988; Jaynes *et al.*, 1989; Nordeen *et al.*, 1992; Mills & Hammerschlag, 1993); s'assenyala que aquesta diferent afinitat de les cecropines pot venir donada per diferències en la composició de la membrana. Així, s'ha descrit que els pèptids antimicrobians presenten més afinitat per lipopolisacàrids de les membranes externes dels bacteris i pels fosfolípids aniònics (com el fosfatidilglicerol o la cardiolipina) de les membranes citoplasmàtiques; i que, contràriament, presenten baixa afinitat per les capes exteriors de les membranes de les cèl·lules de mamífer, que es componen principalment de fosfolípids zwitteriònics (com la fosfatidilcolina i l'esfingomièlina) (Matsuzaki, 2001).

S'ha demostrat que, els D-enantiòmers sintètics de cecropines, presenten el mateix nivell d'activitat contra bacteris que els pèptids L naturals; així doncs, l'activitat no és dependent de les interaccions quirals entre els pèptids i les bicapes lipídiques de les membranes bacterianes (Merrifield *et al.*, 1994).

La majoria d'estudis realitzats en plantes s'han centrat en la cecropina B i pèptids sintètics derivats d'ella. Els anàlegs sintètics, que en molts casos divergeixen en la seva seqüència d'aminoàcids, presenten gran semblança estructural i s'ha demostrat que poden ser més actius contra microorganismes que la cecropina B nativa (Nordeen *et al.*, 1992;



Jaynes *et al.*, 1993; Owens & Heutte, 1997; Huang & McBeath, 1997). La cecropina B i els seus anàlegs, s'han expressat en plantes transgèniques amb resultats diversos pel que fa a la resistència a patògens (Jaynes *et al.*, 1993; Aldwinckle *et al.*, 1996; Norelli 1996; Reynoird *et al.*, 1999; Arce *et al.*, 1999). Així, plantes transgèniques de tabac que expressen el pèptid Shiva-1 (anàleg estructural de la cecropina B) mostren resistència front al bacteri *Pseudomonas solanacearum*, mentre que quan s'expressa el pèptid SB37 (un altre anàleg de la cecropina B) les plantes de tabac no són resistents (Jaynes *et al.*, 1993). Tanmateix, quan la mateixa construcció portadora del gen que codifica per l'anàleg SB37, utilitzada per a transformar tabac, s'utilitza per transformar patata, las plantes transgèniques de patata mostren resistència front bacteris patògens (Arce *et al.*, 1999).

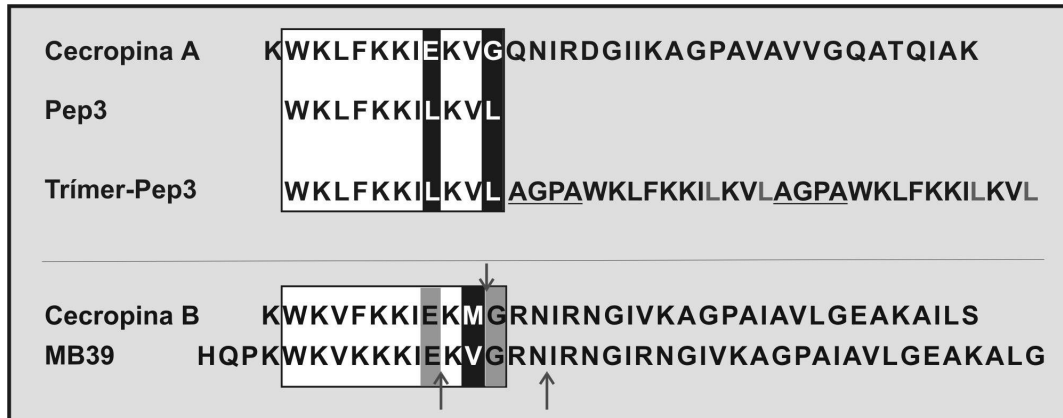
Però per altra banda, plantes de tabac que expressaven el gen de la cecropina B (dissenyat per a que la cecropina B fos secretada a l'espai extracel·lular) no han mostrat una major resistència a bacteris; aquest fet sembla degut a la degradació del pèptid per les proteases extracel·lulars de la planta hoste (Hightower *et al.*, 1994; Mills; 1994; Florack *et al.*, 1995).

Relacionat amb això, estudis de l'estabilitat de les cecropines, i dels seus anàlegs, han demostrat que proteases, presents als fluids intercel·lulars (ICF) de la planta, poden degradar aquests pèptids antimicrobians, via proteòlisi limitada i específica segons el tipus de planta del que provenguin els ICF (Florack *et al.*, 1995; Owens & Heutte, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998; Mourgues *et al.*, 1998). Així, nous anàlegs de les cecropines s'han sintetitzat per millorar-ne la seva estabilitat front la degradació per proteases, assolint-se una major resistència a la degradació amb la substitució d'un sol aminoàcid (Owens & Heutte, 1997).

En relació a la millora de la resistència de plantes, la majoria d'estudis realitzats amb les cecropines i els seus anàlegs, s'han focalitzat en la seva activitat contra bacteris patògens. El nostre interès s'ha centrat en les propietats que presenten la cecropina A, i pèptids sintètics derivats de la mateixa, com a agents antifúngics potencialment aplicables per a combatre el creixement de fongs patògens de cultius d'importància agronòmica.

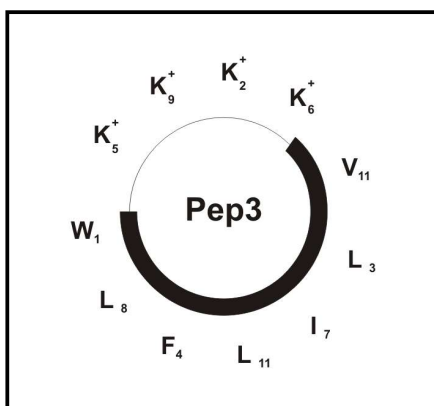
Estudis anteriors, realitzats al nostre laboratori, amb diferents pèptids sintètics derivats de la cecropina A i de la melittin varen permetre determinar l'activitat antifúngica *in vitro* d'aquests pèptids sintètics, front diferents fongs patògens de plantes (Cavallarin *et al.*, 1998). En el present estudi hem analitzat l'activitat antifúngica de la cecropina A, així com del pèptid Pep3, i del seu trímer, derivats de la regió N-terminal de la cecropina A. La *Figura 26* mostra la seqüència d'aminoàcids de la cecropina A, dels pèptids sintètics derivats Pep3 i el seu trímer, així com dels citats cecropina B i el anàleg sintètic MB39.

El pèptid Pep3 és un pèptid curt, d'11 aminoàcids, i correspon a la regió N-terminal de la cecropina A. Aquest pèptid reté la seva activitat i manté la seva tendència a formar estructures d'hèlix- $\alpha$  (Andreu *et al.*, 1992).



**Figura 26:** Seqüència d'aminoàcids de la cecropina A i dels pèptids sintètics derivats, Pep3 i el seu trímer. A la part inferior, seqüències de la cecropina B i el seu anàleg sintètic MB39; les fletxes indiquen el lloc de trencament, via proteòlisi limitada específica, dels pèptids per proteases d'ICF de patata (Owens & Heutte, 1997). Els requadres negres ressalten les substitucions introduïdes als pèptids sintètics. Subratllat, seqüència espaiadora AGPA del trímer-Pep3.

Si es representa el pèptid Pep3 seguint el model de roda de Edmunson com a una hèlix- $\alpha$  ideal, es pot apreciar el marcat caràcter amfipàtic de l'hèlix- $\alpha$  (veure el diagrama del Pep3 a la Figura 27).



**Figura 27:** Diagrama del pèptid sintètic Pep3, derivat de la cecropina A, on es mostra la distribució amfipàtica dels seus residus. La línia gruixuda correspon a les regions hidrofòbiques.

El Pep3 presenta una substitució a la posició 8, equivalent a la posició 9 de la cecropina A, d'un glutàmic (a la cecropina A) per una leucina (al Pep3). Aquesta substitució s'ha dut a terme basant-se en consideracions estructurals (Ubach, 1996). És interessant la constatació d'Owens i col·laboradors (1997), en què la degradació de l'anàleg MB39 de la cecropina B és per el trencament del pèptid en el residu Glu<sub>12</sub> (equivalent al residu substituït Leu<sub>8</sub> del

nostre pèptid), veure *Figura 26*. Així mateix, el grup d'Owens determinà que incubant la cecropina B amb ICF de patata, es produïa el trencament del pèptid en el residu Met<sub>11</sub>.

En el pèptid MB39, el citat grup realitzà una sola substitució que conferí una major resistència a la degradació per part de proteases, i fou una substitució de la metionina en la posició 11, per una valina (Owens & Heutte, 1997); cal destacar que tant la cecropina A com el pèptid Pep3, presenten una valina en aquesta posició.

En el nostre laboratori, es realitzaren assaigs preliminars d'activitat antifúngica *in vitro* del Pep3, front tres fongs fitopatògens: *Phytophthora infestans*, *Fusarium moniliforme* (actualment classificat com a *F. verticillioides* (8é Workshop Internacional sobre *Fusarium*, Anglaterra, 1998) i *F. oxysporum*, que demostraren que concentracions baixes d'aquest pèptid (2 µM per *P. infestans*, 3 µM per *F. moniliforme* i 6 µM per *F. oxysporum*) permetien el 50% d'inhibició del creixement fúngic a les 24h. En aquest mateix treball, s'assajà l'activitat antifúngica del pèptid Pep3 en presència de proteïnes totals i d'ICF de tabac i de tomàquet. Els resultats mostraren que en presència d'extractes de proteïnes de tabac, es perdia l'activitat antifúngica del Pep3, front *F. oxysporum*. Contràriament, la incubació amb extractes proteics de tomàquet, permetia mantenir un major grau d'activitat antifúngica del pèptid, al llarg del temps (Cavallarin *et al.*, 1998). Aquests resultats posaren de manifest la variació que existeix en el grau de resistència a la degradació, dels pèptids antifúngics, segons la planta d'origen dels fluids intercel·lulars.

En el present estudi es mostren els resultats de l'activitat antifúngica de la cecropina A i del Pep3 contra diferents fitopatògens, entre ells el fong *Magnaporthe grisea*, causant de la malaltia més important dels cultius d'arròs, la piriculariosi. També s'analitza l'activitat antifúngica del trímer-Pep3. Aquest trímer resulta de la unió de tres monòmers Pep3 separats per la seqüència AGPA, aquesta seqüència espaiadora s'ha escollit per que no trenca l'estructura del monòmer (veure *Figura 26*).

## **6.2 Proteïnes antifúngiques produïdes per microorganismes del sòl**

Diferents estudis s'han dirigit a determinar la capacitat de produir molècules amb activitat antimicrobiana (antifúngica o antibacteriana) per part de microorganismes del sòl. D'aquesta manera, aquests microorganismes obtenen una avantatge selectiva en el seu entorn front els seus competidors, excretant aquests compostos antifúngics o antibacterians.

Diferents molècules han estat aïllades de diferents cultius de fongs i s'han assajat *in vitro* per determinar la seva activitat antifúngica front fongs fitopatògens (Punja, 2001); en els darrers anys alguns dels gens, que codifiquen per aquests compostos d'origen fúngic, han estat introduïts en plantes per la millora la resistència a malalties fúngiques (veure *Taula 33* de l'*Apartat 8.2: Plantes resistents a fongs*).

La majoria dels gens antifúngics d'origen no vegetal utilitzats com a transgens, corresponen a glucanases o quitinases (Punja, 2001). Així, els fongs micoparàsits, com per exemple *Trichoderma spp*, i antagonistes (fongs freqüentment utilitzats en estratègies de control biològic) produeixen proteïnes antifúngiques del tipus  $\beta$ -1-3-glucanasa o quitinasa. Aquests enzims degraden els glucans i la quitina de la paret cel·lular dels fongs. Per altra banda cal destacar que els fongs presenten una turgència interior significativa, fet que comporta que una lleugera pertorbació de l'estructura de la paret cel·lular condueixi a la lisi de la cèl·lula fúngica (Selintrennikoff *et al.*, 2001).

*Trichoderma harzianum* és un fong filamentós del sòl capaç de parasitar diferents fongs patògens de plantes. El procés de micoparasitisme es basa en la secreció d'enzims lítics com són les glucanases i les quitinases; aquests enzims degradaran la paret cel·lular del fong patògenic, permetent a *Trichoderma* nodrir-se de la paret cel·lular i del contingut cel·lular (Cohen-Kupiec *et al.*, 2001). Concretament, el gen *chi42*, que codifica per una endoquitinasa secretada per *Trichoderma harzianum*, ha estat utilitzat per a la millora de la resistència de plantes a fongs patògens, mitjançant transgènia, en tabac i patata (Lorito *et al.*, 1998). Així mateix s'ha obtingut la millora de la resistència a diferents fongs fitopatògens en patata, tabac, poma, raïm i petúnia, mitjançant l'expressió de gens que codifiquen per altres quitinases de *Trichoderma* (Lorito *et al.*, 1998; Bolari *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Kikkert *et al.*, 2000).

Així mateix, el gen *chi1*, que codifica per una quitinasa de *Rhizopus oligosporus*, s'ha utilitzat per a transformar plantes de tabac; en les plantes transgèniques s'observà un augment de la resistència als patògens *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea* (Terakawa *et al.*, 1997).

Un altre gen, estudiat i utilitzat en la millora de la resistència de plantes a patògens, és el gen *chiA* que codifica per una quitinasa produïda per *Serratia marcescens*, un bacteri del sòl. El 1988, Jones i el seu grup demostraren que era factible expressió del gen *chiA* i acumulació de la quitinasa, en fulles de tabac mitjançant transgènia (Jones *et al.*, 1988). Posteriorment, altres treballs han permès demostrar que l'expressió del gen *chiA* en plantes transgèniques condueix a un augment de la resistència de la planta front fongs fitopatògens (Suslow *et al.*, 1988; Jach *et al.*, 1992; Howie *et al.*, 1994).

### **6.2.1 Proteïnes antifúngiques secretades per *Aspergillus***

El fong *Aspergillus giganteus*, aïllat del sòl a una granja a Michigan (EEUU), produeix dues proteïnes que presenten propietats antifúngiques: l' $\alpha$ -sarcina i la proteïna AFP (*Antifungal Protein*).

L' $\alpha$ -sarcina fou la primera ribotoxina que es va descobrir, durant un programa de recerca de substàncies antitumorals (Olson *et al.*, 1963). Aquesta proteïna, de 17 kDa, és una

ribonucleasa molt específica que actua trencant l'únic enllaç d'un fragment d'ARN ribosomal en una seqüència altament conservada, i així, inactivant el ribosoma (Martínez-Ruiz, 2000). Els estudis realitzats amb aquesta proteïna s'han encaminat principalment cap als possibles usos clínics.

El fong *Aspergillus giganteus* també produeix i secreta una proteïna bàsica, de baix pes molecular, que s'ha demostrat que presenta activitat antifúngica front fongs filamentosos, la proteïna AFP (*Antifungal Protein*) (Olson & Goerner, 1965; Nayaka *et al.*, 1990; Lacadena *et al.*, 1995).

La proteïna AFP es sintetitza en forma d'un precursor o preproteïna inactiva (If-AFP): pèptid senyal (aminoàcids 1 a 26) seguit d'un propèptid en la regió N terminal (de 6 aminoàcids) i dels 51 aminoàcids de l'AFP madura (forma madura, activa). La proproteïna inactiva (If-AFP) es secretada i proteases del medi (no identificades) deuen processar-la fins a la seva forma activa.

L'AFP madura de 51 aminoàcids (i una massa molecular de 5780 Da) ha estat àmpliament estudiada des del punt de vista estructural (Nayaka *et al.*, 1990; Wnendt *et al.*, 1994; Campos-Olivas *et al.*, 1995; Lacadena *et al.*, 1995). Presenta quatre ponts disulfur entre els seus 51 aminoàcids, on s'hi troben abundants tirosines i lisines (6 i 12 residus respectivament). Aquestes característiques estructurals, així com el seu caràcter antifúngic, recorden a les característiques d'altres grups de proteïnes, com són les defensines o les tionines (Bruix *et al.*, 1993; Campos-Olivas *et al.*, 1995; García-Olmedo *et al.*, 1998).

Mitjançant RMN, es determinà l'estructura tridimensional de la proteïna AFP en dissolució, que es mostra en la *Figura 28*.

La proteïna AFP s'organitza al voltant de cinc fulles  $\beta$  antiparal·leles que formen un petit barril  $\beta$  compacte, amb els quatre ponts de disulfur interns (Campos-Olivas *et al.*, 1995; Martínez-Ruiz, 2000). Així mateix, s'ha demostrat que l'AFP presenta una remarcable resistència a la proteòlisi i una elevada estabilitat tèrmica (Lacadena *et al.*, 1995).



**Figura 28:** Estructura de la proteïna AFP. Model de cinta d'una conformació de l'estructura tridimensional en dissolució, determinada per RMN. En vermell, 5 fulles  $\beta$  antiparal·leles. (Imatges cedides pel Dr. A. Martínez del Pozo).

S'ha descrit altres proteïnes amb una elevada homologia de seqüència amb l'AFP i que presenten activitat antifúngica, i que també són produïdes per fongs: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. nalgiovense*, *Trichoderma viride* (Lee *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 1995; Geisen, 2000; Hao *et al.*, 2000); l'excreció de proteïnes antifúngiques al medi per part d'aquests fongs determinaria una avantatge competitiva front altres fongs de l'entorn.

La proteïna AFP presenta activitat antifúngica contra diferents fongs filamentosos, però no contra *Aspergillus giganteus*, *A. niger* o *Penicillium chrysogenum*, el que indica que els fongs productors estan protegits davant l'acció d'aquestes toxines (Martínez-Ruiz, 2000). Així mateix, aquesta proteïna no presenta toxicitat front llevats o bacteris. Cal destacar que la proteïna AFP tampoc presenta activitat contra cèl·lules de mamífers (Nayaka *et al.*, 1990).

Estudis del grup del Dr. Martínez del Pozo, han permès determinar que la proteïna AFP interacciona fortament amb vesícules de fosfolípids àcids. Per altra banda, basant-se en les similituds a nivell de l'estructura tridimensional, la proteïna AFP pot considerar-se del tipus de proteïnes que contenen un motiu estructural d'unió a oligonucleòtids/oligosacàrids (*OB-fold containing protein*). Així mateix, l'AFP presenta la propietat d'unió a àcids nuclèics, fet que caracteritza aquest grup de proteïnes, i s'ha demostrat que promou la neutralització de la càrrega i condensació de l'ADN (Martínez del Pozo *et al.*, 2002).

Totes aquestes característiques, fan de la proteïna AFP, una bona candidata per a la millora de la resistència de plantes a fongs fitopatògens, mitjançant transgènia. Tanmateix, es feien necessaris estudis sobre la seva activitat antifúngica contra fongs fitopatògens, particularment contra *Magnaporthe grisea*, així com diferents assaigs per determinar la seva estabilitat i no toxicitat en cèl·lules vegetals; els resultats d'aquests estudis s'exposen en aquest treball de recerca.

## **7. Les tècniques de transformació de plantes**

---

A la dècada dels 80, el grup de J. Schell i de M. Van Montagu varen descriure la tècnica de transformació de cèl·lules vegetals mitjançant *Agrobacterium* (Shaw *et al.*, 1983).

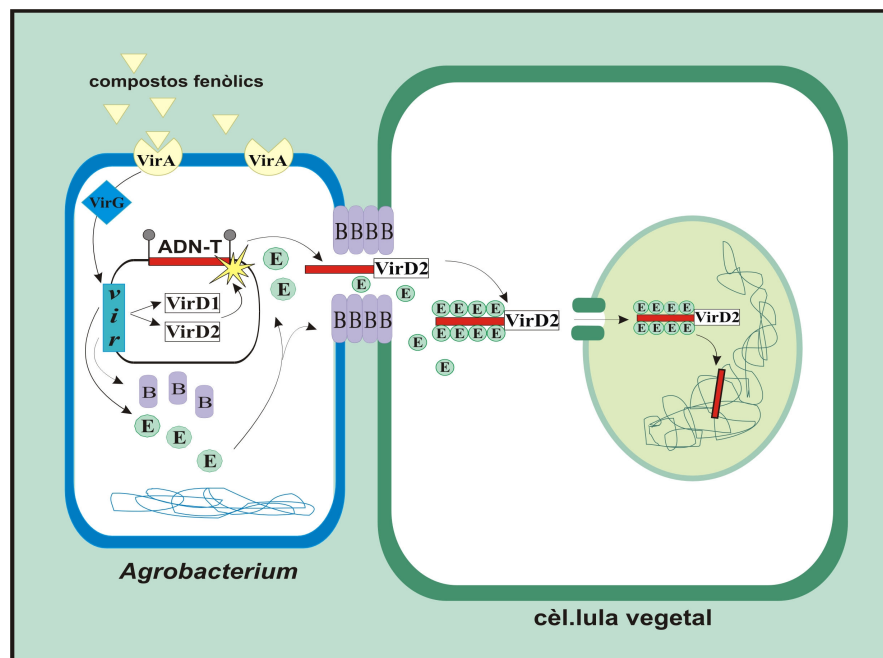
*Agrobacterium* (tant *A. tumefaciens* com *A. rhizogenes*) és un bacteri del sòl que ha desenvolupat una sofisticada forma de parasitisme mitjançant la penetració, per ferides de la planta, i la integració de part de la seva informació genètica en la cèl·lula vegetal. L'ADN que transfereix conté gens que codifiquen per a proteïnes involucrades tant en la biosíntesi de factors de creixement de la planta (oncogens, gens que codifiquen per enzims implicats en la biosíntesi d'auxines i citoquinines), com de nutrients bacterians (gens de la síntesi d'opines, com la octopina i la nopalina). Així, *Agrobacterium* indueix el desenvolupament de

tumors a les arrels de la planta, creant-se d'aquesta manera un nínxol ecològic per a la seva subsistència com a paràsit (Tinland, 1996).

Durant molts anys es va creure que l'ús de la tècnica d'*Agrobacterium* no era adequat per plantes monocotiledònies (com per exemple l'arròs), degut al fet que *Agrobacterium* és incapaç d'induir la proliferació de tumors en les arrels d'aquestes. Estudis posteriors han pogut confirmar que la incapacitat d'induir tumors no exclou la possibilitat de transferir l'ADN (White, 1993).

L'ADN que el bacteri transfereix (ADN-T) està localitzat en un plàsmid anomenat pTi (Tumor inducing plasmid) i no codifica per cap gen, que actuï en *cis*, important per al procés de transferència. Els únics elements necessaris en el pas de transferència són 2 seqüències repetides directes (imperfectes) de 25bp, que s'anomenen *L-border* (extrem esquerre) i *R-border* (extrem dret), que delimiten el fragment d'ADN que serà escindit del pTi, i després introduït a la cèl·lula vegetal.

La transformació mitjançant *Agrobacterium* es basa doncs en la possibilitat d'incloure l'ADN d'interès dins d'aquest ADN-T sense que es vegi afectada la capacitat de transferència. El procés mitjançant el qual *Agrobacterium* transfereix l'ADN-T a les cèl·lules vegetals és descrit a la *Figura 29*.



**Figura 29:** Transferència de l'ADN-T d'*Agrobacterium* al genoma vegetal. *E*, proteïna VirE2; *B*, Proteïna VirB. (adaptat de Tinland, 1996).

Quant es produeix una ferida, els teixits de la planta alliberen compostos fenòlics de baix pes molecular (que són alliberats per teixits de la planta després de ferida), que induiran la

proteïna VirA, activant seguidament la proteïna VirG. Aquesta proteïna VirG activada estimularà l'expressió de la regió de virulència (*vir*) que codifica per diferents proteïnes Vir involucrades en el procés de transferència. Les proteïnes VirD2 i VirD1 escindeixen l'ADN-T del pTi, quedant la proteïna VirD2 lligada covalentment a l'extrem 5' de l'ADN-T escindit. Aquesta molècula (ADN-T+VirD2) és exportada a la cèl·lula vegetal a través d'un canal format per proteïnes VirB. Per aquest canal passaran també les proteïnes VirE2 que, un cop dins la cèl·lula vegetal, s'uniran a l'ADN-T (Binns *et al.*, 1995). Aquest nou complex VirE2+T-DNA+VirD2, anomenat complex-T, entra dins el nucli de la cèl·lula vegetal pels porus nuclears i, un cop dins el nucli, l'ADN-T serà integrat al genoma de la cèl·lula vegetal.

Així, si el gen d'interès és introduït entre els extrems L i R de l'ADN-T, aquest serà introduït dins la cèl·lula vegetal i integrat en el genoma de la planta. El gen de selecció pot ser introduït en el mateix ADN-T que el gen d'interès o en un ADN-T diferent (en ambdós casos en el mateix plasmidi) o bé, en un plasmidi diferent del portador del gen d'interès. Els dos inconvenients que presenta aquesta tècnica de transformació són l'eliminació de les agrobactèries després de la cocultivació amb el teixit vegetal, i per l'altra, la transferència de l'ADN plasmídic més enllà de l'extrem L de l'ADN-T.

Per altra banda, l'any 1987, T.M. Klein i els seus col·laboradors varen descriure un nou mètode que permetia introduir ADN de forma directa dins de qualsevol cèl·lula: el bombardeig de microprojectils o biolística. Aquesta tècnica es basa en l'acceleració, mitjançant propulsió per pólvora, per descàrrega elèctrica o per heli a pressió, de partícules microscòpiques d'or o tungstè, prèviament revestides amb l'ADN que es vol introduir a la cèl·lula. Sota condicions de pressió negativa, aquestes micropartícules són projectades de manera controlada i es fan impactar en el teixit vegetal que es vol transformar, penetrant en les cèl·lules sense afectar la seva viabilitat. Aquesta tècnica permet transferir directament tant el gen d'interès com un gen de selecció per a la posterior selecció de les plantes transformades. Majoritàriament, aquest gen de selecció s'inclou en un altre plàsmid diferent del plàsmid portador del gen d'interès. La cointegració dels dos gens en la cèl·lula vegetal es dona en un 80% dels casos, i la seva expressió és similar per ambdós gens. En la transformació per biolística solen integrar múltiples còpies a l'ADN vegetal, en un o varis punts d'inserció, i cosegregar com a un locus simple en la descendència.

Ambdós mètodes de transformació, selecció i regeneració d'arròs transformat, s'esquematitzen en la *Figura 30*.

Ambdues tècniques de transformació (transformació mitjançant *Agrobacterium* o per biolística) han estat àmpliament utilitzades en la transformació de plantes, i malgrat que

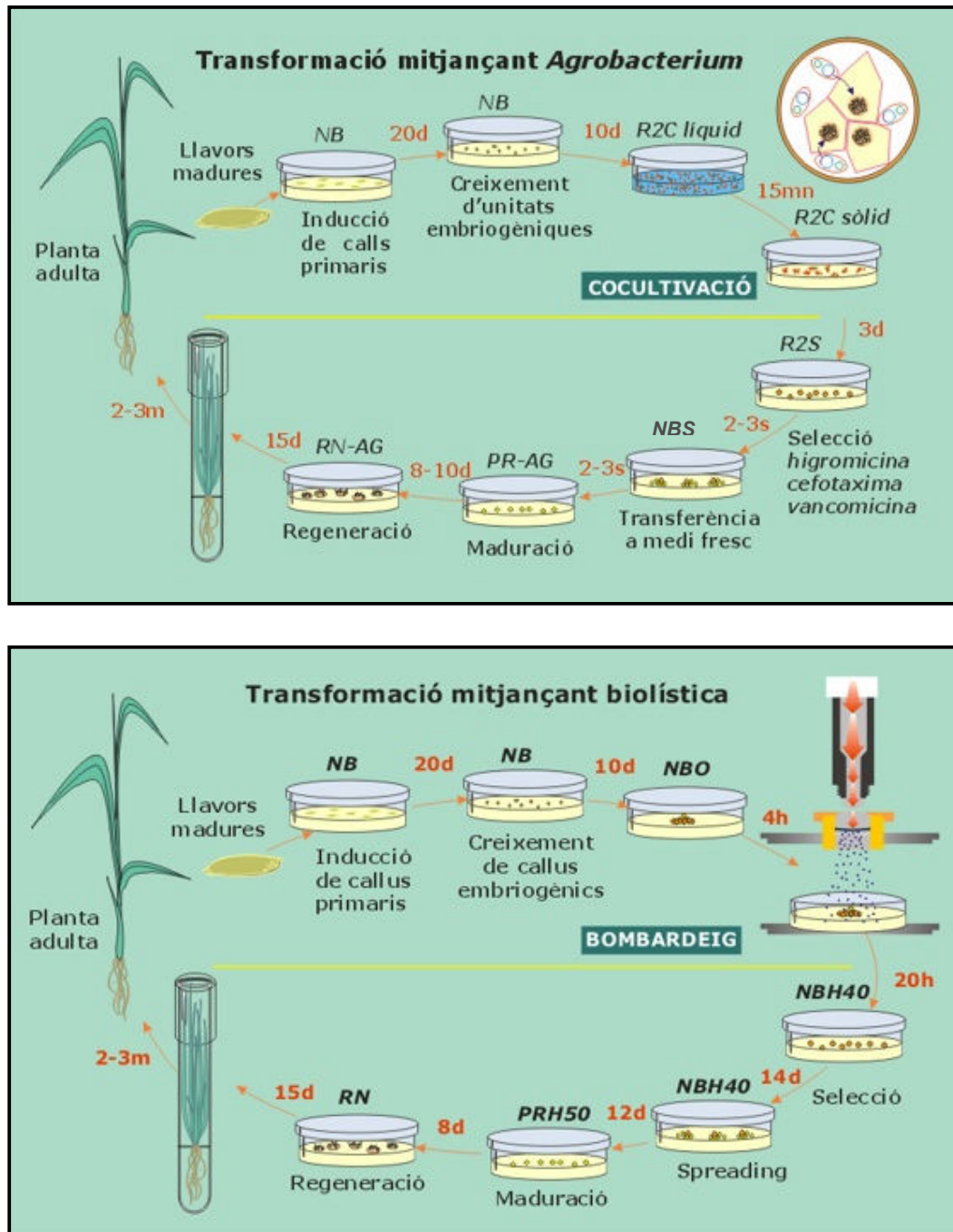


ambdues donen resultats satisfactoris a nivell d'obtenció de plantes transgèniques adultes, actualment la tècnica de transformació per *Agrobacterium* és la més utilitzada. Això és degut al fet que, el mètode de bombardeig de microprojectils, comporta la integració de múltiples còpies del transgen, i per tant de perfils d'integració complexes, afavorint així fenòmens de *gene silencing* (extinció de l'expressió del transgen) (Baulcombe *et al.*, 1996; Stam *et al.*, 1997). Així mateix, la cointegració i cosegregació del gen d'interès amb el gen de selecció (habitualment gens de resistència a antibiòtics) no és desitjable en plantes transgèniques d'espècies habitualment destinades al consum en ramaderia o consum humà.

A partir de la seva publicació, ambdues tècniques de transformació foren ràpidament incorporades en la millora genètica de plantes. Fins a l'actualitat, infinitat de gens han estat aïllats de gran diversitat d'organismes diferents, i s'han introduït en la majoria de plantes de les espècies cultivades. L'aplicació d'aquestes tècniques ha permès la modificació de característiques fisiològiques, nutricionals, ornamentals, de resistència a plagues o a patògens, de productivitat...

En el present treball, s'han utilitzat les dues tècniques, biolística i transformació mitjançant *Agrobacterium*, per a la transformació d'arròs. En ambdós casos el material vegetal emprat han estat calls embriogènics produïts mitjançant la inducció de llavors d'arròs.

Així doncs, a partir de calls embriogènics d'arròs es comencen ambdós mètodes de transformació. En el cas de la biolística, els calls seleccionats han de mesurar 0,8-1,6 mm per a ser viables per al bombardeig; aquests calls es col·locaran al centre d'una placa de Petri formant un cercle d'aproximadament 3 cm de diàmetre, que serà l'àrea que abastaran els projectils en impactar la placa. Després del bombardeig, els callus es mantenen 16-20h a la foscor. Seguidament es passarà a la selecció dels callus transformats en medi NBH40 que conté l'agent de selecció higromicina. Després de 26 dies a la foscor i 28°C (amb renovació del medi i extensió dels calls per la placa, per al seu correcte desenvolupament), els callus transformats resistents es transferiran a medis de regeneració successius (PRH50 i RN). Al passar els calls a la llum, aquests esdevindran verdosos i desenvoluparan les primeres tiges. Aquests callus regenerats seran transferits a tubs *Magenta* on es desenvoluparan fins a plantes joves. Aquestes seran finalment transferides a l'hivernacle per a la seva regeneració fins a planta adulta.



**Figura 30:** Transformació de l'arròs mitjançant transformació per *Agrobacterium* i mitjançant biolística. En negreta s'indiquen els medis utilitzats; mn minuts; h hores; d dies; s setmanes i m mesos. (Chen *et al.*, 1998; Barakat, 2000)

En el cas del mètode de transformació per *Agrobacterium*, els callus embriogènics són incubats en cultiu líquid d'*Agrobacterium* (a una densitat de  $3-5 \times 10^9$  cèl·lules/ml) durant 10-15min. Seguidament, els callus s'assecaran amb molta cura sobre un paper de filtre esterilitzat, i seran disposats en una placa amb medi sòlid de cocultiu 3 dies a la foscor, a

25°C per evitar el creixement d'*Agrobacterium*. La selecció dels callus transformats es realitzà també mitjançant l'higromicina. A partir d'aquest pas, les incubacions es fan a 28°C, i s'ha de controlar freqüentment la proliferació d'*Agrobacterium*: els calls que semblin contaminats es llençaran. Els calls seleccionats es transferiran successives vegades en medis de regeneració i finalment en tubs *Magenta*, tal i com s'ha descrit per al mètode de bombardeig, fins a transferir-los a l'hivernacle.

## **8. Cultius transgènics: del laboratori al camp de conreu**

En pocs anys, els cultius transgènics han passat del laboratori a créixer en milions d'hectàrees de conreus. La primera planta transgènica comercialitzada fou el tomàquet *Flavr Savr*, que havia sigut modificat per a reduir els nivells de l'enzim poligalacturonidasa, enzim que fa menys rígida la paret cel·lular, i que al Regne Unit, a l'any 1996, ja se'n comercialitzava un puré per al consum humà. A la Comunitat Europea, l'han seguit el tabac, la colza, la soja, la xicoira i el blat de moro, tots ells per al consum humà o en ramaderia, i els clavells en ornamentals. En la *Taula 31* es detallen les característiques dels cultius transgènics autoritzats a Europa fins a l'any 1998. La majoria de cultius transgènics autoritzats a la Unió Europea, han estat modificats per augmentar la seva tolerància o obtenir resistència a herbicides comercials.

Així mateix, la millora genètica de la resistència a plagues i patògens de diferents espècies vegetals, ha estat descrita des de l'any 1987, moment en què es varen aconseguir les primeres plantes transgèniques de tabac i de tomàquet, transgèniques per la biotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Adang *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987; Fischhoff, 1987; Vaeck *et al.*, 1987) i plantes de tabac, transgèniques per a un inhibidor de proteases (Hilder *et al.*, 1987). Per altra banda, a la dècada dels 90, s'aconseguien les primeres plantes transgèniques amb millors propietats de resistència a fongs fitopatògens, que expressaven gens de glucanases i quitinases, (Zhu *et al.*, 1994 i Jach *et al.*, 1995 (tabac); Lin *et al.*, 1995 (arròs)). Aquestes estratègies ofereixen clares avantatges front els pesticides químics convencionals: major especificitat contra l'insecte problema, menor dependència de les condicions ambientals, reducció de l'exposició de l'agricultor a productes tòxics, així com la reducció dels residus químics alliberats al medi ambient.

Des de 1997, amb l'autorització del cultiu del blat de moro *Bt*, s'ha consolidat l'estratègia, de la millora de la resistència a insectes, mitjançant l'expressió en plantes de molècules insecticides. Aquest blat de moro *Bt* ha estat modificat per a l'expressió del gen *cryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis*, que codifica per la biotoxina *Bt*. La toxina *Bt* s'activa, al ser ingerida per l'insecte, per l'acció de les proteases digestives de l'intestí mitjà de l'insecte. Un cop activada, s'uneix a receptors de l'epiteli i de la membrana de les cèl·lules de l'intestí. La

formació de porus condueix a la disfunció dels gradients elèctrics, de pH i de K<sup>+</sup>, produint així un dany irreversible a la paret intestinal de l'insecte (Gill *et al.*, 1992). L'expressió dels gens que codifiquen per diferents variants de la toxina *Bt*, s'ha estudiat en gran diversitat d'espècies vegetals; actualment es cultiven, a nivell mundial, cultius transgènics *Bt* de blat de moro, de cotó, de patata i de soja.

<b>Cultiu transgènic</b>	<b>Característiques</b>	<b>Any d'autorització</b>
<b>Tabac</b> ( <i>Seita</i> )	· Tolerant al bromoxynil <sup>(2)</sup>	Abril de 1994
<b>Colza</b> ( <i>Plant Genetic Systems</i> ) <sup>(1)</sup>	· Mascle estèril · Resistent al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Febrer de 1996
<b>Soja</b> ( <i>Monsanto</i> )	· Resistent al glifosat <sup>(3)</sup>	Abril de 1996
<b>Xicoira</b> ( <i>Bejo-Zaden BV</i> ) <sup>(1)</sup>	· Mascle estèril · Resistent al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Maig de 1996
<b>Blat de moro</b> ( <i>Ciba-Geigy</i> )	· Toxina <i>Bt</i> (gen <i>cryIA(b)</i> ) <sup>(4)</sup> · Tolerant al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Gener de 1997
<b>Colza</b> ( <i>Plant Genetic Systems</i> )	· Mascle estèril · Tolerant al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Juny de 1997
<b>Clavell</b> ( <i>Florigene</i> )	· Modificació del color	Desembre de 1997
<b>Colza</b> ( <i>AgrEvo</i> )	· Resistent al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Abril de 1998
<b>Blat de moro</b> ( <i>AgrEvo</i> )	· Tolerant al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Abril de 1998
<b>Blat de moro</b> ( <i>Monsanto</i> )	· Toxina <i>Bt</i> (gen <i>cryIA(b)</i> ) <sup>(4)</sup>	Abril de 1998
<b>Blat de moro</b> ( <i>Novartis</i> )	· Toxina <i>Bt</i> (gen <i>cryIA(b)</i> ) <sup>(4)</sup> · Tolerant al glufosinat d'amoni <sup>(3)</sup>	Abril de 1998
<b>Clavell</b> ( <i>Florigene</i> )	· Increment de la durada després de tallada	Octubre de 1998
<b>Clavell</b> ( <i>Florigene</i> )	· Modificació del color	Octubre de 1998

**Taula 31: Cultius genèticament modificats autoritzats per la Unió Europea fins a la moratòria de 1998. Entre parèntesi s'indica l'empresa que els comercialitza. <sup>(1)</sup> Indica els cultius destinats a l'alimentació de ramaderia; <sup>(2)</sup> pesticida; <sup>(3)</sup> herbicida; <sup>(4)</sup> toxina insecticida. (Unió Europea, directiva 90/330/EEC, març 2001).**

Però l'eufòria inicial de les empreses i agricultors a deixat pas al debat sobre aquesta nova tecnologia, on els principals temes de controvèrsia són la prematura incorporació al camp dels primers cultius transgènics aconseguits al laboratori, i la possible adquisició de resistència per part dels insectes degut a l'elevada i constant expressió del transgen... Així mateix es qüestiona si són suficientment exhaustius els tests de toxicitat dels productes

derivats de plantes transgèniques, tant a nivell de salut humana (sobretot a nivell d'efectes al·lèrgics) com per a la ramaderia. Un altre focus important de debat és l'impacte a nivell ecològic que poden tenir, a curt i llarg termini, el cultiu de transgènics, sobretot pel que fa a la possible transferència gènica, a través del pol·len, a espècies salvatges relacionades. Així, aquest debat, que evidentment engloba també altres debats de tipus polític i social, ha conduït a la Unió Europea a decretar una moratòria, des de l'any 1998, que frena l'autorització de nous cultius transgènics.

Així doncs, es fan indispensables estudis sobre plantes transgèniques que aprofundeixin en temes que, en els anomenats cultius transgènics de primera generació, no foren prioritaris. Un tema interessant és la identificació de nous promotors que permetin una expressió induïble per ferida, o per infecció fúngica, del transgen; per altra banda, també és de gran d'interès l'estudi de nous promotors que dirigeixin l'expressió del gen a teixits específics (per exemple els teixits dels que s'alimenti un determinat insecte) però no als òrgans destinats al consum humà, així com promotors que no dirigeixin l'expressió del transgen al pol·len o les llavors. Amb la utilització de promotors induïbles s'evitaria, per una banda la innecessària despesa d'energia que suposa per la planta l'expressió constitutiva del transgen, i per altra banda, s'evitaria que, elevats nivells de les molècules insecticides, poguessin conduir al desenvolupament de resistència en els insectes problema. Dosis molt elevades d'una toxina insecticida poden eliminar tant els individus homozigots sensibles (SS), com els heterozigots (SR), quedant únicament els individus homozigots resistents (RR), que esdevindrien predominants.

Així mateix, emprant promotors que dirigissin l'expressió del transgen a teixits o òrgans específics es podria aconseguir una major eficàcia i a la vegada una major especificitat contra l'insecte/patogen problema, evitant també la ingesta de la toxina per part d'altres insectes o animals (com per exemple ocells). L'expressió dels gens en les plantes permetria a més a més, produir les molècules d'efecte insecticida a zones on l'aplicació exògena de pesticides no hi podia arribar (p.ex. interior de les tiges).

Evitar la transferència del transgen en el pol·len és de gran interès ja que, un dels principals inconvenients dels cultius transgènics és que existeix la possibilitat de transmetre, mitjançant el pol·len, el transgen als camps de cultius no transgènics limítrofs o varietats salvatges (sempre que siguin d'espècies relacionades amb la possibilitat de d'entrecruament sexual i que estiguin en la mateixa fase de desenvolupament) (Hails *et al.*, 2000; Wilkison *et al.*, 2000; *projecte ERRI*, 2001; Messeguer *et al.*, 2001). Per evitar aquesta transferència gènica s'estan desenvolupant nous mètodes de transformació, com per exemple la transformació cloroplàstica. Aquest mètode permet que el transgen no es pugui transmetre a través del pol·len ja que l'herència del cloroplast és materna (Bock, 2001). Així mateix, l'expressió del transgen en el pol·len també és un factor a evitar, ja que podria

afectar a poblacions d'insectes indiscriminadament, com per exemple els insectes que s'alimenten del pol·len.

Per altra banda, en el cas de cereals, i principalment per una millor acceptació per part dels consumidors, interessen promotors que no dirigeixin l'expressió del transgen a la llavor, malgrat que la cocció (per la que passaran les llavors abans de ser consumides) inactiva i degrada la majoria de les proteïnes que es troben al gra.

Malgrat que la majoria de cultius transgènics resistents a insectes autoritzats han estat transformats per a l'expressió de la biotoxina *Bt*, que permet obtenir elevats índexs de mortalitat de l'insecte problema, molècules d'altre índole i origen s'estan estudiant amb resultats molt encoratjadors. En el cas de la resistència a insectes, l'expressió d'inhibidors de proteases es presenta com una alternativa interessant a afegir a les estratègies de producció de transgènics *Bt*.

### **8.1 Plantes resistents a plagues: gens codificants per inhibidors de proteases**

L'obtenció de plantes transgèniques per inhibidors de proteases és de gran interès per que aquests formen part del sistema natural de defensa de la planta front insectes, i són fruit de la coevolució de les interaccions planta-insecte. En realitat s'estaria reintroduint, en molts casos, funcions que les varietats cultivades han perdut durant el seu procés de selecció des de les varietats salvatges. El fet d'introduir gens d'origen vegetal i no gens aliens d'origen bacterià, s'acosta més a les demandes dels consumidors; així mateix, els inhibidors de proteases formen part del menjar d'origen vegetal habitualment consumit tant per animals com per humans (s'acumulen gran quantitat d'inhibidors de proteases en tubercles, llavors i altres teixits de reserva de les plantes).

Els inhibidors de proteases de plantes actuen reduint l'efectivitat de les proteases digestives de l'intestí de l'insecte. La presència continuada d'alts nivells d'inhibidors en la dieta alimentària de l'insecte provoca una hipersecreció crònica del pàncreas, en resposta a la pèrdua d'activitat proteolítica de l'aparell digestiu, i l'esgotament dels aminoàcids essencials. En conseqüència, hi haurà una alteració del creixement i desenvolupament de l'insecte, que pot traduir-se en una reducció de la taxa de creixement, una disminució del pes, reducció de la fertilitat o, fins i tot, arribar a desembocar en la mort de l'insecte (Ryan, 1989; Wolfson & Murdock, 1990).

Des de 1987 fins a l'actualitat, s'han transformat més de 18 espècies de plantes amb més de 14 gens codificants per diferents inhibidors de proteases d'origen vegetal (Schuler *et al.*, 1998; Jouanin *et al.*, 1998; Hilder & Boulter, 1999). La *Taula 32* resumeix els principals estudis realitzats transformant plantes amb gens codificants per inhibidors de proteases, en els que s'han realitzat bioassaigs front insectes que representen plagues per a cultius. En aquests estudis s'han descrit diferents graus d'eficàcia dels inhibidors de proteases front

diferents insectes: des d'inhibidors amb els que s'obtenien elevades taxes de mortalitat de l'insecte (Hilder *et al.*, 1987; Hoffmann *et al.*, 1992; Altpeter *et al.*, 1999; Lee, 1999); passant per diferents graus de reducció de pes, fertilitat o desenvolupament (Girard *et al.*, 1998b); fins a l'efecte contrari a l'esperat, que s'ha observat en determinats casos, on el pes larvari arribava a augmentar respecte el pes de les larves control (Girard *et al.*, 1998a; De Leo *et al.*, 1998).

Les diferències observades en l'eficàcia dels diferents inhibidors de proteases, responen a diversos factors que s'han anat dilucidant amb diferents estudis, tant estudis amb dietes artificials suplementades amb inhibidors i estudis d'inhibició *in vitro*, com amb bioassaigs en plantes transgèniques per un inhibidor. Tal i com s'ha comentat en l'apartat 5.3, s'ha descrit que tipus concrets de proteases predominen en cada ordre d'insectes. Per exemple els lepidòpters (com ara *Chilo suppressalis* o *Cacyreus marshalli*) presenten majoritàriament serinaproteases al seu sistema digestiu, mentre que en els coleòpters predominen les cisteïnoproteases (Wolfson & Murdock, 1990; Christeller *et al.*, 1992). Tot i això, en un insecte sempre hi coexisteixen proteases de diferents tipus que intervenen, en major o menor grau, en el sistema digestiu de l'insecte. Tanmateix, diferents estudis evidencien que els insectes poden adaptar-se a la ingestió d'inhibidors de proteases (Jongsma *et al.*, 1997). Sobretot el Lepidòpters i Coleòpters poden sobreexpressar proteases existents o bé induir la producció de noves proteases que siguin insensibles a l'inhibidor, superant així l'efecte deleteri de la ingesta de l'inhibidor de proteases. Així, els insectes polífags són capaços de adaptar-se més ràpidament que no pas els insectes oligofags, és a dir, especialistes que s'alimenten d'una o poques espècies vegetals diferents.

És doncs de gran importància l'estudi acurat de l'insecte problema i el seu sistema digestiu, així com de l'especificitat de l'inhibidor de proteases el gen del qual es vol utilitzar com a transgen front les proteases del sistema digestiu de l'insecte-plaga que es vol combatre. Aquests estudis previs permetrien elegir els inhibidors més eficients per combatre l'insecte problema per, seguidament, passar a realitzar assaigs sobre plantes transgèniques (bioassaigs) que permetessin estudiar les interaccions i l'efecte de l'inhibidor de proteases *in vivo*.

Finalment, cal destacar l'interès de l'estratègia de la coexpressió d'inhibidors de proteases, amb especificitat per diferents tipus de proteases (Michaud, 1997). Aquesta estratègia permetria defugir l'adaptació de l'insecte a un tipus d'inhibidor, fent així més difícil l'aparició de resistències en els insectes. També hi ha estudis que proposen la utilització d'estratègies combinades, com per exemple l'expressió de la toxina *Bt* juntament amb un inhibidor de proteases (Fan *et al.*, 1999).

Finalment, l'estratègia amb transgèniques per inhibidors de proteases també s'ha mostrat eficaç per la lluita contra plagues de nemàtodes (especialment important en l'agricultura de

països tropicals) (Urwin *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2001) i malalties produïdes per virus vegetals (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999).

Millora de la resistència de plantes front plagues mitjançant transgènia			
Inhibidor de proteases	Plantes transformades	Insecte	Referències
CpTI (T)	Tabac	<i>Heliothis virescens</i> (Lep)	Hilder (1987)
		<i>H. zea</i> (Lep)	Hoffmann (1992)
		<i>Spodoptera litura</i> (Lep)	Sane (1997)
	Patata	<i>Lacanobia oleraceae</i> (Lep)	Gatehouse (1996)
		<i>Otiorynchus sulcatus</i> (Col)	Graham (1996)
	Maduixa	<i>Pieris rapae</i> (Lep)	Hao (1997)
		<i>H. armigera</i> (Lep)	Hao (1997)
	Moniato	<i>E. postfaciatus</i> (Col)	Golmirizae (1997)
		Arròs	<i>Chilo suppressalis</i> (Lep)
	<i>S. infestans</i> (Lep)		Xu (1996)
	<i>Sesamia inferens</i> (Lep)		Gatehouse (1996)
	Cotò	<i>H. armigera</i> (Lep)	Li (1998)
Blat		<i>Sitotroga cerealla</i> (Lep)	Alpteter (1999)
CpTI + Snowdrop lectin	Moniato	<i>Cyclas formicarius</i> (Col)	Newell (1995)
SPI (T)	Tabac	<i>S. litura</i> (Lep)	Yeh (1997)
Patata I (Q)	Tabac	<i>S. litura</i> (Lep)	McManus (1994)
		<i>T. orichlea</i> (Lep)	McManus (1994)
		<i>C. eriosoma</i> (Lep)	McManus (1994)
Patata II (T/Q)	Tabac	<i>M. sexta</i> (Lep)	Johnson (1989)
		<i>S. exigua</i> (Lep)	Jongsma (1995)
	Arròs	<i>S. inferens</i> (Lep)	Duan (1996)
		Àlber	<i>P. versicolor</i> (Col)
Tomàquet I (Q)	Tabac	<i>M. sexta</i> (Lep)	Johnson (1989)
Tomàquet II (T/Q)	Tabac	<i>M. sexta</i> (Lep)	Johnson (1989)
SBKTI (T)	Tabac	<i>H. virescens</i> (Lep)	Gatehouse (1993)
	Arròs	<i>Nilaparvata lugens</i> (Hom)	Lee (1999)
Ordi BTI (T)	Tabac	<i>Agrotis ipsilon</i> (Lep)	Carbonero (1993)
		<i>S. littoralis</i> (Lep)	
<i>Nicotiana glauca</i> PIs (T/Q)	Tabac	<i>H. punctigera</i> (Lep)	Heath (1997)
	Pèsol	<i>Plutella xylostella</i> (Lep)	Charity (1999)
Arròs OC-I i OC-II (C)	Àlber	<i>C. tremulae</i> (Col)	Leple (1995)
	Colza	<i>C. assimilis</i> (Col)	Girard (1998)
		<i>Anthonomus grandis</i> (Col)	Pannetier (1997)
	Patata	<i>Diabrotica</i> (Col)	Orr (1994)

**Taula 32:** Plantes modificades genèticament per a la millora de la resistència contra insectes. CpTI, Cowpea trypsin inhibitor; SPI, Sweetpotato inhibitor; SBKTI, Soybean Kunitz trypsin inhibitor; OC-I i OC-II, oryzacystatins I i II; (T) inhibidor de tripsines; (Q) inhibidor de quimotripsines; (C) inhibidor de cisteïnproteases; (Lep) lepidòpter; (Col) coleòpter; (Hom) homòpter; (Hilder & Boulter, 1999; Lawrence, 2002).



## **8.2 Plantes resistents a fongs**

---

Fins a l'actualitat, la protecció dels cultius contra patògens s'ha basat principalment en el creuament de varietats resistents, en l'aplicació de fungicides i en la rotació de cultius. Malgrat que les tècniques convencionals de creuament de varietats han permès la millora de la resistència a malalties de molts cultius importants, els llargs períodes de temps que impliquen els processos de creuaments i retrocreuaments, i la posterior selecció dels individus interessants en la descendència, fa difícil una reacció ràpida i adequada a l'evolució i aparició de noves races de patògens resistents (Colon, 1999). Moltes vegades, els gens interessants no perduren en els successius creuaments i generacions, fent que es perdi la resistència que s'havia aconseguit. Per altra banda, les pràctiques utilitzades fins ara per augmentar la producció de varietats comercials (entrecreuament de varietats) han conduït en molts casos a la pèrdua de característiques de resistència a malalties, presentant, les varietats híbrides, una major susceptibilitat als patògens. Així mateix, les tècniques de creuament de plantes no poden proporcionar la solució a moltes de les malalties fúngiques actuals per que, o simplement no hi ha varietats resistents disponibles per al creuament, o bé per que, en molts dels casos, la resistència natural que presenten certes varietats és poligènica, amb la dificultat i tardança que això comporta degut als creuaments (Meinke & Tanksley, 2000).

Per altra banda, la utilització de fungicides, per a la protecció dels cultius, sol comportar alts costos per a l'agricultor i suposa un impacte negatiu per al medi ambient. A més a més, l'aplicació prolongada pot fer disminuir l'eficiència del fungicida degut a l'evolució de patògens tolerants o resistents.

Els recents avanços en el coneixement de les bases moleculars de la resistència de les plantes i de les interaccions planta-patogen, han establert noves bases per a la lluita contra els patògens (Jackson & Taylor, 1996). L'aïllament i estudi de proteïnes o pèptids amb propietats antimicrobianes (de procedència molt diversa) a desembocat en la transformació de plantes amb els gens que codifiquen per aquestes. A partir de la dècada dels 90, gran nombre de plantes han sigut transformades amb gens de diferent origen, aconseguint la millora de la resistència a fitopatògens (sobretot fongs i bacteris) de moltes espècies vegetals.

La *Taula 33* resumeix els estudis realitzats, des de 1991 a 2001, i els gens utilitzats per a la millora de la resistència contra patògens.

Millora de la resistència de plantes contra patògens mitjançant transgènia (1991-2001)				
Estratègia utilitzada	Exemples de molècules antifúngiques	Origen del gen	Espècies vegetals transformades	Algunes referències
a) <b>Proteïnes PR (pathogenesis-related).</b>  <b>Enzims hidrolítics.</b>  <b>Pèptids antifúngics.</b>	glucanasa = PR quitinasa = PR endoglucanasa endoquitinasa...	civada, arròs, tabac, tomàquet, mongeta, ordi... <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> ...	civada, poma, ordi, tomàquet, pastanaga, cacauet, blat, raïm, patata, arròs, tabac...	Brogliè (1991) Yoshikawa (1993) Howie (1994) Terakawa (1997) Nishizawa (1999) Kikkert (2000) Datta (2001)
	quitinasa defensina osmotina <i>PR-1</i> <i>PR-10</i> <i>STH-2</i> <i>TLP</i> ...	tabac, pèsol, arròs, patata... <i>Aspergillus giganteus</i>	patata, pastanaga, arròs, tabac, blat...	Alexander (1993) Liu (1994) Zhu (1996) Wang (1999) Chen (1999) Schaffrath (2000) Oldach (2001)
	tionina = PR lisozim defensina = PR <i>RIP</i> peptids sintètics magainina sintètica ...	<i>Arabidopsis</i> , blat de moro, civada, ordi... <i>Ustilago maydis</i> , <i>Sarcophaga peregrina</i> ... ésser humà d'origen sintètic	<i>Arabidopsis</i> , pastanaga, gerani, arròs, patata, tabac, tomàquet, blat	Logemann (1992) Terras (1995) Epple (1997) Kim (1999) Mitsuhara (2000) Li (2001)
b) <b>Fitoalexines</b>	resveratrol sintasa ...	raïm, cacauet...	civada, tabac, tomàquet, arròs, blat, ordi	Hain (1993) Stark-Lorenzen (1997) Leckband (1998) Hipskind (2000)
c) <b>Inhibidors dels productes de virulència del patògen</b>	oxalat oxidasa inhibidor de poligalacturonasa ...	ordi, blat, pera... <i>Fusarium</i> , <i>Collybia velutipes</i>	àlber, tabac, colza, tomàquet	Desiderio (1997) Powell (2000) Liang (2001)
d) <b>Alteració dels components estructurals</b>	peroxidasa anionic peroxidasa ...	cogombre, tabac, blat	patata, blat tomàquet	Lagrimini (1993) Ray (1998) Schweizer (1999)
e) <b>Regulació de la resposta defensiva de la planta</b>	glucosa oxidasa catalasa salicilat hidroxilasa <i>cryptogein</i> (elicitor) ...	<i>Arabidopsis</i> , tabac <i>Aspergillus niger</i> , <i>Phytophthora cryptogea</i> ... d'origen bacterià	<i>Arabidopsis</i> , cotó, patata, tabac	Delaney (1994) Wu (1995, 1997) Tepfer (1998) Murray (1999) Keller (1999) Verberne (2000)
f) <b>Combinació de molècules antifúngiques</b>	quitinasa+ quitinasa quitinasa +glucanasa quitinasa + <i>RIP</i> quitinasa+osmotin	tabac,ordi, arròs, civada	tabac, tomàquet, pastanaga	Van den Elzen (1993) Zhu (1994) Jach (1995) Melchers (2000)

**Taula 33:** Plantes modificades genèticament per a la millora de la resistència a fongs fitopatògens (1991-2001). *RIP*, ribosome-inactivating protein; *TLP*, thaumatin-like protein. S'indiquen les principals espècies vegetals transformades. (Adaptat de Punja, 2001).

Les diferents estratègies, utilitzades fins a l'actualitat, per a la millora genètica de la resistència de plantes a patògens, i que són resumides en la *Taula 33*, es podrien agrupar en cinc categories generals:

- 1) L'expressió de productes gènics que són directament tòxics per al patogen o que redueixen el seu creixement (a la *Taula 33*: apartats *a*, *b* i *f*). Aquesta categoria inclouria l'expressió de gens de defensa d'origen vegetal, que codifiquen per diferents proteïnes PR (*pathogenesis-related proteins*), com per exemple enzims hidrolítics (quitinases i glucanases); proteïnes antifúngiques (osmotina i *thaumatin-like protein*); pèptids antimicrobians (tionines, defensines, lectines); proteïnes que inactiven els ribosomes (RIP, *ribosome-inactivating protein*), i fitoalexines. També s'inclouen gens d'origen fúngic, bacterià, humà o sintètic, que codifiquen per molècules que tenen el mateix efecte de toxicitat o reducció del creixement del patogen.
- 2) L'expressió de productes gènics que destrueixen o neutralitzen algun component de les estratègies d'atac del patogen, com per exemple la poligalacturonidasa, l'àcid oxàlic i la lipasa (a la *Taula 33*: apartat *c*).
- 3) L'expressió de productes gènics que augmenten les defenses estructurals de la planta, com per exemple l'augment dels nivells de peroxidasa i lignina (a la *Taula 33*: apartat *d*).
- 4) L'expressió de productes gènics que condueixen a l'alliberament de senyals que poden regular les defenses de la planta. Aquesta estratègia inclouria la producció de elicitors específics, peròxid d'hidrogen, àcid salicílic i etilè (a la *Taula 33*: apartat *e*).
- 5) L'expressió de gens de resistència (R), els productes dels quals estan involucrats en la resposta hipersensible (HR) i en les interaccions amb els factors d'aviorulència (Avr).

Les citades estratègies han donat bons resultats a nivell d'inhibició o reducció del creixement fúngic *in vitro*, o de reducció de les lesions o infecció en planta, sobretot aquelles que impliquen l'expressió de gens que codifiquen per molècules que són directament tòxiques pel patogen. Amb les altres estratègies també s'obtenen resultats interessants, però en alguns casos existeixen efectes no desitjats: la sobreexpressió de peroxidases pot tenir efectes negatius en el creixement i desenvolupament de la planta transgènica (Lagrimini *et al.*, 1997); així mateix, l'activació de les respostes de defensa de la planta i la sobreexpressió d'algunes molècules (per exemple de peròxid d'hidrogen) pot tenir efectes fitotòxics (Murray *et al.*, 1999). Algunes proteïnes RIP que han resultat fitotòxiques al ser expressades en planta (Zoubenko *et al.*, 1997). Per altra banda, els resultats obtinguts mitjançant l'expressió de gens de resistència (R) deixen entreveure la necessitat d'un millor coneixement de les vies de transducció de senyals de resposta a patògens.

Cal destacar els encoratjadors resultats de l'estratègia de combinar diferents molècules antifúngiques, com ara quitinases i glucanases, en una mateixa planta. Noves combinacions de molècules antifúngiques conduiran més fàcilment al control d'un ampli espectre de fongs fitopatògens, i es reduirà la pressió de selecció sobre el patogen, prevenint així l'aparició de resistències (Punja, 2001).

Dels resultats dels estudis d'expressió de gens en plantes per la millora de la resistència a patògens, realitzats fins a l'actualitat, se'n desprèn la necessitat de realitzar estudis, de diversa naturalesa, prèviament a la introducció del transgen en planta. Així, s'imposa la realització d'estudis d'inhibició del creixement fúngic *in vitro* amb l'objectiu de determinar l'espectre d'acció contra diferents fongs fitopatògens, i la potència antifúngica de la molècula en estudi. Per altra banda, si es tracta d'una proteïna no vegetal, els estudis previs de fitotoxicitat amb cultius de cèl·lules vegetals, són de gran importància per preveure l'efecte de l'expressió del transgen en l'interior de la planta.

Finalment, si comparem els resultats aconseguits en la millora genètica de plantes per a la resistència a patògens, amb l'èxit científic i comercial de la plantes transgèniques resistents a insectes, l'estratègia de protecció contra els fongs fitopatògens només ha fet que començar. Dels més de 100 articles publicats sobre el tema, aproximadament el 30% s'han realitzat en tabac com a planta model; així mateix molt pocs cultius han sigut assajats en camp, i el seu possible efecte sobre altres organismes o en el medi ambient no ha estat encara estudiats (Punja *et al.*, 2001).