

I.2.3.3 Expressió del gen *uidA* en teixits de la planta d'arròs i en resposta a ferida mecànica

Es seccionaren segments de **tija** d'aproximadament 1,5 cm i es processaren immediatament (assaig d'activitat GUS) per a la seva posterior observació. Els resultats obtinguts per a l'assaig histoquímic realitzat en tija, es mostren a la *Figura 66*.

L'estudi de l'expressió en tiges, de plantes de les línies *pubi::gus::nos*, va posar de relleu l'expressió constitutiva del gen informador *gus* on s'observà una coloració blava generalitzada. Així mateix cal destacar que, les línies *pubi::gus::nos*, també presentaren expressió del gen *gus* en resposta a ferida, que es traduí en coloració blava més intensa present a les zones de tall. Aquests resultats concorden amb estudis anteriors amb plantes transgèniques per aquest promotor *ubi*, on es descriu la inducció d'aquest promotor per estrès mecànic (Takimoto *et al.*, 1994; Christensen & Quail, 1996).

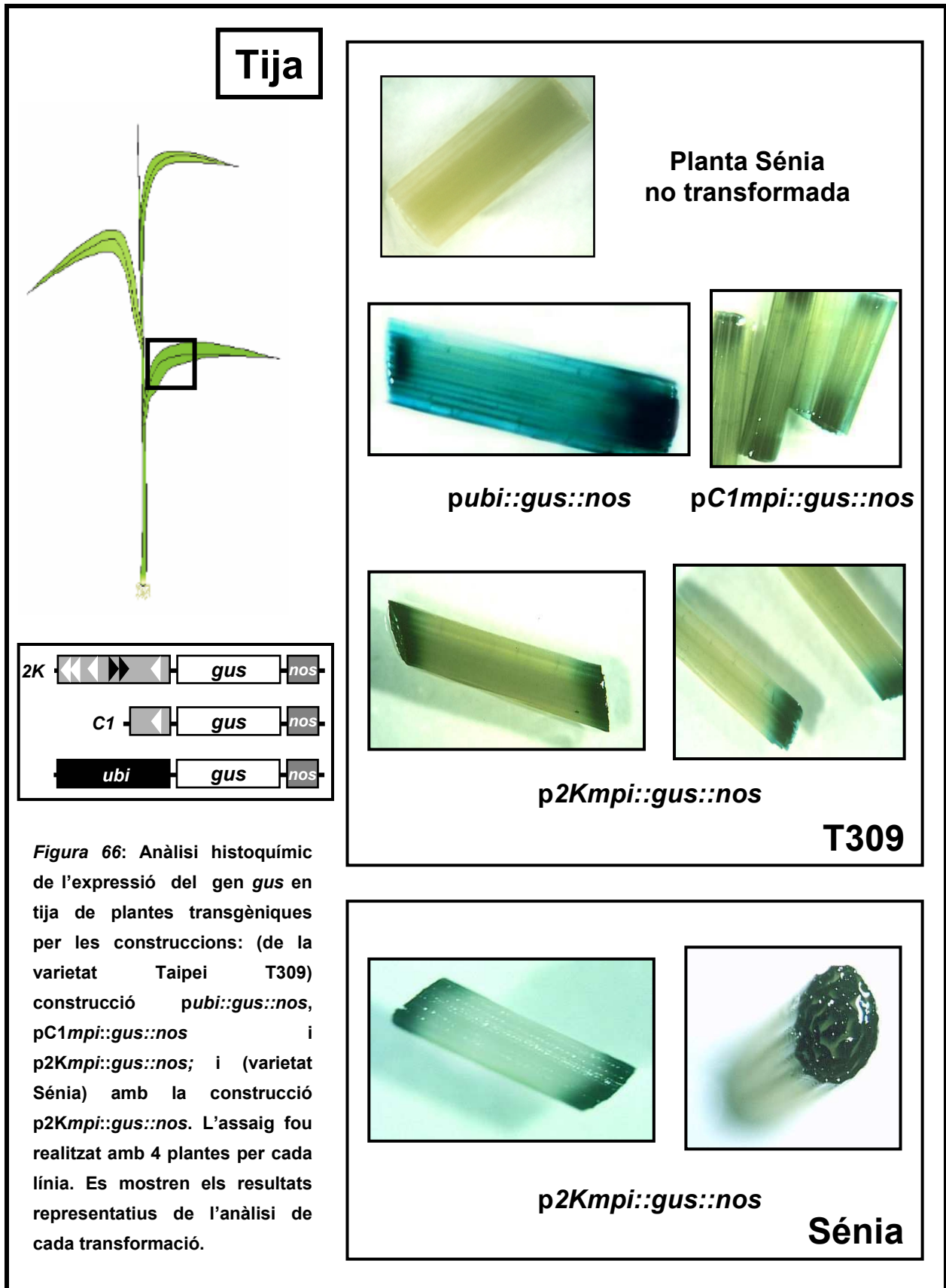
Les plantes transformades amb la construcció *pC1mpi::gus::nos*, presentaren als extrems dels fragments tallats, expressió del gen *gus* d'intensitat intensa, però cap expressió en la resta de la tija. En les plantes transformades amb les construccions *p2Kmpi::gus::nos*, tant per la varietat d'arròs Taipei T309 com per la varietat Sènia, també s'observà una forta coloració a les zones de tall de la tija. No s'observà coloració a la resta del fragment de tija, igual que per a la construcció *pC1mpi::gus::nos*. Aquests resultats revelen que l'expressió del gen informador *gus* es produeix en resposta a la ferida mecànica, produïda al tallar la tija.

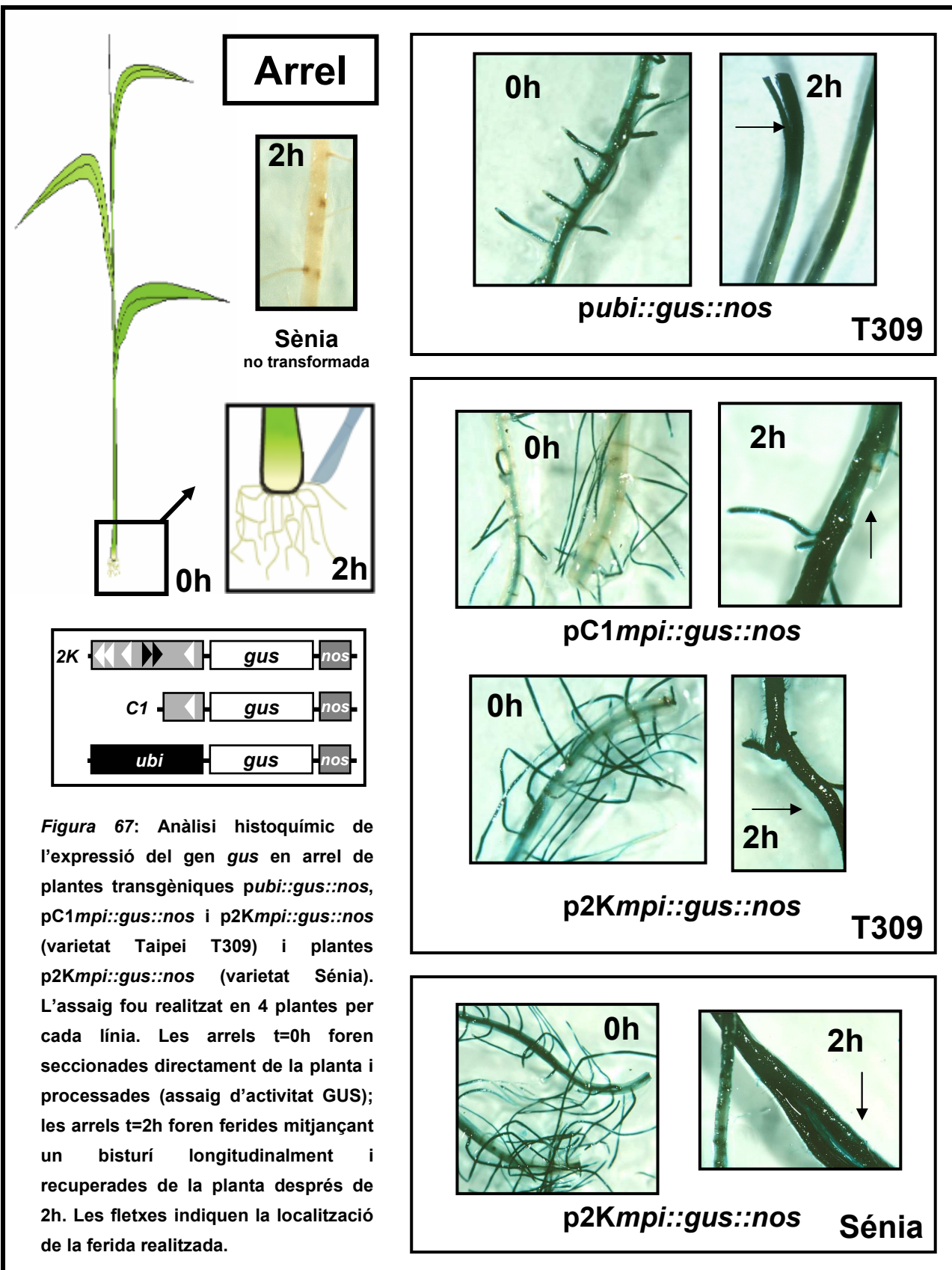
Per altra banda, s'estudià l'expressió del gen informador *gus* en les **arrels** de les plantes transformades; els resultats es mostren a la *Figura 67*.

En aquest estudi es seccionà un fragment d'arrel de cada planta i es processà directament (assaig d'activitat GUS), considerant aquest com a temps 0h. Seguidament es féu, en una altra arrel de la mateixa planta, una ferida longitudinal mitjançant un bisturí; 2 hores després de realitzar la ferida, la mostra d'arrel es va recollir i processar.

En les arrels de les plantes *pubi::gus::nos*, s'observà una intensa coloració blava deguda a l'expressió constitutiva dirigida pel promotor de l'Ubiquitina, tant a les 0h com 2h després de la inducció en les arrels ferides.

Tant en les plantes transgèniques *pC1mpi::gus::nos* com en les *p2Kmpi::gus::nos* (per ambdues varietats), l'activitat *gus* a t=0h s'observà confinada als teixits vasculars de les arrels primàries i secundàries, essent en el cas de les construccions 2K més intensa. En les arrels ferides longitudinalment, l'expressió *gus* a les 2h esdevé molt intensa i uniforme en tots els teixits de l'arrel, fet observable per ambdues construccions.





Per altra banda, les **llavors** de les plantes de la varietat Sènia, transformades amb la construcció *p2Kmpi::gus::nos*, es sotmeteren a un estudi histoquímic. Les llavors analitzades es processaren de tres maneres: decorticació manual, decorticació manual seguida de tall longitudinal, i decorticació mitjançant abrasió intensa amb paper de vidre. Aquestes llavors processades foren sotmeses al buit durant 20 minuts en substrat X-GLU i, seguidament, es sotmeteren a dos anàlisis d'activitat GUS en paral·lel. Els assaigs GUS diferien entre sí en el temps d'incubació en el substrat X-GLU: 1h 30 minuts o bé tota la nit, en ambdós casos a 37°C. Seguidament a la incubació, es retirà el substrat i es varen fer dos rentats successius mitjançant etanol al 70%, seguits d'un rentat amb etanol al 90%.

La *Figura 68* mostra els resultats obtinguts amb les llavors de les plantes transgèniques *p2Kmpi::gus::nos*, processades mitjançant els citats procediments. Tant amb un període d'incubació en substrat X-GLU d'1hora i 30 minuts com una incubació durant tota la nit, les llavors *p2Kmpi::gus::nos* decorticades manualment no presentaven coloració blava que indiqués l'expressió del gen *gus*. El processament que consistia en la decorticació manual i posterior seccionament longitudinal de la llavor, va permetre l'observació de l'activitat GUS, activitat que es trobava estrictament confinada a l'epiteli de l'escutel de l'embrió; contràriament, a l'albumen de la llavor no es detectà activitat del gen *gus*.

Si la incubació amb el substrat X-GLU s'allargava tota la nit, la coloració blava apareixia, conseqüentment, més intensa a l'epiteli escutelar i també a les zones de l'aleurona on s'havien realitzat els talls.

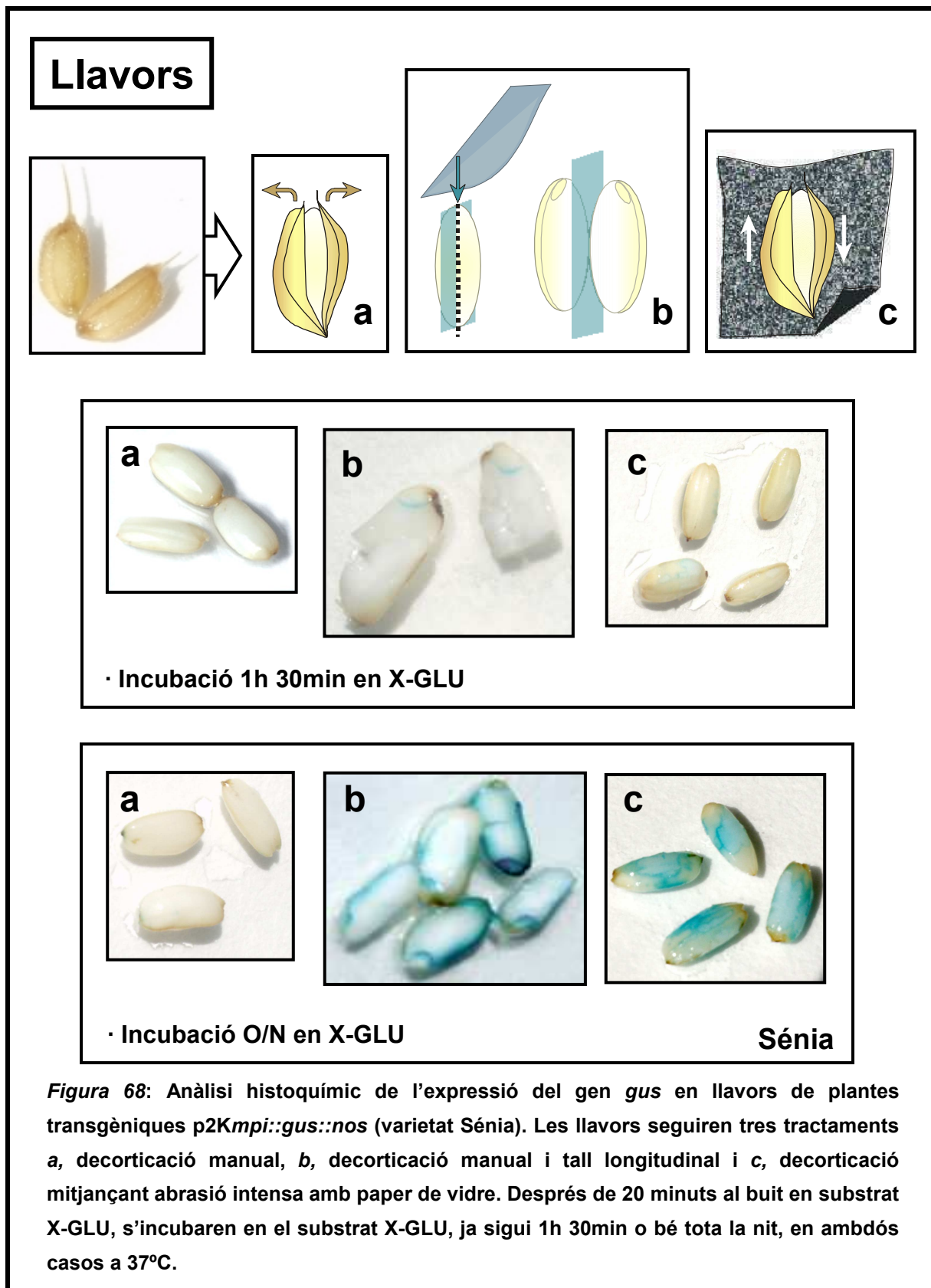
El tractament de decorticació per abrasió intensa i incubació d'1h 30min, mostrà una lleugera coloració al tegument en les zones on hi havia hagut ferides més profundes. Si es deixava en contacte la llavor processada en el medi líquid del substrat X-GLU, la coloració blava es feia intensa i més homogènia en les zones abrasades.

De l'estudi de l'expressió del gen *gus* en llavors, cal destacar que l'expressió del gen *gus* no es detectà a l'endosperm de les llavors.

I.2.3.3.a Cinètica d'inducció per ferida mecànica en fulla

Per aprofundir en l'estudi funcional del promotor *mpi* en plantes d'arròs, es realitzà un assaig histoquímic per determinar la cinètica d'inducció de l'expressió del gen *uidA* (gen *gus*) per ferida mecànica al llarg del temps.

Amb aquesta finalitat, es prengueren mostres foliars a t=0h de les plantes transgèniques de les diferents construccions (*pubi::gus::nos*, *C1::gus::nos* i *2K::gus::nos*) i es processaren. Seguidament, es realitzaren talls paral·lels entre si i perpendiculars als marges de la fulla per a cada una de les plantes a analitzar. Es recuperaren i processaren mostres foliars als: 10 minuts, 30 minuts, 1h, 2h i 6h després de fer els talls. Les mostres processades foren



examinades amb lupa binocular i es prengueren fotografies representatives per a cada línia analitzada; aquestes observacions es mostren a la *Figura 69*.

Les plantes transgèniques *pubi::gus::nos* presentaren coloració blava generalitzada en tota la fulla, i més accentuada a les zones de tall.

Les plantes *pC1mpi::gus::nos* mostraren un patró d'expressió del gen *gus* que evidenciava la inducció per ferida mecànica que li confereix el promotor *mpi*. La coloració blava apareixia dèbilment entre 1 i 2 hores després de realitzar-se la ferida mecànica, anà en augment fins a les 6h (temps màxim analitzat). En totes les plantes, aquesta coloració apareixia localitzada únicament a les zones de tall.

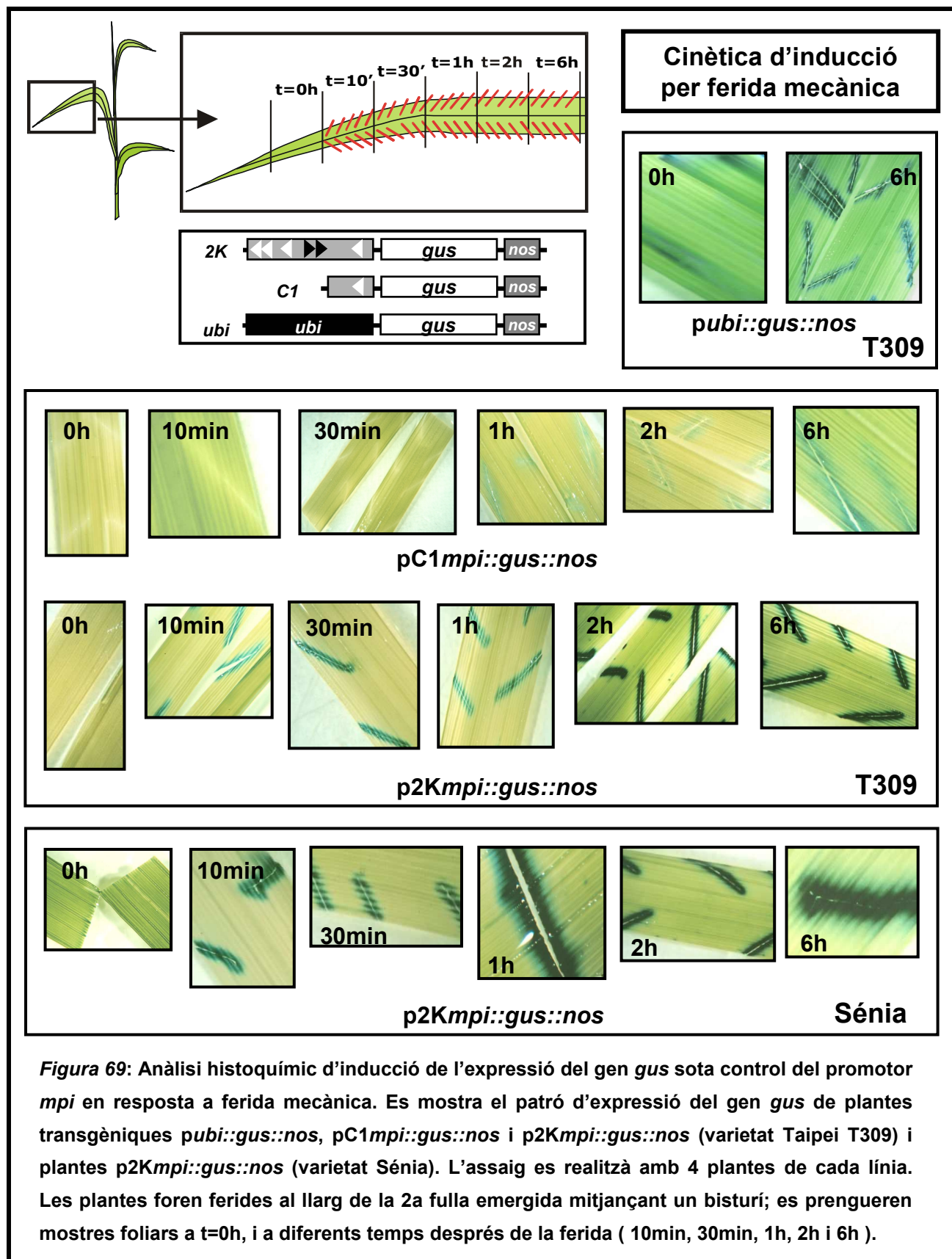
En les plantes transgèniques *p2Kmpi::gus::nos* (tant de la varietat d'arròs Taipei T309 com de la varietat Sènia) també s'observà que l'expressió del gen *gus* apareixia estrictament localitzada a les zones de tall.

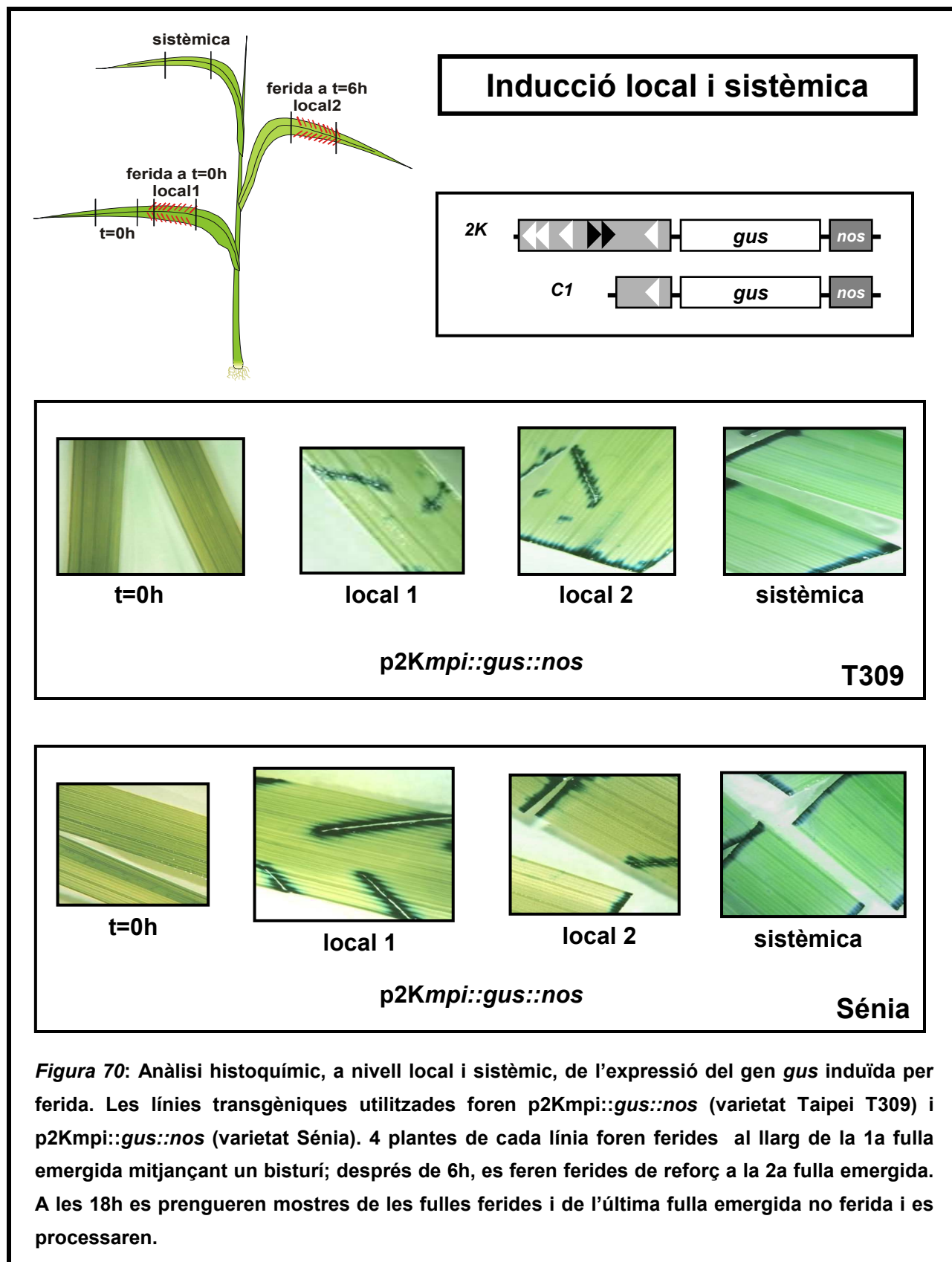
En totes les línies *p2Kmpi::gus::nos*, que contenien aproximadament 1800pb de la zona promotora del gen *mpi* i 6 motius putatius de resposta a jasmonat, l'activitat *gus* s'observà molt més ràpidament que en les plantes *pC1mpi::gus::nos*, que contenien solament 1 motiu invers en 700pb de promotor *mpi*. Als 10 minuts després de ferir la fulla de les línies *p2Kmpi::gus::nos*, s'observava ja una forta coloració blava que arribava al seu màxim d'intensitat a les mostres preses a partir de les 2 hores després de la ferida. Per les línies Sènia *p2Kmpi::gus::nos*, la intensitat de la coloració fou més intensa ja des de els 10 minuts i el grau d'intensitat màxima s'assolí abans, sent màxim a t=1h.

I.2.3.3.b Inducció per ferida mecànica a nivell local i sistèmic

Estudis anteriors realitzats al nostre laboratori amb plantes de blat de moro, demostraren la inducció de l'expressió del gen *mpi* tant a nivell local (fulles ferides mecànicament) com a nivell sistèmic (fulles no ferides). Per a determinar si els fragments de 700pb i/o 1800pb del promotor *mpi* conferien aquesta mateixa resposta en arròs es realitzà un nou assaig histoquímic.

Plantes transgèniques, portadores de les diferents construccions a assajar, foren ferides mecànicament, mitjançant un bisturí, al llarg de la primera fulla emergida (la més vella de la planta en estadi de 3-4 fulles). Després de 6 hores, es feren unes noves ferides de reforçament de la inducció, aquesta vegada a la segona fulla emergida. A les 18 hores de la primera ferida, es prengueren mostres de les fulles ferides i també de l'última fulla emergida no ferida. Les fulles es processaren tal i com s'ha descrit anteriorment i es procedí a la seva observació amb lupa binocular. Els resultats representatius per cada línia es mostra a la *Figura 70*.





Per a les plantes *p2Kmpi::gus::nos* de la varietat Taipei es va poder observar l'activitat de la proteïna GUS en les zones de tall per a ambdues mostres locals. A la majoria de les mostres sistèmiques, a part de la intensa coloració a les zones de tall, s'observà una coloració blava basal més accentuada en els vasos vasculars de la fulla.

Les mostres foliars provinents de plantes *p2Kmpi::gus::nos* de la varietat Sènia, presentaren el mateix patró d'expressió del gen *gus* que el de les plantes Taipei: no es detectà coloració a t=0h, però sí que es detectà activitat GUS a les zones de tall de les fulles ferides després de 18h. Igualment es detectà coloració a les zones de tall en les fulles sistèmiques i una coloració basal no homogènia (major en els feixos vasculars) en tota la làmina foliar.

En resum, els anàlisis histoquímics de l'expressió del gen *uidA* en plantes transgèniques ens han permès determinar la funcionalitat del promotor *mpi* de blat de moro, en arròs, així com estudiar la inductibilitat d'aquest promotor en resposta a ferida i l'expressió en diferents teixits.

L'expressió del gen *uidA* en tija, tant en les plantes *pC1mpi::gus::nos* (promotor *mpi* curt, varietat T309) com en les plantes *p2Kmpi::gus::nos* (promotor *mpi* llarg, en ambdues varietats assajades, T309 i Sènia) es mostrà restringida a les zones de tall on es practicà ferida mecànica. En les arrels de les plantes de totes les línies assajades, es pogué observar l'activitat de la proteïna GUS a t=0h confinada als teixits vasculars de les arrels primàries i secundàries. Així mateix, a t=2h després d'ocasionar una ferida longitudinal en l'arrel, es detecta l'expressió del gen *uidA* intensa i uniforme en tots els teixits.

Aprofundint en l'estudi funcional del promotor *mpi*, i mitjançant la realització d'una cinètica d'inducció de l'expressió del gen *uidA* per ferida mecànica al llarg del temps en fulla, es pogué concloure que ambdós fragments (700pb i/o 1800pb) del promotor MPI conferien expressió en resposta a ferida mecànica en plantes d'arròs transgèniques, si bé la resposta és més ràpida i intensa en el cas del fragment llarg (2K) del promotor.

Així, en les plantes transgèniques *pC1mpi::gus::nos* l'activitat *gus* es comença a detectar als 30min-1h després d'infligir la ferida a la fulla, i augmenta al llarg del temps en intensitat. Per altra banda, les plantes de les línies *p2Kmpi::gus::nos* presentaren una resposta més forta i més ràpida en les zones de tall, començant a detectar l'activitat GUS als 10min després de la ferida i essent ja màxima després d'1h.

La inducció de l'expressió del gen *uidA* en resposta a ferida en fulla s'observa tant a nivell local com a nivell sistèmic, tanmateix la resposta és molt més forta a nivell local. A nivell sistèmic (18h després de la ferida) s'observà activitat GUS a les zones de tall i una coloració basal no homogènia (major en els feixos vasculars) en tota la làmina foliar. L'expressió

sistèmica es mostrà lleugerament més elevada en les plantes *p2Kmpi::gus::nos* de la varietat Sènia.

Els estudis d'expressió amb llavors de plantes d'arròs, transformades amb la construcció *p2Kmpi::gus::nos*, revelaven que després de decorticació manual de les llavors, no es detectà expressió del gen *uidA* en l'endosperm de les llavors. La decorticació, seguida de tall longitudinal del gra d'arròs, condueix a l'expressió del gen *uidA* en l'epiteli escutel·lar de l'embrió. Així mateix, la decorticació i abrasió intensa de la llavor d'arròs, condueix a l'expressió del gen *uidA* en les zones del tegument amb ferides més profundes, però no a l'endosperm.

I.3 EXPRESSIÓ INDUÏBLE DEL GEN *mpi* EN PLANTES D'ARRÒS

I.3.1 Preparació de les construccions per a la transformació

Per a l'estudi de l'expressió induïble del gen *mpi* en plantes d'arròs, es prepararen construccions amb el gen *mpi* sencer, és a dir, la zona transcrita sota control de les seves pròpies regions reguladores (promotor i terminador del gen *mpi*).

Primerament s'obtingué la seqüència nucleotídica de la regió 3' del gen *mpi*, amb l'objectiu de determinar el fragment més adequat per a ser utilitzat com a terminador en les construccions gèniques. S'ha descrit a la literatura que, per a una expressió gènica eficient, cal la presència d'aproximadament 100-200 pb *riu avall* del lloc de poliadenilació de la regió 3' d'un gen; dins d'aquesta regió s'ha descrit l'existència de la seqüència consens YGTGTTY (on Y=C,T), encara que variable, que seria important per a un procés de poliadenilació correcte (An *et al.*, 1989).

Així doncs, partint del clon gènic λ m35, de blat de moro, es va obtenir mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció *Sall*, un fragment d'1kb. Aquest fragment contenia el codó d'stop TGA i dues senyals de poliadenilació AATAAA, així com una possible regió terminadora TGTGTT. Es trobaren, a més a més, motius YAYTG-like, descrits en les regions 3' de gran nombre de gens de plantes (Joshi, 1987). En la *Figura 71* es mostra la seqüència del fragment de la regió 3' del gen *mpi* utilitzat per a realitzar les construccions posteriors.

Així, amb l'objectiu d'estudiar de l'expressió del gen *mpi* en arròs sota control de les seves pròpies regions reguladores (el seu promotor i el seu terminador en plantes d'arròs), es prepararen dues construccions diferents. Es va seguir la mateixa estratègia, la utilitzada en l'anàlisi funcional del promotor *mpi* en plantes d'arròs (fragments C1 i 2K). D'aquesta manera, les dues construccions diferien entre sí en la longitud del fragment corresponent a la zona promotora i, per tant, en el nombre d'elements *cis* putatius de resposta a

metiljasmonat. Per a la clonació del gen *mpi* sencer, zona transcrita amb les regions promotora i terminadora, es varen dissenyar els següents oligonucleòtids:

-2 oligonucleòtids emprats com a encebadors a 5' (veure Figura 72):

ALL: 5' AGT ACT CAA ACC TCA TGT TTT AC 3'
localitzat a -1877 bases de l'inici de transcripció del gen

XHO: 5' CCT CGA GAG ACG ATA TTT AG 3'
localitzat a -694 bases de l'inici de transcripció del gen

-1 oligonucleòtid emprat com a encebador a 3':

TER: 5' ATG AAC CAA TGA ATC GTG AC 3'
localitzat a +499 bases després del codó d'stop TGA

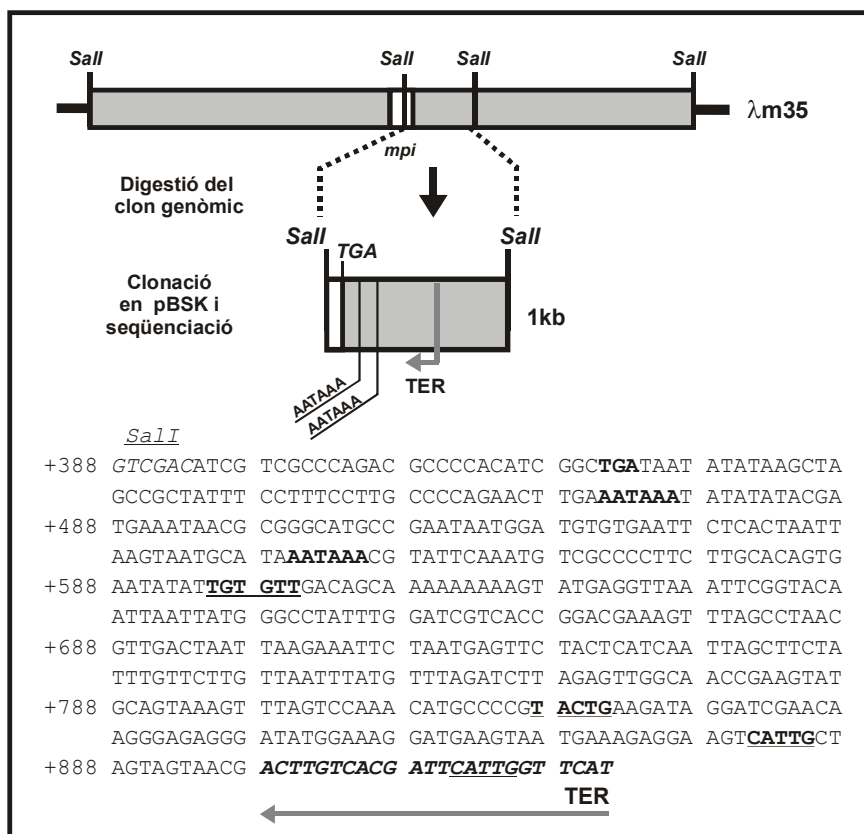


Figura 71: Seqüència de la zona 3' del gen *mpi*. S'indica la seqüència terminadora consens trobada **TGTGTT**, així com els motius **YAYTG-like** (Y=C, T). També s'indiquen, en negreta, el codó d'stop (TGA) i les senyals de poliadenilació (AATAAA). En cursiva i negreta, s'indica la seqüència de l'encebador TER utilitzat per a l'amplificació per PCR del gen *mpi*, que seguidament fou clonat en el vector per a la transformació d'arròs. Les xifres indiquen la distància del l'inici de transcripció.

Mitjançant la tècnica de PCR, a partir de les parelles d'encebadors ALL-TER o XHO-TER, i utilitzant ADN del bacteriòfag λ m35 com a motlle, s'obtingueren els dos fragments de ADN, amb dues longituds diferents de la regió promotora del gen *mpi*, que varen ser clonats en el vector pBlueScript (pBSK) i seqüenciats. Aquestes construccions foren anomenades pALL.MPI (fragment llarg del promotor *mpi*) i pX.TER (fragment curt del promotor *mpi*) (es mostren a la *Figura 40*).

Amb aquestes construccions es va dur a terme la transformació per bombardeig de plantes d'arròs de la varietat Sènia. Aquestes plantes foren transformades al laboratori del CIRAD de Montpellier sota la direcció del Dr. Emmanuel Guiderdoni. Malauradament, totes les plantes transgèniques obtingudes en aquest experiment (entre moltes altres més) foren destrossades per un atac, per part de grups ecologistes radicals, sofert als hivernacles transgènics del centre CIRAD (juny de 1999).

Així doncs, al tenir de refer la transformació de l'arròs, vàrem decidir de fer noves construccions que continguessin el gen *mpi* però que ens permetessin fer la transformació per *Agrobacterium*. Per a la transformació amb *Agrobacterium* s'utilitzà el plasmidi pCAMBIA1300. El procés de clonació de ambdues construccions, S-MPI (promotor curt del gen *mpi*) i L-MPI (promotor llarg del gen *mpi*), és esquematitzat a la *Figura 72*.

Per a la construcció que contenia el fragment més curt de zona promotora, que anomenarem a partir d'ara S-MPI (Short MPI), és realitzà una subclonació a partir de la construcció pX.TER. Mitjançant la digestió amb els enzims de restricció *HindIII* i *BamHI*, es realitzà una lligació direccionalitzada que va permetre la clonació en el plasmidi pCAMBIA1300. Aquesta construcció S-MPI fou seqüenciada i s'utilitzà per transformar arròs de la varietat Ariete mitjançant *Agrobacterium*.

Per a la construcció amb el fragment de promotor més llarg, que anomenarem L-MPI (Long-MPI), és realitzà la subclonació a partir de la construcció prèvia pALL.MPI. Es féu una triple digestió d'aquesta construcció amb els enzims de restricció *HindIII*, *PvuI* i *BamHI*, per a l'obtenció final d'un fragment d'ADN que contenia el gen *mpi* complet. La digestió amb l'enzim de restricció *PvuI* (la diana *PvuI* no es troba present en el gen *mpi*) es realitzà per a poder diferenciar correctament, entre dos fragments d'igual longitud, el fragment a aïllar que contenia el gen complet de la resta de l'ADN plasmídic. Finalment, es realitzà una lligació direccionalitzada d'aquest fragment en el vector pCAMBIA1300, mitjançant les dianes *HindIII* i *BamHI*. La construcció així obtinguda fou confirmada per seqüenciació.

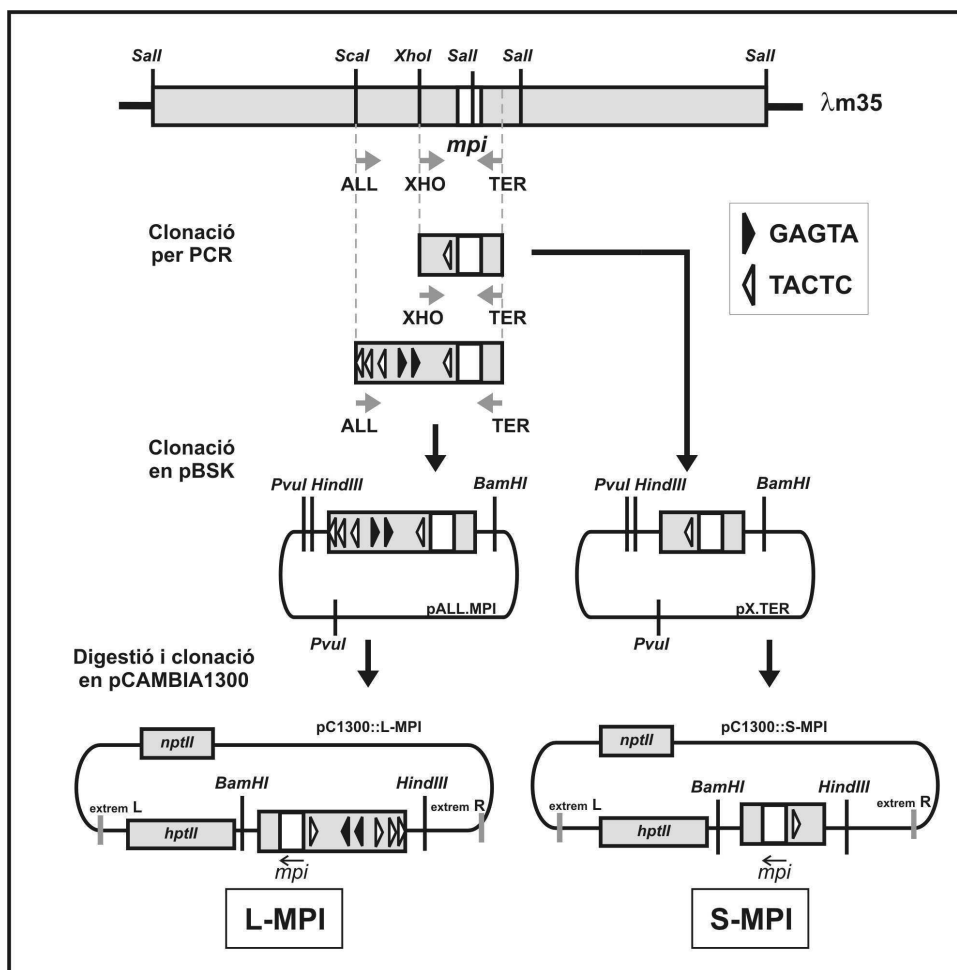


Figura 72: Preparació de les construccions S-MPI i L-MPI portadores pel gen *mpi* i les seves pròpies regions reguladores 5' i 3'. En blanc, zona transcrita del gen *mpi*. S'indiquen els motius putatius de resposta a metiljasmonat directes ►, GAGTA, i indirectes ◄, TACTC, que es localitzen en el promotor del gen.

1.3.2 Transformació de plantes d'arròs (varietat Ariete)

La transformació de plantes d'arròs, de la varietat Ariete, amb les construccions S-MPI o L-MPI es realitzà mitjançant el mètode de transformació per *Agrobacterium*.

La soca d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 fou transformada amb cada una de les construccions; posteriorment es procedí a la transformació de calls embriogènics, procedents de llavors induïdes d'arròs de la varietat Ariete, amb les soques d'*Agrobacterium* portadores de les construccions S-MPI o L-MPI.

Es transformaren 120 i 100 calls embriogènics per les construccions S-MPI i L-MPI, respectivament. Les taxes de contaminació de calls per *Agrobacterium* després de la cocultivació foren del 47,5% per S-MPI i del 63% per L-MPI, en aquest últim cas és un tant per cent força elevat (el percentatge habitual observat sol ser del 30-40%). El percentatge de

calls transformats que reaccionaren, després de la transferència a medis selectius i de regeneració, fou del 22% per S-MPI i del 30% per L-MPI. Després de la regeneració i de la posterior selecció dels calls transformats que desenvoluparen tija, s'obtingueren 11 línies (derivades de calls independents) per la construcció S-MPI que originaren 79 plantes transgèniques. Per a la construcció L-MPI s'obtingueren 5 línies independents, que originaren 6 plantes transgèniques. Aquestes plantes foren transferides a l'hivernacle per a la seva regeneració i posterior anàlisi. Les dades obtingudes en aquestes experiències de transformació es resumeixen a la *Taula 73*.

	calls inicials	calls regenerats	línies independents	nº final de plantes
S-MPI	120	22%	11	79
L-MPI	100	30%	5	6

Taula 73: Resum de la transformació de callus d'arròs (varietat Ariete) amb les construccions pC1300::L-MPI i pC1300::S-MPI, mitjançant *Agrobacterium*.

I.3.3 Anàlisi de les plantes transformades

I.3.3.1 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies seleccionades

Es determinà el nombre de còpies integrades en el genoma de les plantes L-MPI i S-MPI, de les línies obtingudes i fèrtils, mitjançant la tècnica de transferència d'ADN (*Southern Blot*). Es va extreure i quantificar l'ADN genòmic d'individus T0 de les tres línies S-MPI 4.6, 5.2 i 10.2 i L-MPI 5.2; aquests ADN foren posteriorment digerits amb l'enzim de restricció *BstEII* (veure esquema A a la *Figura 74*).

S'utilitzà la sonda de la regió codificant del gen de l'higromicina (*hph*) com a informació indirecte de la integració del transgen *mpi*. Els resultats obtinguts es mostren a la *Figura 74*. Com és d'esperar per una transformació mitjançant *Agrobacterium*, els anàlisi *Southern Blot* realitzats en les línies L-MPI 5.2, i S-MPI 4.6, 5.2 i 10.2, ens indicaren l'existència d'un baix nombre d'integracions del gen *hph* de l'higromicina (d'1 a 3 còpies en les diferents línies).

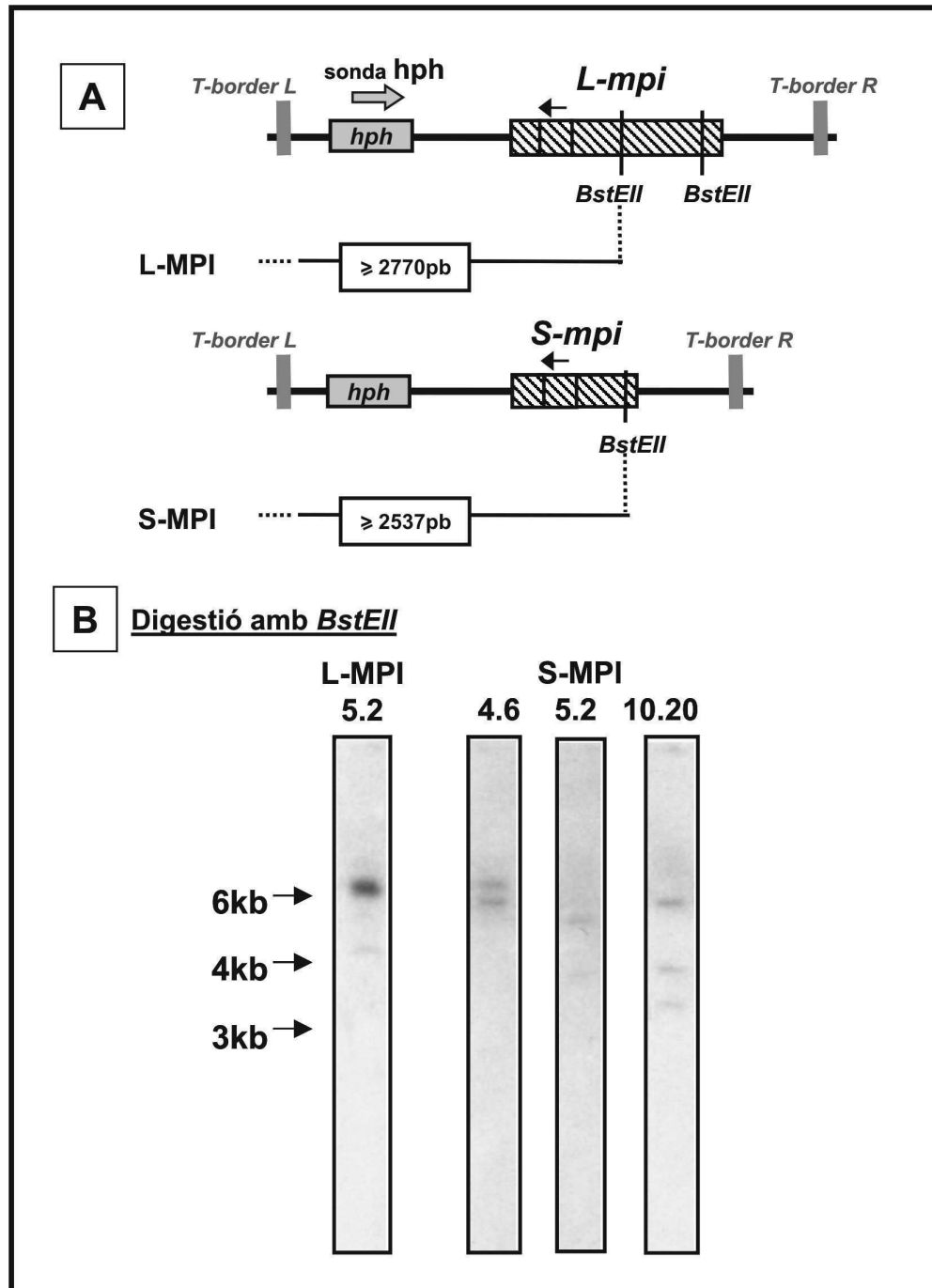
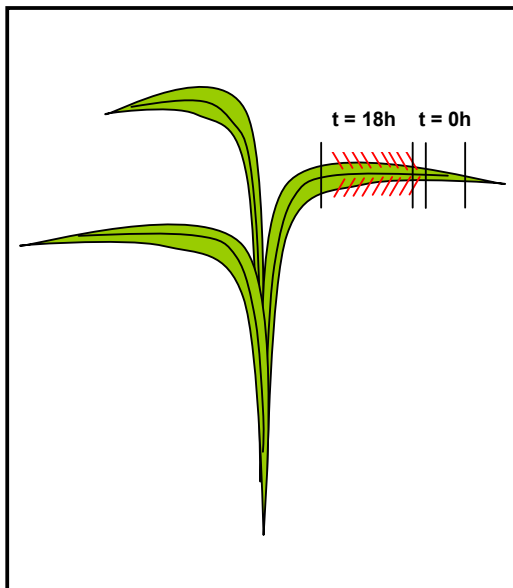


Figura 74: Anàlisi per *Southern blot* del perfil d'integració del transgen *mpi* en les línies 5.2 de L-MPI i 4.6, 5.2 i 10.2 de S-MPI (varietat Ariete, T0). A) Esquema de les construccions i tamany mínim del fragment derivat de la digestió amb l'enzim de restricció *BstEII*. B) Resultat de la hibridació utilitzant la sonda del gen de l'higromicina (*hph*). S'utilitzaren 5µg d'ADN genòmic extret de fulles.

I.3.3.2 Acumulació de la proteïna MPI en teixits ferits de plantes transgèniques

Per a seleccionar les plantes transformades que mostressin una millor resposta a ferida, en termes d'acumulació de l'inhibidor MPI, es realitzaren anàlisis per la tècnica d'immunotransferència.



En primer lloc es varen analitzar mostres foliars de totes les plantes transgèniques de la generació T0 seguint el següent procediment:

Es recollí un fragment d'aproximadament 1-2 cm (a una distància d'aproximadament 1 cm del final de la fulla), de la segona fulla més jove de cada planta, que es guardà en nitrogen líquid (t=0h).

Immediatament, es realitzaren talls perpendiculars al llarg de la fulla emprant bisturí. Després de 18h, es recolliren mostres foliars de les zones ferides i es congelaren en nitrogen líquid.

Mitjançant la tècnica de immunotransferència i utilitzant un anticòs policlonal anti-MPI, es realitzà un primer cribratge de les plantes transgèniques, S i L-MPI, per determinar quines acumulaven MPI en condicions de ferida. Així doncs, s'analitzaren primerament extractes proteics de les mostres foliars recollides a les 18h després realitzar-se la ferida mecànica, per descartar des de l'inici, les línies que no acumulaven l'MPI (o que si ho feien era a nivells baixos) en aquestes condicions experimentals. S'utilitzà proteïna MPI recombinant com a control per poder estimar el % en què s'acumulava aquesta proteïna en el total de proteïnes solubles de la fulla. S'analitzaren 70 línies obtingudes amb la construcció S-MPI i 5 línies obtingudes amb la construcció L-MPI; el resultat d'aquest primer cribratge es mostra en la Taula A inclosa en la *Figura 75*.

La *Figura 75-B* mostra com a exemple el resultat d'una de les immunotransferències realitzades per a determinar el nivell d'acumulació de l'inhibidor MPI, 18h després de ferida mecànica en algunes de les línies obtingudes.

Les línies que acumulaven la proteïna MPI, 18h després de ferida, a un nivell molt feble o que no presentaven acumulació, foren descartades. Amb les línies que acumulaven >0,1% d'MPI es passà a realitzar un nou cribratge (també mitjançant la tècnica de immunotransferència), analitzant-se aquesta vegada les mostres a t=0h i a les 18h després de la ferida, per cada una de les línies prèviament seleccionades.

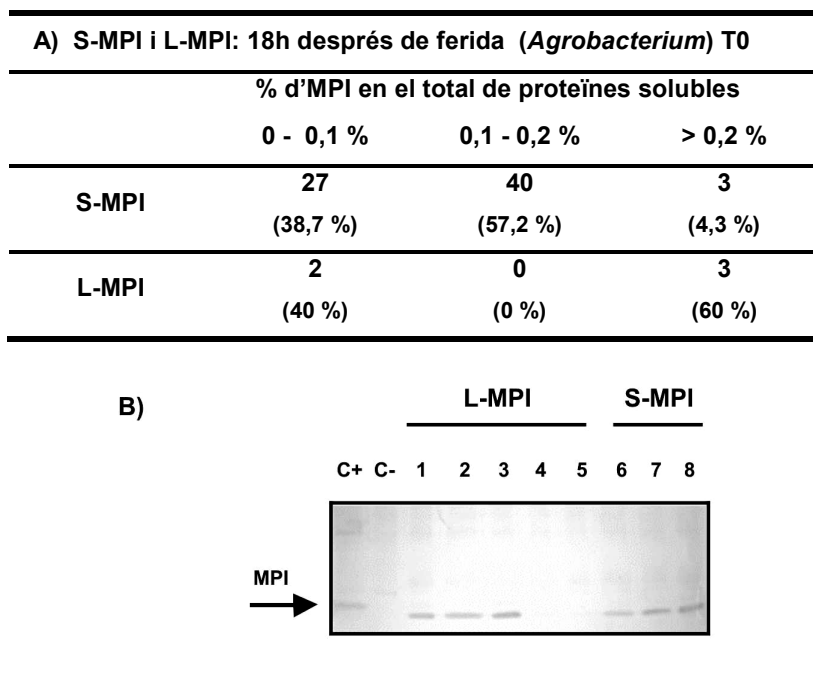


Figura 75: A) Acumulació de la proteïna MPI, 18h després de ferida, en mostres foliars de plantes S-MPI i L-MPI (varietat Ariete, T0), transformades mitjançant *Agrobacterium*. Els valors corresponen al nombre de plantes que acumulen l'inhibidor MPI a un determinat nivell; entre parèntesis s'indica el % del total de plantes transgèniques. B) Acumulació de la proteïna MPI en plantes transgèniques L-MPI i S-MPI, 18h després d'inducció per ferida mecànica, analitzades per immunotransferència. S'utilitzaren 50 µg d'extracte proteic. C+ control positiu equivalent a 0,1µg de proteïna MPI; C- control negatiu corresponent a extracte proteic de fulla de planta Ariete no transformada. #1 a #5 plantes transgèniques L-MPI i de #6 a #8 plantes transgèniques S-MPI.

Per la construcció S-MPI s'estudiaren 29 línies. Els resultats obtinguts es mostren en la següent *Taula 76*:

Plantes S-MPI: 0h versus 18h després de ferida			
S-MPI (varietat Ariete) <i>Agrobacterium</i> , T0	Nivells d'acumulació de l'inhibidor MPI		
	0h < 18h	0h = 18h	0h > 18h
	9 (31 %)	18 (62 %)	2 (7 %)

Taula 76: Característiques de l'acumulació de la proteïna MPI en mostres foliars de plantes S-MPI (varietat Ariete, T0), transformades mitjançant *Agrobacterium*. Es compara l'acumulació d'MPI a les 0h versus 18h després de ferida. Els valors corresponen al nº de plantes que acumulen l'inhibidor MPI; entre parèntesis s'indica el % del total de plantes transgèniques.

Per a la construcció L-MPI (varietat Ariete, T0) s'estudiaren 4 línies. En la *Figura 77* es mostra un exemple de les immunotransferències realitzades comparant les mostres obtingudes a t=0 i les a t=18h després d'inducció per ferida, per a diferents línies S-MPI i L-MPI. Com es pot veure, s'observà un elevat percentatge de línies S-MPI en les que els nivells d'acumulació a t=0h iguals, o fins hi tot superiors, als nivells d'MPI a t=18h (després de ferir).

Així doncs, entre les línies que presentaven una clara inducció en l'expressió del gen *mpi* en resposta a ferida mecànica, i que eren fèrtils, s'identificaren les línies de més interès per a obtenir les següents generacions T1 i T2: 3 línies independents de la construcció S-MPI (línies 4.6, 5.2 i 10.2) i 3 línies per a la construcció L-MPI (línies 4.1, 5.1 i 5.2).

Degut al nombre reduït de línies L-MPI disponibles, les anàlisis següents (cinètica d'acumulació d'MPI en resposta a ferida) es realitzaren solament amb les línies de la construcció S-MPI. Les línies L-MPI foren reservades per a la producció de llavors, amb especial atenció a la línia L 5.1 ja que presentava els millors resultats: acumulació d'MPI en resposta a ferida i sense acumulació basal a t=0h.

D'aquesta manera, es procedí a l'anàlisi de l'acumulació de l'inhibidor MPI de les plantes S-MPI de les línies 4.6, 5.2 i 10.2 (generació T2) en resposta a ferida mecànica. Es varen utilitzar quatre plantes, en l'estadi de planta de 3-4 fulles, per a cada una de les línies estudiades.

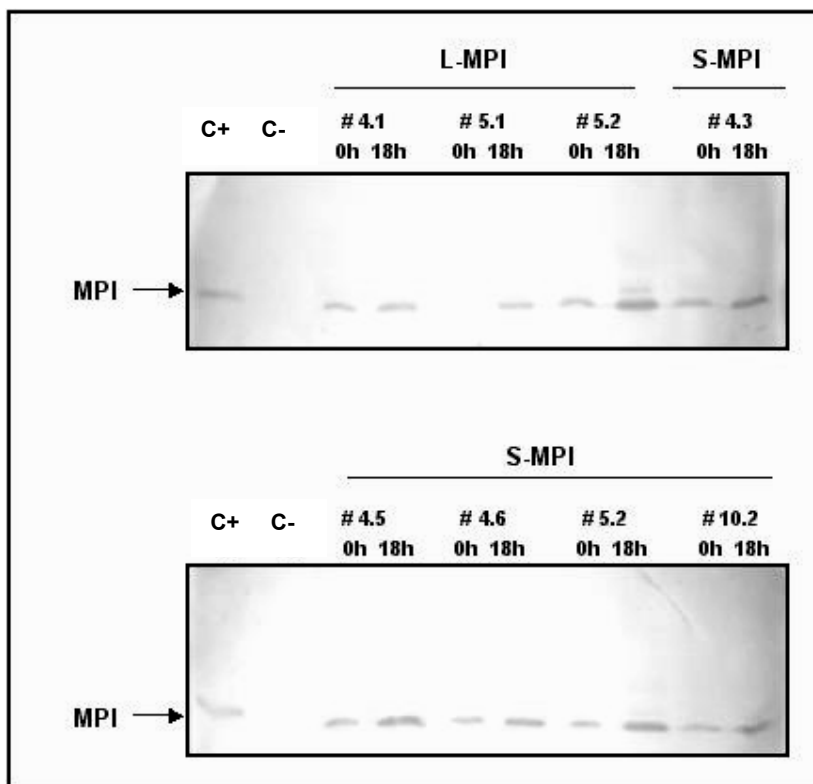


Figura 77: Acumulació a 0h (no inducció) i 18h (18h després d'inducció per ferida mecànica) de l'inhibidor MPI en plantes transgèniques L-MPI i S-MPI (varietat Ariete, T2). S'utilitzaren 50 µg d'extracte proteic de fulla. C+ control positiu equivalent a 0,1µg de proteïna MPI; C- control negatiu corresponent a extracte proteic de fulla de planta Ariete no transformada.

Es prengué com a temps 0h, un fragment d'aproximadament 1-2 cm de la segona fulla més jove de la planta, que es guardà en nitrogen líquid. Immediatament, es realitzaren talls perpendiculars al llarg de la fulla emprant fulles de bisturí. Es recolliren mostres foliars (d'aproximadament 1-2 cm) de les zones ferides als 30 minuts, 1 hora i 6 hores després de la inducció per ferida mecànica i es congelaren immediatament en nitrogen líquid. Aquestes mostres es processaren per a obtenir extractes de proteïnes solubles totals i, utilitzant l'anticòs anti-MPI, es realitzaren immunotransferències per a l'anàlisi de la cinètica d'acumulació de l'inhibidor MPI en resposta a ferida mecànica. En la *Figura 78* es mostra un exemple dels resultats obtinguts.

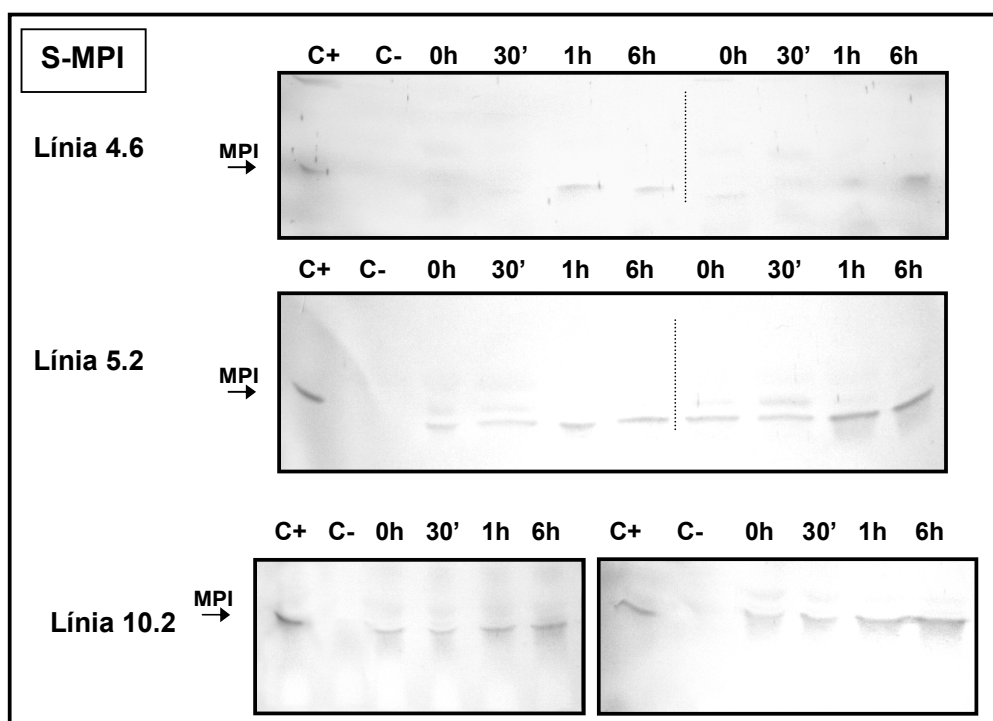


Figura 78: Cinètiques d'acumulació de l'inhibidor MPI en plantes transgèniques S-MPI després d'inducció per ferida mecànica (varietat Ariete, T2). S'utilitzaren 50 µg d'extracte proteic. C+ control positiu equivalent a 0,1µg de proteïna MPI; C- control negatiu corresponent a extracte proteic de fulla de planta Ariete no transformada. Les mostres foliars foren preses a temps 0h, 30 minuts, 1h i 6h després de ferir les fulles mitjançant bisturís.

Per les quatre plantes analitzades de la línia S-MPI 4.6, l'acumulació de l'inhibidor MPI a temps inferiors a 1h era inapreciable, mentre que a partir d'1h després de ferida mecànica era d'aproximadament un 0,1%-0,15% en el total de proteïnes solubles.

Per la línia S-MPI 5.2, el nivell basal d'acumulació de l'inhibidor MPI (t=0h) era ja significatiu, d'aproximadament 0,1% d'MPI en el total de proteïnes solubles; 1h després de ferida mecànica, l'acumulació de la proteïna MPI augmentà a nivells propers o iguals a 0,2% i es mantingué fins a les 6h (temps més llarg analitzat).

En les plantes de la línia S-MPI 10.2, s'observà també un nivell basal elevat proper a 0,1% d'MPI, que augmentà després d'una hora a nivells d'entre 0,1% i 0,2%. Aquests nivells es mantingueren fins a les 6 hores.

Així, es conclou que les plantes S-MPI, plantes que expressen el gen *mpi* (sota control del seu propi promotor i terminador), presentaven acumulació de l'inhibidor MPI en resposta a ferida mecànica. Ara bé, s'observa un nivell d'acumulació basal de MPI en fulla no ferida mecànicament. Aquest nivell basal pot ser degut a que les plantes estan exposades a constants agressions ambientals, que els poden provocar ferides que induiran aquesta acumulació basal d'MPI.

I.3.4 Bioassaigs amb plantes arròs amb expressió induïble del gen *mpi* front larves del lepidòpter *Chilo suppressalis*

Els resultats mostrats a l'*Apartat 1.1.4*, ens havien permès demostrar que les larves de *Chilo suppressalis*, al ser alimentades en plantes transgèniques que expressaven constitutivament el gen *mpi*, mostraven una reducció de pes i retard en el desenvolupament importants. Així mateix, ja s'havia comprovat l'acumulació en resposta a ferida del gen *mpi* sencer en plantes transgèniques d'arròs. Així doncs, es va procedir a comprovar si s'observaven els mateixos efectes alimentant larves de *Chilo* en plantes que expressaven el gen *mpi* de manera induïble.

Es va realitzar un bioassaig amb línies d'arròs transgèniques (varietat Ariete) S-MPI que contenien el gen *mpi* sota control de la versió curta del seu promotor (700pb). Després d'analitzar les línies S-MPI 4.6, 5.2 i 10.2 en les generacions T0, T1 i T2, i comprovar-se l'acumulació de MPI per ferida mecànica, es seleccionaren 21 plantes (germinades en l'agent higromicina) de cada línia per a la realització d'un bioassaig amb larves de *Chilo suppressalis*. El nivell d'acumulació basal de l'inhibidor MPI en les tres línies fou nul o inferior a 0,1%. A les 6h després de ferir les fulles, s'assoliren nivells de 0,15% d'MPI per la línia 4.6 i de 0,2% en les línies 5.2 i 10.2.

Aquestes plantes, col·locades en testos de tres en tres, juntament amb plantes, en el mateix estadi, de la varietat Ariete no transformades, es disposaren en els dispositius entomològics i s'infestaren a raó de 4 larves en estadi L2 per planta. Després d'un període d'infestació de deu dies, les larves foren recuperades de les diferents línies i pesades individualment.

En la *Figura 79* es mostren les diferències de pes observades per les larves alimentades en les diferents línies. S'observà una disminució significativa ($P < 0,2$) del pes mitjà en les larves recuperades de les tres línies transgèniques respecte el valor mitjà obtingut per les larves alimentades en les plantes Ariete control ($39,6\text{mg} \pm 3,9$). Els valors entre les tres

línies S-MPI foren similars: línia S-MPI 10.2: 30,6mg \pm 4,2; línia S-MPI 4.6: 28,5mg \pm 3,7; línia S-MPI 5.2: 28,3mg \pm 2,4.

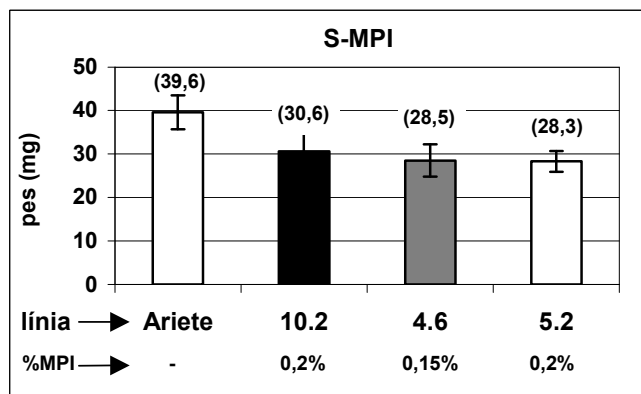


Figura 79: Pes mitjà de les larves recuperades de plantes transgèniques (varietat Ariete) S-MPI de les línies 10.2, 4.6 i 5.2, de la generació T2. S'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a controls. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Entre parèntesis s'indica el pes en mg. S'indica la desviació estàndard ($P < 0,2$).

En la *Figura 80* es mostra la distribució en grups de pes de les larves recuperades. Les larves recuperades de les plantes control presentaren poblacions de larves de tots els grups de pes fins a >61 mg, però cap representant de menys de 10mg. El major nombre de larves recuperades s'encabien entre els grups de pes de 21 a 50mg. Per altra banda, les larves alimentades en les plantes transgèniques que expressaven el gen *mpi*, presentaren individus de tots els grups de pes amb el màxim de representants dins els grups compresos entre 10mg i 40mg (línies S-MPI 10.2 i S-MPI 5.2).

Finalment, s'interrelacionà la distribució de en grups de pes i l'estadi larvari de les larves recuperades en les diferents línies d'arròs. Els resultats obtinguts es resumeixen en la *Figura 81*. Les larves alimentades en les plantes Ariete no transformades, evolucionaren a estadis superiors a l'estadi L4, fins a L7, trobant el màxim nombre d'individus en estadi larvari L5. En les tres línies transgèniques S-MPI es trobaren larves que no s'havien desenvolupat més enllà de l'estadi larvari L3. Les larves recuperades de les tres línies presentaren un perfil molt semblant, presentant el màxim d'individus en estadi L4 i L5. Cal esmentar que en la línia 5.2 no es recuperà cap larva en estadi superior a L6.

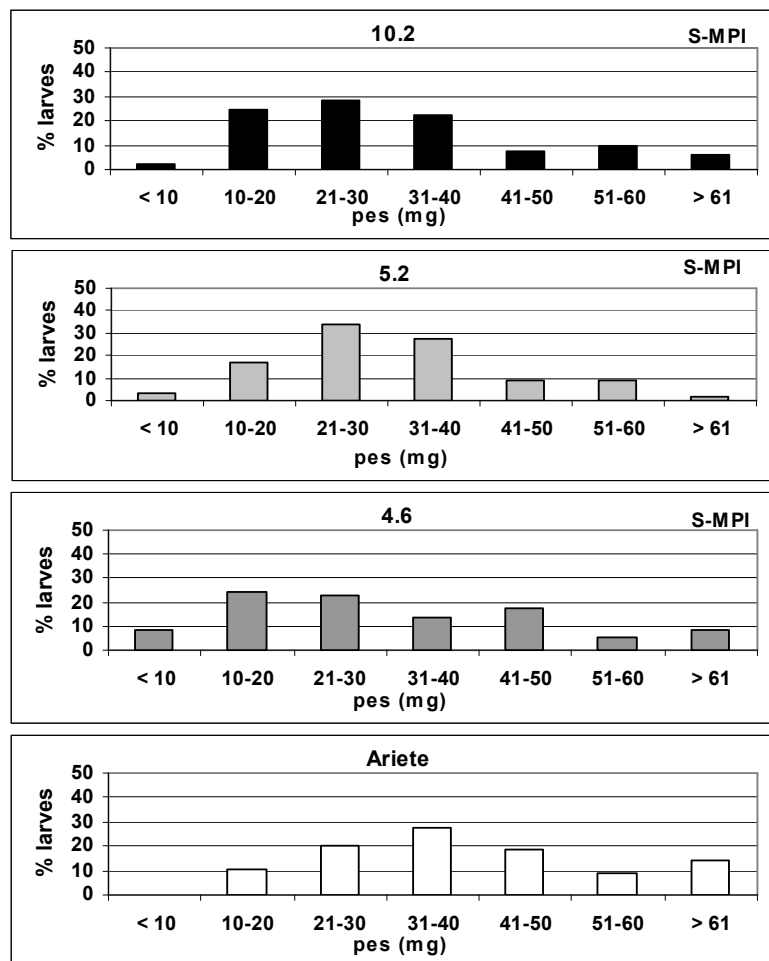


Figura 80: Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes transgèniques (varietat Ariete) S-MPI de la generació T2 (línies 10.2, 5.2 i 4.6) i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia transgènica.

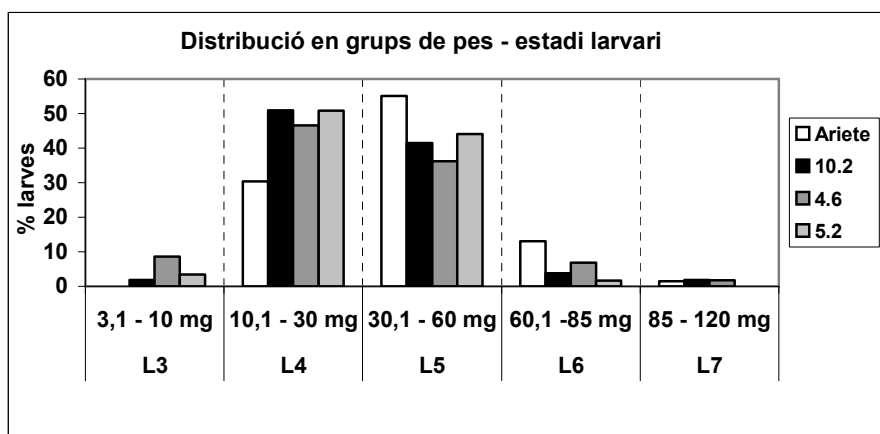


Figura 81: Distribució en grups de pes - estadi larvari de larves recuperades de plantes transgèniques S-MPI (T2, línies 5.2, 4.6 i 10.2) de la varietat Ariete i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia. S'interrelaciona el pes en mg amb l'estadi larvari equivalent (L3 a L7).

En la *Taula 82* es resumeixen els resultats obtinguts en el bioassaig realitzat amb les plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* de manera induïble.

Línia	% MPI	% larves recuperades	Estadi larvari (%)					Pes mitjà (mg)
			L3	L4	L5	L6	L7	
Ariete	-	86,3	0	30,4	<u>55,1</u>	13,0	1,45	39,6 ± 3,9
10.2	0,20	63,1	1,9	<u>50,9</u>	41,5	3,8	1,9	30,6 ± 4,2
4.6	0,10	69,0	8,6	<u>46,6</u>	36,2	6,9	1,7	28,5 ± 3,7
5.2	0,20	73,8	3,4	<u>50,8</u>	44,1	1,7	0	28,3 ± 2,4

Taula 82: Bioassaig utilitzant larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* de manera induïble. S'indiquen els valors obtinguts per a larves recuperades després de 10 dies d'alimentació en les línies Ariete no transformades, i en plantes de les línies 10.2, 4.6 i 5.2 (T2). % MPI indica el % d'inhibidor MPI detectat en el total de proteïnes solubles en mostres preses 6h després d'inducció per ferida mecànica; per L3-L7 es fa referència al % del total de larves recuperades (P<0,2).

El percentatge de larves recuperades en les línies transgèniques fou molt inferior que l'obtingut per les plantes Ariete control. En aquest bioassaig, les diferències entre el percentatge de larves recuperades en els controls i les plantes transgèniques fou d'entre un 13-23%. Malgrat que el percentatge de mortalitat no es pogué determinar amb seguretat, aquesta diferència en el nombre de larves recuperades es revela com a força significativa.

Així com s'observà en els altres bioassais (amb plantes que expressaven constitutivament el gen de l'inhibidor MPI) també s'observà en aquest bioassaig de plantes amb expressió induïble del gen *mpi*, que totes les plantes utilitzades restaven en bon estat al cap de deu dies d'infestació, fent possible fins i tot, la recol·lecció de llavors.

I.4 EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *mpi* EN PLANTES D'ARRÒS SOBRE LES PROTEASES DIGESTIVES DE *Chilo suppressalis*

Les activitats proteolítiques majoritàries en els intestins de larves de lepidòpter són de la família de les serinaproteases (Christeller *et al.*, 1992; Purcell *et al.*, 1992). Dins d'aquesta família de proteases trobem les activitats del tipus tripsina, quimotripsina i elastasa.

Després de comprovar que larves de *Chilo suppressalis*, alimentades en plantes d'arròs transgèniques que expressaven el gen *mpi*, es veien afectades i presentaven una disminució del seu pes respecte larves alimentades en les plantes Sènia control, es volgué estudiar les activitats proteolítiques del tracte digestiu de larves de *C. Suppressalis* i l'efecte de

l'expressió del gen *mpi* sobre les mateixes. Per a aquests estudis s'utilitzaren les larves provinents dels bioassaigs.

I.4.1 pH òptim de les activitats proteolítiques digestives de *Chilo suppressalis*

Previ a l'estudi de les proteases digestives de larves de *C. suppressalis*, es va realitzar un estudi inicial per a determinar el pH òptim d'activitat de les mateixes. Per a aquests estudis, els intestins foren extrets de larves de *C. suppressalis* de la població d'aquest lepidòpter que és mantinguda a l'insectari del centre CIRAD (cedides pel Dr. J.M. Vassal, Montpellier, França).

S'emprà un sistema de tampons discontinus amb pH compresos entre pH 6 i 12,5, per a realitzar l'assaig amb el substrat caseina-resorufin. Tal i com es pot veure a la *Figura 83*, la hidròlisi del substrat resultà feble per sota de pH 9 i presentà un màxim a pH 10,5 en el tampó glicina-NaOH.

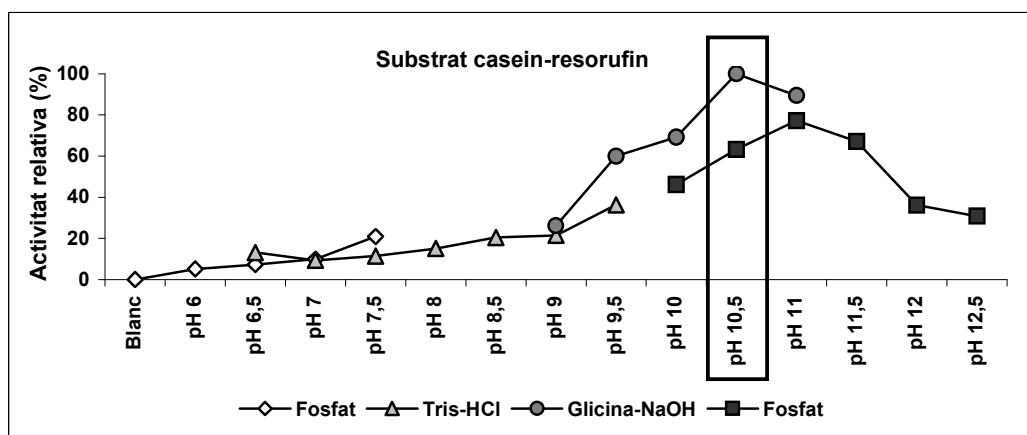


Figura 83: Efecte del pH en l'activitat proteàsica total d'extractes proteics digestius del lepidòpter *C. suppressalis* emprant el substrat caseina-resorufin i un sistema de tampons discontinus. S'utilitzà 10 µg d'extracte d'intestins.

Així doncs, el sistema digestiu de *Chilo suppressalis* presenta activitats proteolítiques amb un òptim de pH alcalí. Aquest resultat concorda amb els resultats descrits en la literatura, i per el nostre laboratori, per als sistemes proteolítics de larves de diferents lepidòpters (Christeller *et al.*, 1992; Tamayo *et al.*, 2000). Tots els assaigs realitzats posteriorment amb extractes de digestius de *C. suppressalis* foren realitzats amb el tampó glicina-NaOH pH 10,5.

I.4.2 Efecte de l'expressió transgènica del gen *mpi* en les proteases digestives de *Chilo suppressalis*

A continuació, es va procedir a determinar l'efecte de l'expressió transgènica del gen *mpi* en arròs, sobre les proteases digestives de larves de *Chilo suppressalis* quant aquestes són alimentades en les plantes transgèniques. Les larves utilitzades provenien dels bioassaigs realitzats amb les línies de plantes d'arròs de la varietat Sènia que expressaven constitutivament el gen *mpi* (pSC22ubi::*mpi*::nos), i plantes Sènia control no transformades (veure apartat I.1.4): la línia SC84 (que expressava l'inhibidor MPI a un nivell del 0,4% del total de proteïnes solubles) i la línia SC90 (que expressava l'MPI a un nivell del 0,2%). Les larves foren pesades i se'n disseccionà l'intestí, d'on posteriorment se'n feren els extractes proteics totals.

En la *Figura 84* podem veure els nivells d'activitats proteolítiques d'extractes proteics d'intestí de larves provinents de dos bioassaigs diferents, realitzats amb la generació T4 per a les línies SC84 i SC90 i la generació T5 per a la línia SC84.

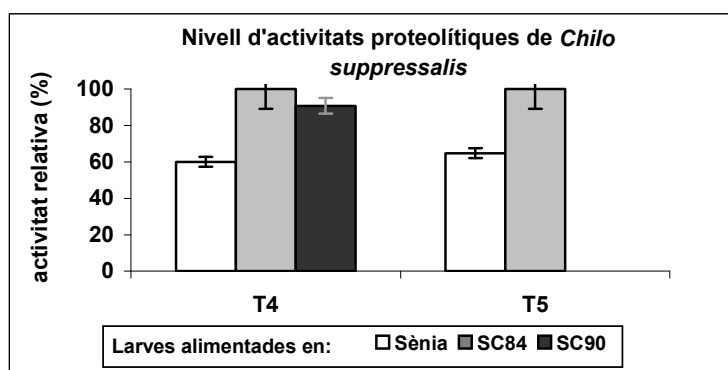


Figura 84: Nivell d'activitat proteolítica total en extractes de proteïnes d'intestins de larves de *Chilo suppressalis*. Les larves utilitzades provenien dels bioassaigs realitzats amb plantes que expressaven constitutivament el gen *mpi* (línies SC84 i SC90), i plantes Sènia control no transformades (Sènia) (veure Apartat I.1.4). S'utilitzà 1 µg d'extractes proteics d'intestins. Les plantes SC84 i SC90 acumulaven 0,4 i 0,2% d'MPI en el total de proteïnes solubles respectivament. Els valors de l'activitat proteolítica han estat calculats en relació als valors més alts obtinguts, en aquest cas els valors per les larves SC84.

Així, tant en l'assaig realitzat amb larves provinents del bioassaig amb la generació T4 com a partir de larves del bioassaig T5, el nivell d'activitat proteolítica total dels digestius de larves alimentades en les línies Sènia transgèniques SC84 i SC90, fou més elevat que el nivell d'activitat observat per les larves alimentades en les plantes control no transformades. Aquest estudi ens va permetre doncs, determinar que l'expressió del gen *mpi* en plantes

d'arròs té un efecte “estimulador” de les activitats proteolítiques digestives de les larves de *Chilo suppressalis*, quant aquestes es troben sotmeses a una ingesta continuada de l'inhibidor MPI.

En el present treball, també es realitzaren assaigs *in vitro* per a determinar l'efecte de l'addició de l'inhibidor MPI, sobre les activitats proteolítiques digestives de *Chilo suppressalis* provinents de larves alimentades en plantes Sènia no transformades. Amb aquest objectiu es va determinar el nivell d'activitat proteolítica total d'extractes d'intestins que foren preincubats amb quantitats creixents de la proteïna MPI expressada en *E. coli* (rMPI, fusió GST-MPI). Estudis anteriors realitzats en el nostre grup de recerca, indicaren que l'inhibidor MPI expressat en forma de proteïna fusió amb la GST (glutatió-S-transferasa), rMPI, és funcional i presenta una especificitat d'inhibició cap a serinaproteases del tipus quimotripsina i elastasa, de larves de l'insecte lepidòpter *Spodoptera littoralis* (Tamayo *et al.*, 2000; veure *Figura 19* de la *Introducció*). En la *Figura 85* pot veure's com l'activitat proteolítica total, dels extractes obtinguts a partir de larves alimentades en plantes control, decreix en presència d'MPI de manera depenent de la concentració de l'inhibidor. El màxim d'inhibició s'assolí utilitzant 1 µg d'MPI, observant-se una inhibició del 40% de l'activitat proteolítica total present en el sistema digestiu de larves de *C. suppressalis* (60% d'activitat residual en presència d'MPI).

Si es comparen aquests resultats amb els resultats anteriorment obtinguts en el laboratori amb *Spodoptera littoralis*, s'observa com l'efecte de l'inhibidor MPI sobre les proteases digestives d'ambdós lepidòpters, *C. suppressalis* i *S. littoralis*, és similar (comparar corba d'inhibició per l'MPI de la *Figura 85* (plantes Sènia) amb *Figura 21* de l'apartat 5.4.1 de la *Introducció*). En ambdós casos una part important de l'activitat proteolítica present en el tracte digestiu de larves d'aquests lepidòpters (40%) pot ser inhibida per la proteïna MPI.

Així mateix, es realitzà el mateix experiment per determinar l'efecte de l'addició d'MPI sobre les activitats proteolítiques digestives de larves alimentades en plantes Sènia transgèniques que expressaven constitutivament el gen *mpi*. S'utilitzaren les línies SC84 i SC90, de la generació T4.

Si parem esment a la comparació del efecte de l'addició d'MPI sobre les proteases digestives de larves de *C. suppressalis*, s'observa que l'efecte inhibitor de l'MPI sobre les activitats proteolítiques de larves alimentades en plantes *mpi* és menor que la inhibició observada sobre les proteases d'intestins de *Chilo* alimentades en plantes control. Mentre que en el cas de les larves alimentades en plantes Sènia no transgèniques, l'addició externa d'MPI permetia inhibir fins un 40% de l'activitat proteolítica total, en les larves alimentades en plantes d'arròs transgèniques, el màxim nivell d'inhibició que s'observà fou d'aproximadament el 20% (80% d'activitat proteolítica residual) (veure *Figura 85*, mostres SC84 i SC90). Això podria explicar-se pel fet que, en les larves de les línies SC84 i SC90,

una fracció de les seves activitats proteolítiques es trobaria ja inhibida per efecte de l'expressió del transgen en les plantes on s'alimentaren.

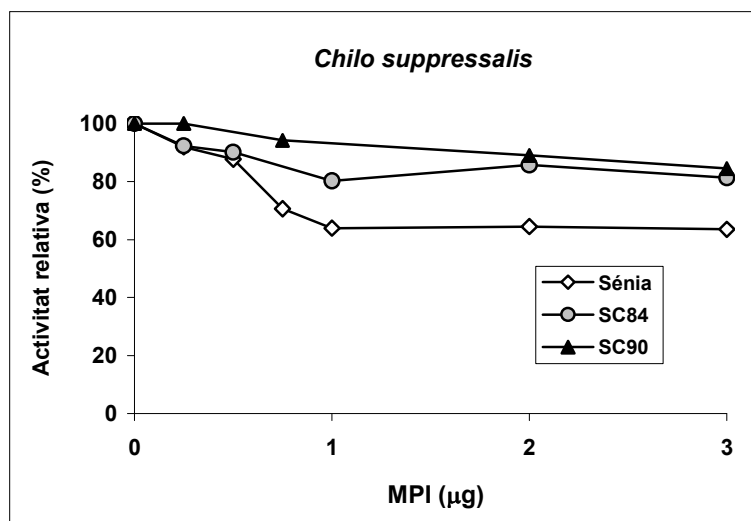


Figura 85: Inhibició per MPI de l'activitat proteolítica total d'extractes d'intestins de *Chilo suppressalis*. Les larves de *C. suppressalis* foren recuperades de plantes Sènia control no transformades (Sènia) i de plantes Sènia transgèniques per l'inhibidor de proteases MPI (SC84 i SC90, *ubi::mpi::nos*). S'utilitzà 1 µg d'extracte proteic d'intestins. El substrat utilitzat fou caseïna-resorufin.

Una altra possible explicació d'aquest resultat podria donar-se a partir de l'observació de l'efecte estimulador de les activitats proteolítiques digestives en les larves alimentades en plantes transgèniques (veure apartat anterior). Les activitats "de novo" no serien susceptibles d'inhibició per l'MPI: el % d'inhibició per incubació amb MPI resultant serà inferior al de les larves alimentades en les plantes control.

Per últim, es realitzà un estudi per determinar la participació de determinades proteases, en el sistema proteolític digestiu de larves de *Chilo suppressalis*. Amb aquest objectiu s'emprà una bateria d'inhibidors dirigits a proteases específiques que foren incubats amb extractes digestius de larves alimentades en plantes d'arròs Sènia no transformades. Els resultats obtinguts amb aquests inhibidors de proteases es varen comparar amb els observats amb l'inhibidor MPI.

S'utilitzà l'inhibidor Elastatinal com a inhibidor de serinaproteases del tipus elastasa; Chymostatin com a inhibidor de serinaproteases del tipus quimotripsines, i cisteïnaproteases; Inhibidor Bowman-Birk de soja (SBBI) com a inhibidor de serinaproteases dels tipus quimotripsines i tripsines; l'inhibidor Leupeptin per a serinaproteases del tipus tripsina i per a cisteïnaproteases; Pepstatin com a inhibidor d'aspartilproteases i EDTA com

a inhibidor de metal·loproteases; i finalment PCI (Potato Carboxipeptidase Inhibitor) que inhibeix carboxipeptidases A i B (subministrat pel Dr. F.X. Avilés del Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB).

En la taula següent s'indiquen els inhibidors utilitzats i les seves especificitats d'inhibició.

Inhibidors	Proteases
Elastatinal	Serin- (elastases)
Chymostatin	Serin- (quimotripsines) Cisteïn- (descrit en insectes, (Jongsma, 1996; Novillo, 1997))
Leupeptin	Serin- Cisteïn-
Soybean Bowman-Birk (SBBI)	Serin- (quimotripsines i tripsines, descrit en insectes (Lee, 1995))
Pepstatin	Aspartil-
EDTA	Metal·lo-
PCI	Carboxipeptidases A i B

Es va preincubar l'extracte de digestius de *Chilo suppressalis* amb cadascun dels inhibidors citats, posteriorment es realitzà l'assaig d'activitat emprant el substrat caseina-resorufin.

Com es pot observar a la *Figura 86*, l'inhibidor que inhibia més fortament les activitats proteolítiques digestives de larves de *C. suppressalis* fou l'inhibidor Leupeptin (5% d'activitat residual en presència de l'inhibidor). El seguiren els inhibidors Pepstatin (amb un 31,5% d'activitat residual), l'SBBI (41,4% d'activitat residual) i l'inhibidor Chymostatin (amb un 54,3% d'activitat residual). La incubació amb l'inhibidor MPI, resultà en una activitat residual del 60%. L'inhibidor PCI presentà una capacitat d'inhibició menor (84,8% d'activitat residual en presència de l'inhibidor). Finalment, els inhibidors EDTA i Elastatinal presentaren un efecte inhibidor quantitativament poc important sobre les proteases digestives de *C. suppressalis*.

Aquests resultats apunten a que, en el sistema proteolític digestiu de larves de *Chilo suppressalis*, alimentades en plantes d'arròs, hi participen activitats proteolítiques susceptibles d'inhibició per part d'inhibidors de serinaproteases i aspartilproteases. Concretament, i dins la família de les serinaproteases, en el sistema digestiu de *C. suppressalis* participen molt probablement serinaproteases del tipus tripsina i quimotripsina. Les proteases del tipus elastasa són quantitativament menys importants. En aquest estudi,

no s'ha assajat la participació de cisteïnaproteases (p.ex. utilitzant *cistatina*), aspecte que queda doncs, pendent encara.

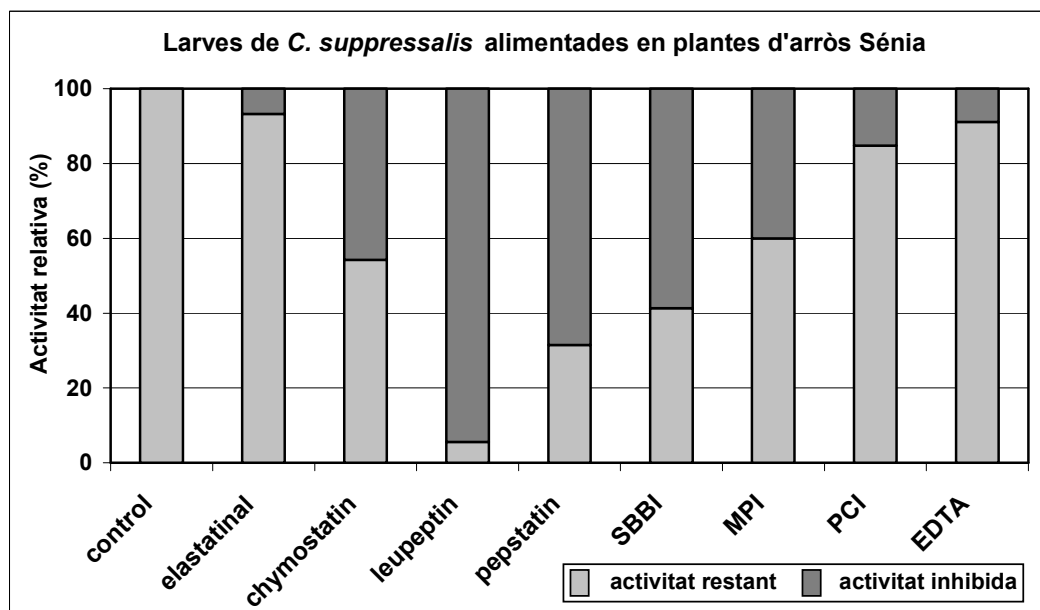


Figura 86: Efecte d'inhibidors de proteases en la sobre les activitats proteolítiques digestives de larves de *Chilo suppressalis*. S'utilitzaren 3 μ g d'extracte de proteïnes provinents d'intestins de larves alimentades en plantes d'arròs Sènia no transformades, i el substrat general proteic caseïna-resorufin. Els valors s'expressen com a percentatge de l'activitat de l'extracte control sense inhibidor: en color clar s'indica el % activitat residual, i en fosc el % d'activitat inhibida. Els inhibidors i concentracions utilitzades foren: Elastatinal (0,1mM), Chymostatin (0,1mM), Soybean Bowman-Birk Inhibitor (SBBI) (10 μ M), Leupeptin (100 μ M), Pepstatin (25 μ M), Maize Proteinase Inhibitor (MPI) (3,7 μ M), Potato Carboxipeptidase Inhibitor (PCI) (10 μ M) i EDTA (1mM). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig.

Per últim, mencionar que el grau d'inhibició que s'observa per l'inhibidor MPI és similar al que es produeix amb l'inhibidor Chymostatin. Es correspon doncs amb l'especificitat d'inhibició anteriorment demostrada per l'MPI contra activitats proteolítiques del tipus quimotripsina d'insectes lepidòpters (*Spodoptera littoralis*). No es descarta la possibilitat de que l'inhibidor MPI actuï també inhibint activitats proteolítiques del tipus elastasa, aspecte que, amb la informació disponible, no pot ser encara aclarit (la participació d'activitats elastasa és quantitativament poc important en el total d'activitats proteolítiques digestives de *Chilo suppressalis*).

De totes maneres, s'ha de ser molt prudent amb les conclusions que poden desprendre's d'aquest tipus d'estudis ja que:

a) Les propietats inhibidores de la majoria dels inhibidors de proteases s'han determinat amb proteases de mamífers.

b) De la informació disponible referent a les proteases digestives d'insectes (encara que sigui relativament escassa) es dedueix que hi ha diferències significatives entre insectes i mamífers (les característiques bioquímiques de les proteases d'ambdós grups són molt diferents).

I.5 EFECTE DE L'INHIBIDOR MPI EN LES ACTIVITATS PROTEOLÍTIQUES DIGESTIVES DE *Cacyreus marshalli*

En el decurs d'aquest treball va sorgir la possibilitat d'ampliar les aplicacions biotecnològiques del gen *mpi* per a la protecció de plantes ornamentals front insectes plaga.

Cacyreus marshalli és un lepidòpter que ha esdevingut, en molts pocs anys, una de les plagues més importants del gerani en la zona mediterrània (veure *Apartat 3.1* de la *Introducció*). En el present estudi es va assajar l'activitat inhibidora *in vitro* de l'inhibidor MPI front les activitats proteolítiques digestives de larves de *C. marshalli*, per determinar si el gen *mpi* és un bon candidat per a la millora de la resistència del gerani front aquesta important plaga, mitjançant transgènia.

I.5.1 pH òptim de les activitats proteolítiques digestives de *Cacyreus marshalli*

Els intestins foren extrets de larves de *Cacyreus marshalli* alimentades amb gerani, en el grup del Dr. J. Ferré de la Universitat de València. Emprant el mateix sistema de tampons discontinus utilitzat per als assaigs amb *Chilo suppressalis*, s'estudià el pH òptim de les activitats proteolítiques totals d'extractes digestius de *Cacyreus marshalli*. S'estudià el rang de pH comprès entre pH 6 i pH 12,5. La hidròlisi del substrat, caseïna-resorufin, resultà feble per sota de pH 8,5 així com per sobre de pH 11,5 i presentà un màxim a pH 10,0 amb el tampó glicina-NaOH, tal i com es pot veure a la *Figura 87*.

Tal com vàrem veure pel també lepidòpter *Chilo suppressalis*, el sistema digestiu de *C. marshalli* presenta activitats proteolítiques amb un òptim de pH alcalí, en aquest cas pH 10,0. Així doncs, tots els assaigs realitzats posteriorment amb extractes de digestius de *C. marshalli* foren realitzats amb el tampó glicina-NaOH pH 10,0.

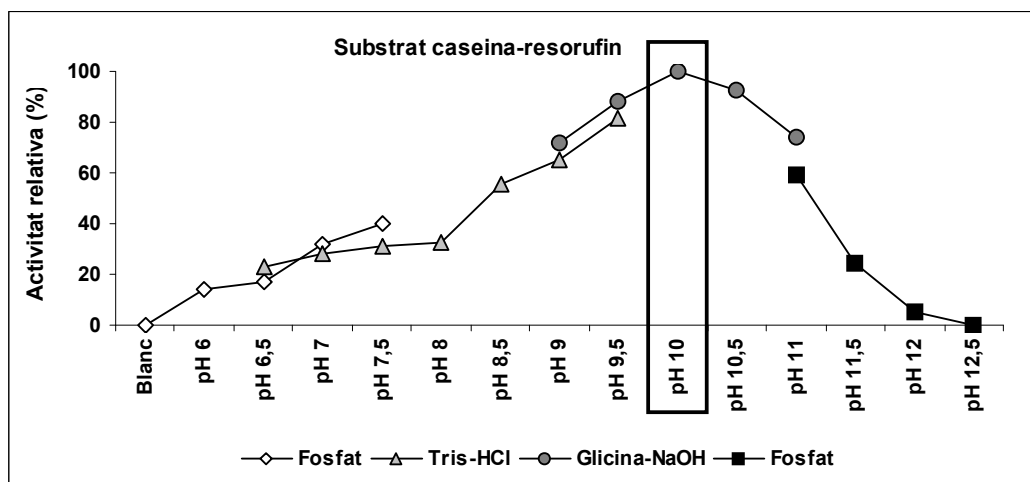


Figura 87: Efecte del pH en l'activitat proteolítica total d'extractes proteics d'intestins del lepidòpter *Cacyreus marshalli* emprant el substrat caseina-resorufin i un sistema de tampons discontinus. S'utilitzà 3 µg d'extracte d'intestins.

I.5.2 Efecte de l'inhibidor MPI sobre les activitats digestives de larves de *Cacyreus marshalli*

Primerament es va determinar el nivell d'activitat proteolítica total del tracte digestiu de *Cacyreus marshalli*. La Figura 88 n'il·lustra el resultat obtingut.

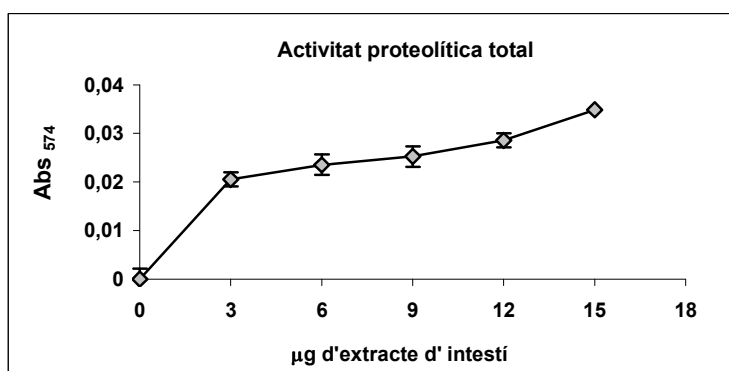


Figura 88: Activitat proteolítica d'intestins de larves de *Cacyreus marshalli* utilitzant el substrat caseina-resorufin. El tampó utilitzat fou glicina-NaOH pH 10,0.

El nivell de l'activitat proteolítica total que presenten els extractes d'intestí de *C. marshalli* fou molt més alt que l'observat per *Chilo suppressalis*. Els resultats es mostren a la Figura 89.

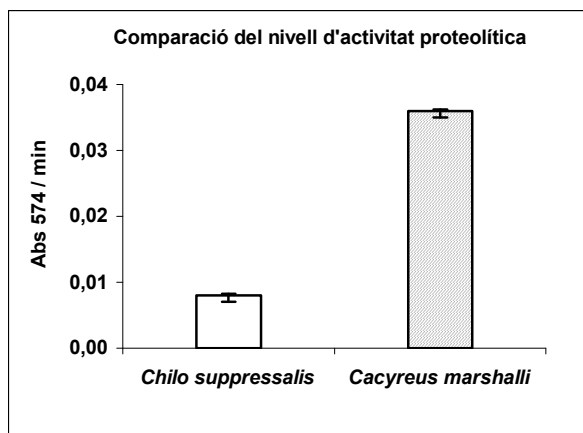


Figura 89: Comparació dels nivells d'activitat proteolítica en extractes proteics provinents d'intestins de *C. suppressalis* (alimentat en arròs Sènia) i de *C. marshalli* (alimentat en planta de gerani). Els tampons utilitzats són els que presentaren el pH òptim per a cada lepidòpter (pH 10,5 per a *C. suppressalis* i pH 10,0 per a *C. marshalli*). S'utilitzaren 15 µg d'extracte en ambdós casos.

S'estudià els efectes de l'inhibidor MPI (proteïna expressada en *E. coli*) en les activitats digestives de *Cacyreus marshalli*. La Figura 90-A mostra els resultats d'aquest experiment. L'activitat residual que s'observà en presència de 11 µg l'inhibidor MPI fou del 60-70% de l'activitat proteolítica total dels extractes digestius de *Cacyreus*.

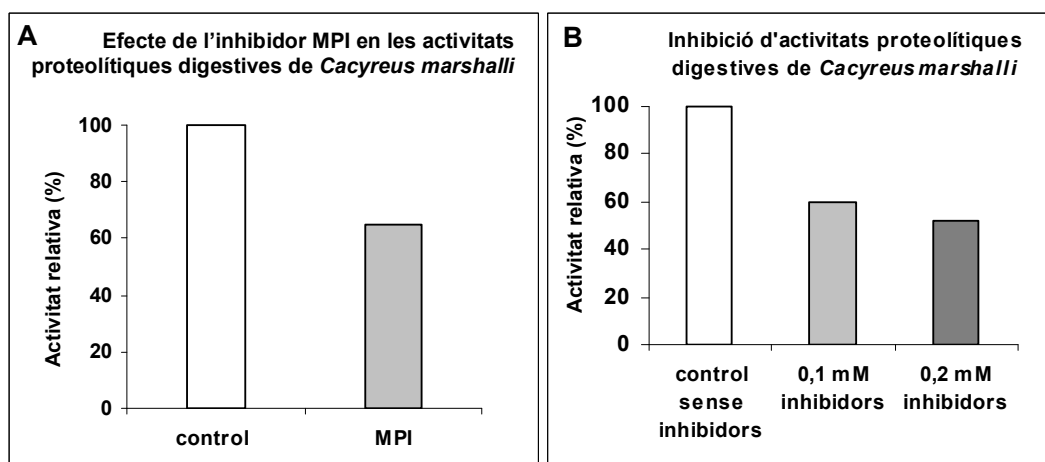


Figura 90: Inhibició de les activitats proteolítiques digestives presents en extractes d'intestins de *Cacyreus marshalli*, per l'inhibidor de proteases MPI. **A)** Es preincubaren 1,5 µg d'extracte d'intestins i 11 µg de proteïna MPI. **B)** Inhibició de les activitats proteolítiques d'extracte d'intestins de *Cacyreus marshalli*, pels inhibidors comercials Elastatinal i Chymostatin. Es preincubaren 3 µg d'extracte d'intestins amb les concentracions indicades d'inhibidors. El substrat utilitzat fou el substrat per a activitats proteàsiques caseïna-resorufin.

En els assaigs d'inhibició *in vitro* per MPI realitzats amb els extractes provinents d'intestins de larves de *C. marshalli*, la quantitat d'MPI per obtenir uns nivells d'inhibició similars als obtinguts pels altres dos lepidòpters estudiats (60%), fou molt més elevada. Donat que el nivell d'activitat proteolítica total és superior en *Cacyreus* que en *Chilo* (o

Spodoptera), no és sorprenent que sigui necessari una major quantitat d'MPI per a arribar a un mateix grau d'inhibició.

Per altra banda, utilitzant els inhibidors comercials de les activitats elastasa i quimotripsina, Elastatinal i Chymostatin respectivament, es va realitzar un assaig d'inhibició amb extractes de digestius de larves de *C. marshalli*. Els extractes foren preincubats amb una mescla dels dos inhibidors a una concentració final de cadascun d'ells de 0.1mM o 0.2mM. Com es pot observar a la *Figura 90-B*, l'activitat residual que s'observa en presència d'aquests inhibidors és del 50-60% de l'activitat proteolítica total.

Dels resultats obtinguts en els anteriors assaigs se'n desprèn que el tracte digestiu de les larves de *Cacyreus marshalli*, alimentades en gerani, és molt actiu en quant al nivell d'activitats proteolítiques; en condicions similars de preparació d'extractes proteics de digestius de *Cacyreus*, *Chilo* i *Spodoptera*, el nivell d'activitats proteolítiques que s'observa en els extractes de *Cacyreus* és molt superior al dels altres lepidòpters estudiats. Així mateix cal destacar que en el sistema proteolític digestiu de *C. marshalli* es detecten també activitats proteolítiques susceptibles d'inhibició per Chymostatin i Elastatinal (activitats del tipus quimotripsina i elastasa). Aquests resultats són comparables als obtinguts amb *Chilo* i *Spodoptera*. A més a més, els resultats obtinguts permeten concloure que una part important de l'activitat proteolítica total del tracte digestiu de *Cacyreus* és susceptible d'inhibició per la proteïna MPI. Aquests resultats foren la base de partida d'una línia de treball, actualment en curs en el laboratori, de transformació de gerani amb el gen *mpi* i protecció front *Cacyreus marshalli*.