

II. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA FRONT FITOPATÒGENS

II.1 ACTIVITAT ANTIFÚNGICA DE LA CECROPINA A FRONT FITOPATÒGENS

Els fongs fitopatògens són una altra de les principals causes de les pèrdues que es produeixen en els cultius d'interès agro-econòmic. En aquest treball ens hem interessat per l'estudi de les propietats antifúngiques de proteïnes o pèptids que participen en la resposta de defensa de diversos organismes front fitopatògens, així com per com la idoneïtat de la utilització dels seus corresponents gens per al desenvolupament de plantes resistents a fitopatògens mitjançant la transgènia. Més concretament, s'han estudiat les propietats antifúngiques de la cecropina A (pèptid que participa en la resposta immune d'insectes) i de la proteïna AFP (AntiFungal Protein) del fong del sòl *Aspergillus giganteus*.

En el cas del cultiu de l'arròs, el fong fitopatogen més important és *Magnaporthe grisea*, causant de la *Piriculariosi*, la malaltia fúngica més important dels arrossars mediterranis. Així mateix, *Fusarium moniliforme* (actualment anomenat *Fusarium verticillioides* (8é Workshop Internacional sobre *Fusarium*, Anglaterra, 1998)) és l'agent causant de malalties a gran nombre de collites de diferents cereals, inclòs l'arròs. L'oomicet *Phytophthora infestans* infecta diferents espècies de Solanàcies, com són el tomàquet i la patata.

II.1.1 Assaigs antifúngics *in vitro* amb cecropina A front *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*

Es realitzaren estudis *in vitro* per determinar la capacitat de la cecropina A (comercial) d'inhibir el creixement de *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*. Amb aquest objectiu, es prepararen suspensions d'espores de *Fusarium moniliforme* (soca aïllada de llavors de blat de moro a l'IBMB, CSIC, Barcelona) i de *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*, SP1, cedida pel Dr. Didier Tharreau, CIRAD-Montpellier) a una concentració de 10^5 i 10^6 espores/ml, respectivament. Les espores foren pregerminades en medi líquid PDB, en plaques de microtitulació. Després de 5h de pregerminació per *Fusarium*, i de 6h per *Magnaporthe*, s'afegiren alíquotes de cecropina A en quantitats creixents. Les plaques s'incubaren a temperatura ambient (*F. moniliforme*) o a 28°C (*M. grisea*).

Es feren lectures a 595nm, a diferents temps després de l'addició de cecropina A. La mesura de l'absorbència dóna una estimació del creixement del fong, permetent-nos així, l'obtenció de corbes dosi-resposta per determinar l'efecte de la cecropina A en el creixement dels fongs sota estudi. D'aquestes corbes es dedueix la capacitat d'una proteïna per a actuar com agent antifúngic, permetent obtenir els valors d'IC₅₀ i MIC. El valor IC₅₀ correspon a la concentració necessària d'un agent per assolir una inhibició del 50 % del creixement

fúngic. La MIC, o concentració mínima inhibidora, es defineix com a la concentració més baixa de l'agent que inhibeix completament el creixement fúngic.

La Figura 91 mostra l'efecte de concentracions creixents de cecropina A en el creixement de *Fusarium moniliforme*.

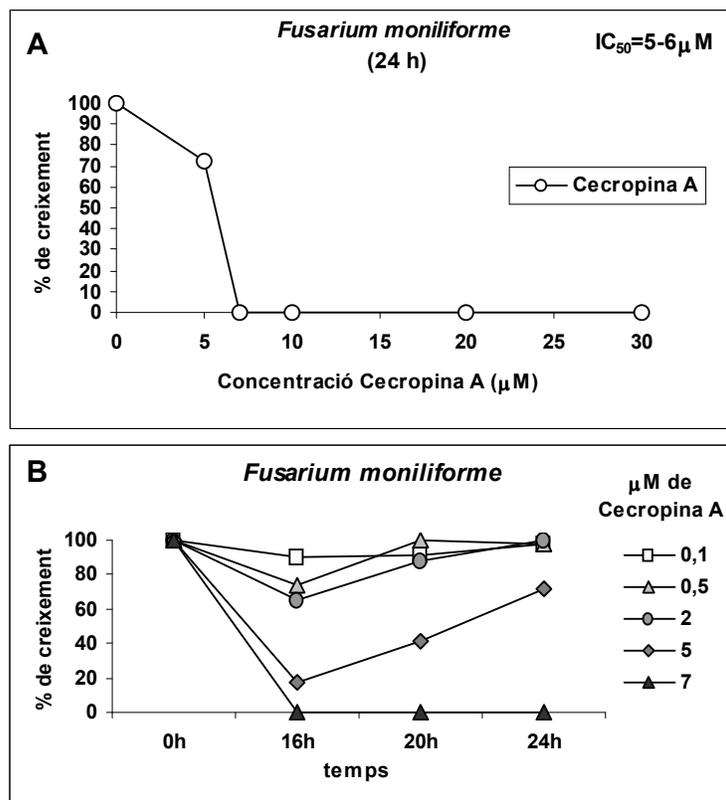


Figura 91: Activitat antifúngica *in vitro* de cecropina A front *Fusarium moniliforme*. A) Efecte de concentracions creixents de cecropina A sobre el creixement fúngic; les determinacions es realitzaren després de 24h d'incubació amb la cecropina A. B) Evolució de l'activitat antifúngica de cecropina A al llarg del temps. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense cecropina A (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

De la corba d'inhibició del creixement *in vitro*, obtinguda per *F. moniliforme* en presència de concentracions creixents de cecropina A, es dedueix els valors d' $IC_{50}=5-6 \mu M$ i de $MIC=7 \mu M$ (veure Figura 91-A). Per a concentracions inferiors al valor MIC ($7 \mu M$) es perd l'activitat antifúngica de la cecropina A, front *F. moniliforme*, al llarg del temps (veure Figura 91-A).

En el cas de *Magnaporthe grisea*, el valor IC_{50} de cecropina A que es deduí de la corba d'inhibició, es trobà en el rang de 3 a $4 \mu M$ (veure Figura 92-A).

A diferència del que s'observà en la inhibició del creixement de *F. moniliforme* per l'acció de la cecropina A, en el cas de *M. grisea* no assolí el 100% d'inhibició (com a mínim fins a la concentració més alta assajada en aquest treball, 15 μ M). A més a més, quant es continua el creixement de *M. grisea* fins a les 48h, s'observa una pèrdua de la capacitat inhibidora de la cecropina A a temps més llargs (48h, veure *Figura 92-B*).

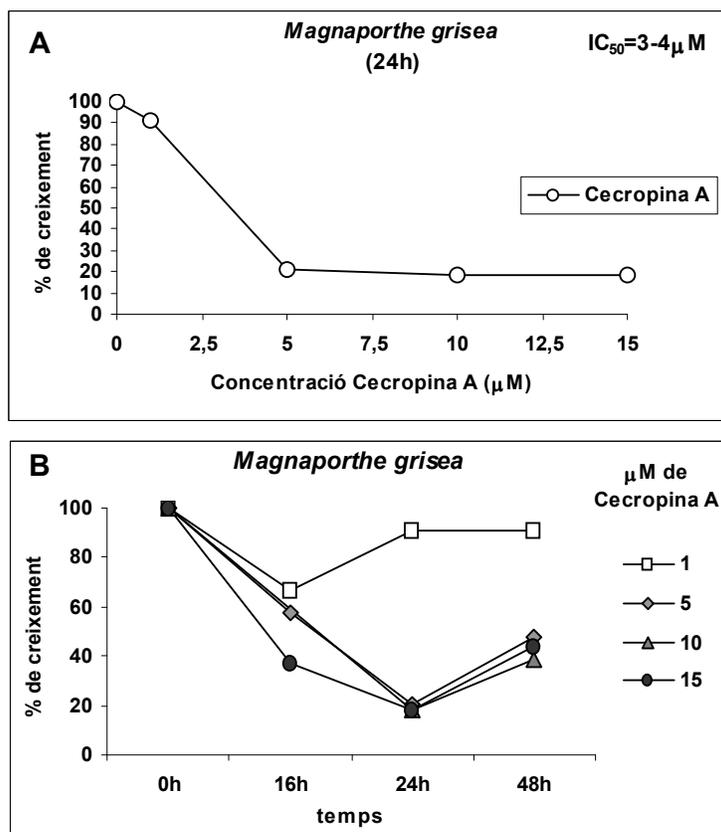


Figura 92: Activitat antifúngica *in vitro* de cecropina A front *Magnaporthe grisea*. A) Efecte de concentracions creixents de cecropina A sobre el creixement fúngic; les determinacions es realitzaren a les 24h d'incubació amb cecropina A. B) Evolució de l'activitat antifúngica de cecropina A al llarg del temps. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense cecropina A (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

Molts fongs fitopatògens, en les primeres etapes del procés de penetració del teixit vegetal al que infecten, envaeixen els espais intercel·lulars; d'aquí sorgeix l'interès, en transgènia per la millora de la resistència de plantes, que la proteïna o pèptid antifúngic es dirigeixi a l'espai extracel·lular, així l'activitat antifúngica no dependria de la lliure de la cèl·lula vegetal per a alliberar l'agent antifúngic.

L'expressió de proteïnes o pèptids antifúngics, dirigits específicament a l'espai extracel·lular, en plantes transgèniques com a estratègia per a la millora de la resistència a

fongs fitopatògens, planteja la necessitat de comprovar prèviament l'estabilitat d'aquestes proteïnes/pèptids front les possibles proteases existents en els fluids intercel.lulars de la planta. Així doncs, es realitzà un nou assaig *in vitro* per verificar si la inhibició del creixement de *F. moniliforme* amb cecropina A es mantenia estable en presència d'extractes proteics de fluids intercel.lulars d'arròs.

Els fluids intercel.lulars (ICF, intercellular fluid) s'extragueren de fulles de plantes d'arròs de 10 dies de la varietat Sénia. L'activitat proteàsica d'aquests fluids fou comprovada mitjançant l'assaig amb el substrat general per activitats proteolítiques, caseïna marcada amb resorufin. Aquests ICF d'arròs (40 µg) presentaren una activitat proteolítica equivalent a l'activitat caseinolítica descrita per aproximadament 50 ng de tripsina. Si la mostra d'ICF era preincubada 5 min a 100°C, l'activitat proteolítica desapareixia per complet.

La cecropina A es preincubà 30 min amb diferents quantitats d'ICF, i a continuació, es va realitzar l'assaig d'inhibició en plaques de microtitulació amb les mostres preincubades, tal i com s'ha presentat anteriorment. L'observació del creixement fúngic a les 24h, ens va permetre constatar que l'activitat antifúngica de la cecropina A no s'ha vist afectada per la incubació amb fluids intercel.lulars d'arròs. La *Figura 93* mostra els resultats obtinguts en aquest assaig.

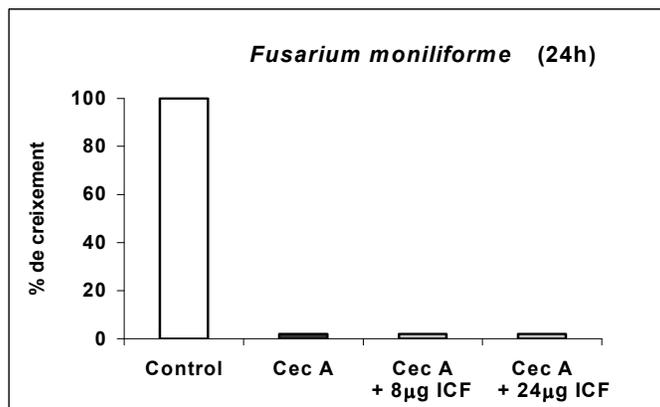


Figura 93: Activitat antifúngica de la cecropina A preincubada amb fluids intercel.lulars d'arròs (ICF) front *Fusarium moniliforme*. S'emprà una concentració de 10 µM de cecropina A preincubada amb 0, 8 o 24 µg d'ICF. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense cecropina (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

Donat que la cecropina A manté les seves propietats antifúngiques en presència d'ICF d'arròs *a priori*, es pot suposar que el gen de la cecropina A és un candidat potencial per a ser expressat en plantes d'arròs, amb les modificacions pertinents perquè el seu producte gènic, la cecropina A, sigui dirigit a l'espai extracel.lular. Tanmateix, cal esmentar que aquest resultat no garanteix l'estabilitat de la cecropina A *in vivo*, és a dir, expressada en plantes

transgèniques, ja que els fluids intercel·lulars obtinguts a partir de fulles d'arròs no són el reflex exacte de la situació real que es dona *in planta*.

II.1.2 Assaigs antifúngics *in vitro* amb pèptids curts derivats de la cecropina A

Anteriorment, en el nostre laboratori es va assajar l'activitat antifúngica de diferents pèptids derivats de la cecropina A vers diferents fongs fitopatògens (Cavallarin *et al.*, 1998). Els pèptids foren sintetitzats pel Dr. David Andreu (Universitat Pompeu Fabra, Dept. Ciències Experimentals i de la Salut). Aquests pèptids, de menor talla que la cecropina A, corresponien a la regió N-terminal de la cecropina A. En el present treball, ens vàrem centrar en determinar l'activitat front *F. moniliforme* i *M. grisea* del pèptid Pep3 (11-mer derivat de la regió N-terminal de la cecropina A, amb la substitució de dos aminoàcids (veure *Introducció*)), així com al Trímer-Pep3 que resulta de la unió de tres monòmers Pep3 a través d'una seqüència espaiadora AGPA (seqüència espaiadora que no trenca l'estructura del monòmer). En la *Figura 94* es mostren les seqüències d'aminoàcids del pèptid Pep3 i del seu trímer.

Cecropina A	KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK
Pep3	WKLFKKILKVL
Trímer-Pep3	WKLFKKILKVLAGPAWKLFKKILKVLAGPAWKLFKKILKVL

Figura 94: Seqüència d'aminoàcids de la cecropina A i dels pèptids sintètics derivats, Pep3 i el seu trímer. Els requadres negres ressalten les substitucions introduïdes als pèptids sintètics. En blanc, seqüència espaiadora AGPA del trímer-Pep3.

Així doncs, es realitzaren estudis *in vitro* per determinar la capacitat del pèptid sintètic Pep3 i del seu trímer, el Trímer-Pep3, d'inhibir el creixement dels fongs fitopatògens *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*. Seguint el procediment descrit anteriorment, espores de *Fusarium moniliforme* (soca CSIC, Barcelona) i de *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*, SP1), foren pregerminades en PDB, en plaques de microtitulació, per un període de 5h i 6h, respectivament. Seguidament s'afegiren diferents concentracions del pèptid Pep3 o del Trímer-Pep3 i s'incubaren a temperatura ambient per *Fusarium*, i a 28°C en el cas de *Magnaporthe*. Es féu un seguiment del creixement dels fongs per espectroscòpia i s'obtingueren les corbes de dosi-resposta que es mostren a les *Figures 95* i *96*.

Per *Fusarium moniliforme* (veure *Figura 95*), les corbes d'inhibició del creixement després de 24h d'incubació amb el pèptid Pep3 o amb el seu trímer, donaren uns valors IC₅₀

molt similars, en el rang de 5 μ M a 7 μ M. Aquest resultats indiquen que l'activitat antifúngica del trímer és igual a la del monòmer Pep3.

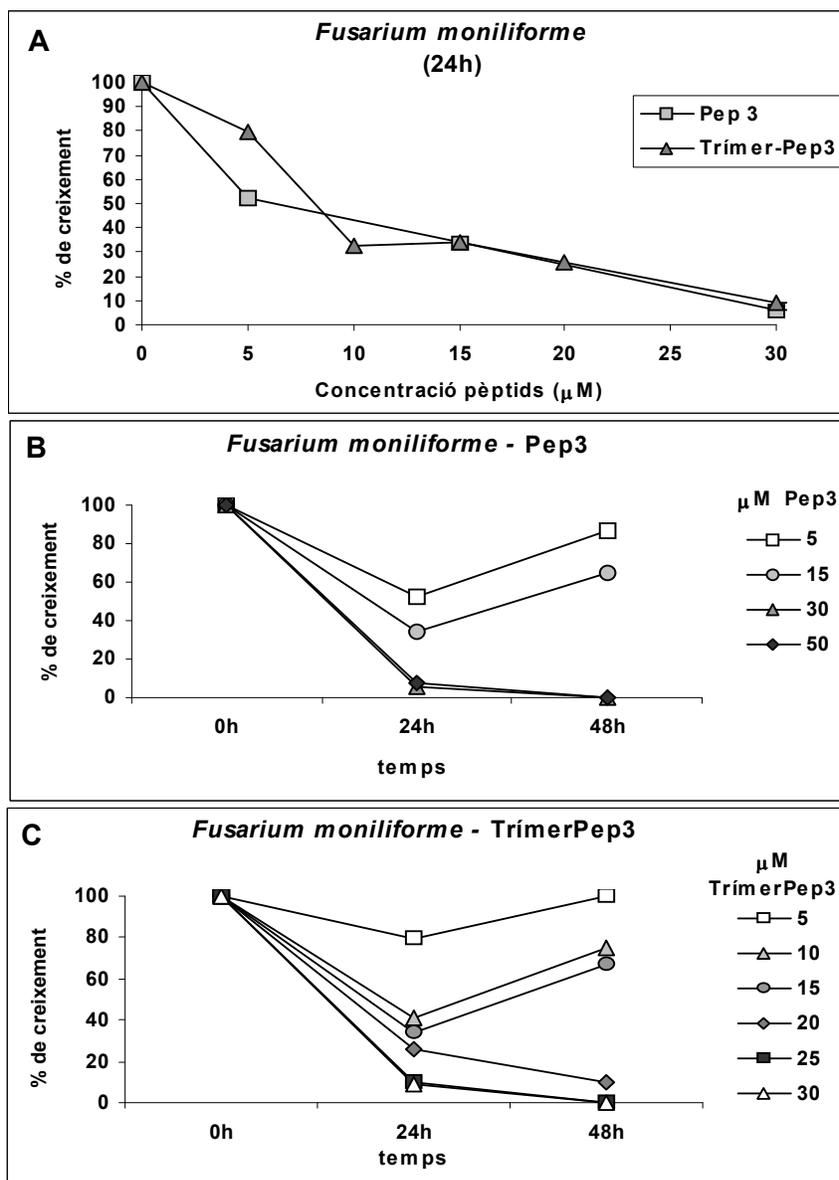


Figura 95: Activitat antifúngica *in vitro* del pèptid sintètic Pep3 i el Trímer-Pep3 front *Fusarium moniliforme*. A) Efecte de concentracions creixents de Pep3 i de Trímer-Pep3 sobre el creixement fúngic; les determinacions es realitzaren després de 24h d'incubació. B) Evolució de l'activitat antifúngica del pèptid Pep3 al llarg del temps. C) Evolució de l'activitat antifúngica del Trímer-Pep3 al llarg del temps. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense pèptids (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

El valor MIC per a la inhibició del creixement de *F. moniliforme* mitjançant el pèptid Pep3 fou 30 μ M; a aquesta concentració la potència antifúngica d'aquest pèptid no disminueix al

llarg del temps (Figura 95-A i B). Per al Trímer-Pep3, la concentració mínima inhibidora fou 25 μ M (Figura 95-C).

Els estudis d'inhibició del creixement per el Pep3 o per al Trímer-Pep3 es realitzaren també amb *Magnaporthe grisea*. De les corbes d'inhibició del creixement de *Magnaporthe grisea in vitro*, se'n desprèn que es requereixen concentracions de Pep3 d'aproximadament 20 μ M per a obtenir el 50% inhibició del creixement de fúngic (valor IC₅₀), i de 40 μ M per a la inhibició total del creixement. Contràriament, el Trímer-Pep3 no presentà cap activitat antifúngica contra *Magnaporthe grisea*. Aquest resultat es mostren a la Figura 96.

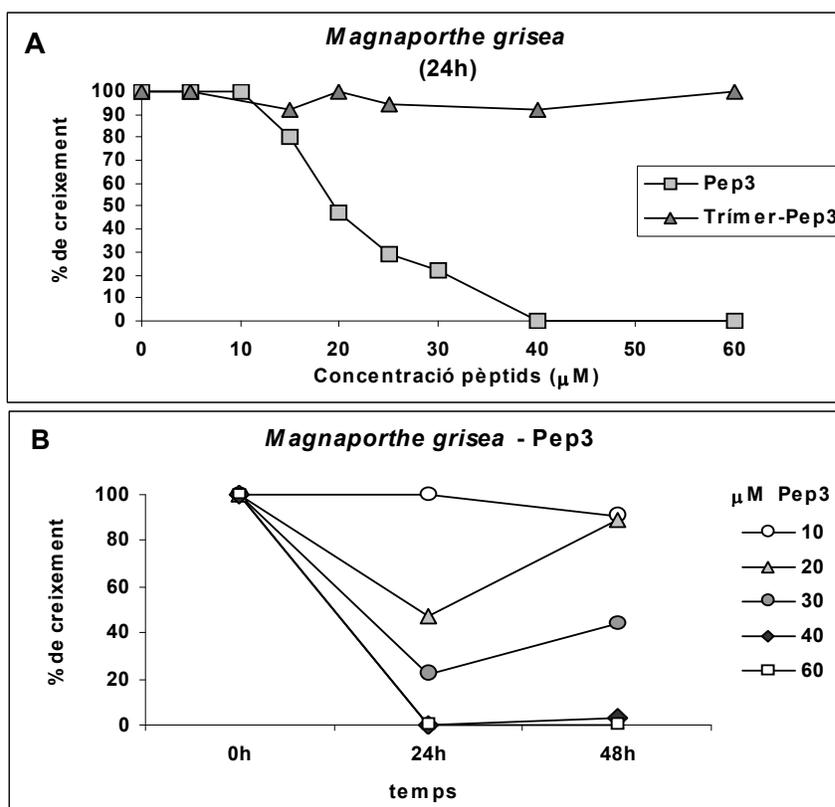


Figura 96: Activitat antifúngica *in vitro* del pèptid sintètic Pep3 i el Trímer-Pep3 front *Magnaporthe grisea*. A) Efecte de concentracions creixents de Pep3 i de Trímer-Pep3 sobre el creixement fúngic; les determinacions foren realitzades després de 24h d'incubació. B) Evolució de l'activitat antifúngica del pèptid Pep3 al llarg del temps. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense pèptids (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

Els assaigs realitzats permeten concloure que, tant la cecropina A com els pèptids Pep3 i Trímer-Pep3, presenten activitat antifúngica *in vitro* contra els fongs fitopatògens *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*. En la inhibició del creixement *in vitro* de *Fusarium*, els valors de l'IC₅₀ obtinguts pels tres pèptids és similar (5-7 μ M). Per altra banda, les concentracions MIC obtingudes variaren segons el pèptid utilitzat: per a la cecropina A el

valor MIC obtingut fou el més baix ($7\mu\text{M}$), mentre que pels pèptids derivats d'ella el valor MIC fou més elevat, essent de $30\mu\text{M}$ per el pèptid Pep3 i de $25\mu\text{M}$ pel seu trímer. Així mateix, la realització de l'assaig d'activitat antifúngica *in vitro* de la cecropina A en presència de fluids intercel·lulars d'arròs, permet concloure que aquest pèptid no perd la seva activitat antifúngica contra *Fusarium moniliforme* en presència d'ICF d'arròs.

Pel que fa a l'activitat antifúngica d'aquests tres compostos front el fong *Magnaporthe grisea*, podem concloure que tant la cecropina A com el pèptid curt Pep3 presenten activitat inhibidora del creixement d'aquest fong; contràriament, el Trímer-Pep3 no presentà activitat antifúngica contra el creixement de *M. grisea*.

II.2 ACTIVITAT ANTIFÚNGICA DE LA PROTEÏNA AFP (AntiFungal Protein) D'*Aspergillus giganteus* FRONT FITOPATÒGENS

II.2.1 Efecte de la proteïna AFP en el creixement *in vitro* de *Fusarium moniliforme*, *Magnaporthe grisea* i *Phytophthora infestans*

El fong *Aspergillus giganteus* produeix i secreta una proteïna AFP (AntiFungal Protein), de la que s'havia descrit que presenta activitats antifúngiques front a fongs filamentosos (Nakaya *et al.*, 1990; Lacadena *et al.*, 1995). Es varen estudiar les propietats antifúngiques de la proteïna AFP contra fongs i oomicets fitopatògens. La proteïna AFP ens fou facilitada pel grup del Dr. A. Martínez del Pozo (Universitat Complutense, Madrid), en el laboratori del qual, s'han realitzat amplis estudis a nivell estructural d'aquesta proteïna.

Breument, el procés que es segueix per a l'obtenció de la proteïna AFP és el que s'explica a continuació. La proteïna AFP és produïda, en el laboratori del Dr. A. Martínez del Pozo, a partir de cultiu líquid d'*Aspergillus giganteus* (mantingut a 30°C); després de 80-100h de fermentació, la proteïna és purificada a partir del medi extracel·lular d'*A. giganteus*. La purificació és duta a terme mitjançant una cromatografia de penetrabilitat en *Biogel P10*, seguida d'una nova cromatografia amb una columna *Sephadex G-65* equilibrada en 0.1M d'àcid acètic (Lacadena *et al.*, 1995). La proteïna fou analitzada electroforèticament i la puresa de la preparació confirmada, mitjançant anàlisis d'aminoàcids, abans de ser utilitzada en els assaigs d'inhibició del creixement de fongs.

S'utilitzà l'assaig d'inhibició del creixement fúngic en plaques de microtitulació amb la proteïna AFP purificada. Així doncs, es pregerminaren espores dels fongs *Fusarium moniliforme* (soca CSIC, Barcelona) i *Magnaporthe grisea* (soca SP1, cedida pel Dr. D. Tharreau, CIRAD, Montpellier), i de l'oomicet *Phytophthora infestans* (soca 149/98 cedida pel Dr. J.I. Ruiz de Galarreta, Centro Arkaute, Vitòria) important patògen de la patata i altres solanàcies.

Després d'un període d'incubació a la temperatura adequada per a la pregerminació de cada fong (temperatura ambient per *Fusarium*, 28°C per *Magnaporthe* i 18°C per l'oomicet *Phytophthora*) s'afegiren quantitats creixents de la proteïna AFP i es feu el seguiment del creixement fúngic, mitjançant espectroscòpia, al llarg del temps. Les corbes dosi-resposta per la proteïna AFP obtingudes en aquests assaigs es mostren en la *Figura 97*.

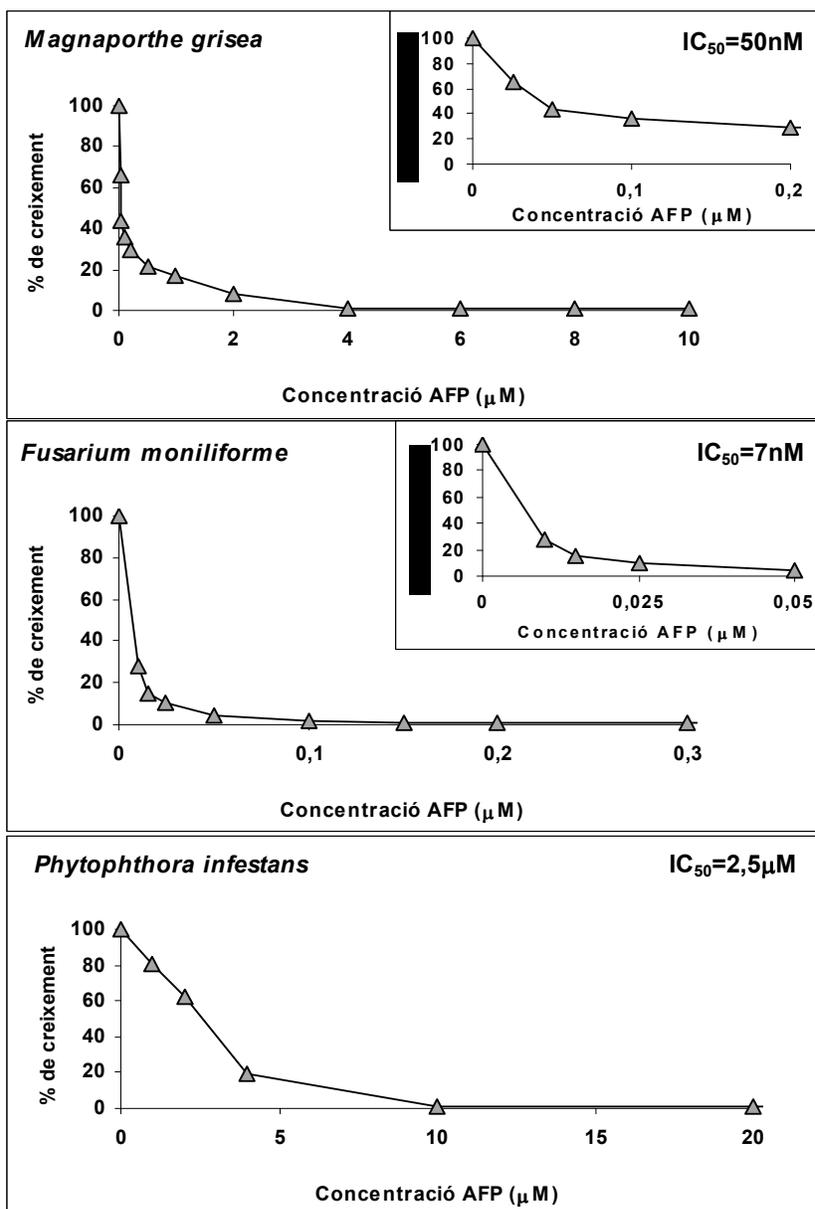


Figura 97: Activitat antifúngica *in vitro* de la proteïna AFP front els fongs *Magnaporthe grisea*, *Fusarium moniliforme*, i l'oomicet *Phytophthora infestans*. El creixement fúngic s'expressa com a % del creixement del cultiu control sense AFP (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%. Les dades corresponen a 24h d'incubació.

D'aquests corbes d'inhibició se'n pogueren deduir les concentracions IC_{50} per als diferents patògens assajats. Així es constatà que, després de 24h d'incubació, una concentració considerablement baixa com és 50nM d'AFP era suficient per a la inhibició d'un 50% del creixement de *M.grisea* (IC_{50}). Així mateix, una concentració de 7nM era suficient per a la inhibició del 50% del creixement del fong *F.moniliforme*, que resultà ser el patogen més sensible a l'AFP dels estudiats. El creixement de l'oomicet *P. infestans* es veu afectat en menor grau per la presència d'AFP, essent la seva IC_{50} de 2,5 μ M.

En les gràfiques de la *Figura 98* es mostra l'evolució, al llarg del temps, de la inhibició del creixement fúngic en presència de diferents concentracions d'AFP.

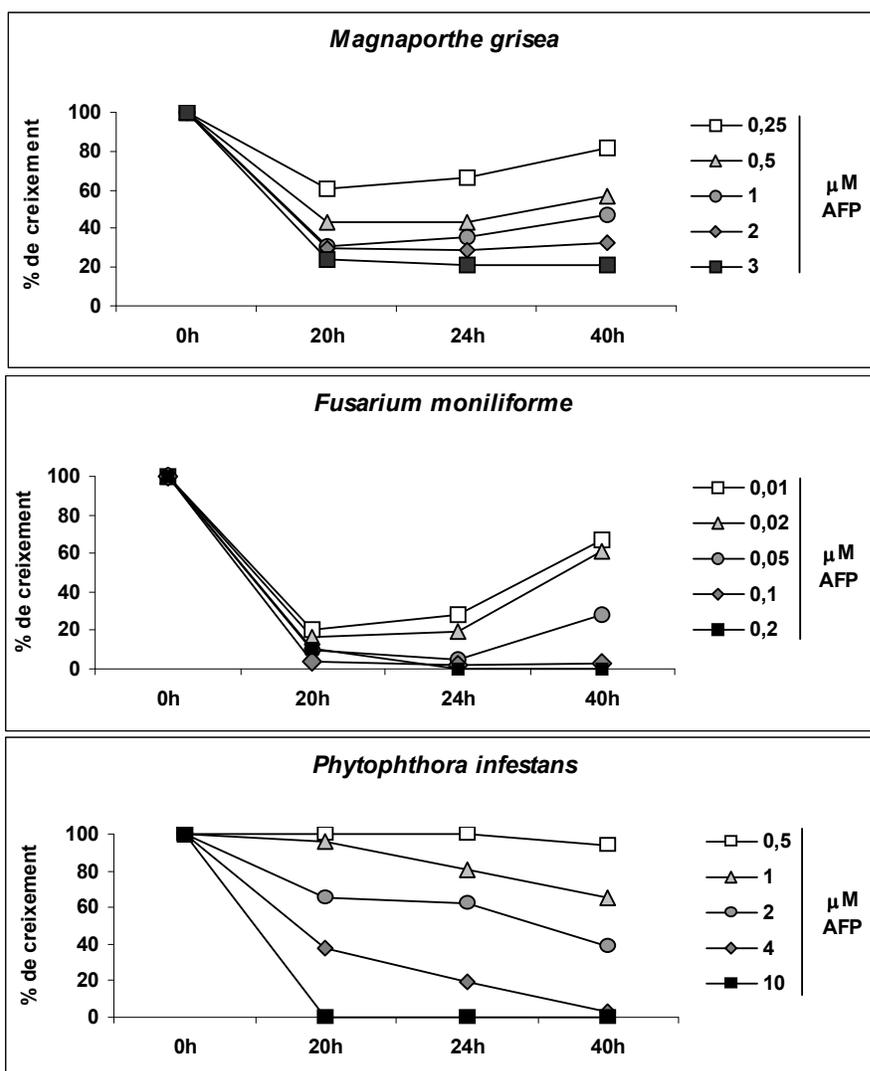


Figura 98: Evolució de l'activitat antifúngica *in vitro* de l'AFP front *Magnaporthe grisea*, *Fusarium moniliforme* i *Phytophthora infestans* al llarg del temps. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense AFP (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

Així els valors MIC per a la inhibició dels fongs *M. grisea*, *F. moniliforme* i per l'oomicet *P. infestans* foren 4 µM, 100nM i 10 µM, respectivament. En el cas de *M. grisea* no s'observà inhibició total (20% del creixement residual que es mantingué fins, com a mínim, a les 40h).

Els cultius fúngics crescuts en presència de la proteïna AFP també foren analitzats mitjançant microscopia. Els canvis morfològics en *M. grisea*, *F. moniliforme* i en l'oomicet *P. infestans* induïts per la presència de la proteïna AFP es presenten en la *Figura 99*.

Magnaporthe grisea en medi PDB control (A), presentà micelis expandits amb hifes llargues i primes. Contràriament, en presència d'AFP, *Magnaporthe* desenvolupà hifes curtes i gruixudes amb abundants septes, així mateix gran nombre d'hifes presentaven la zona apical constreta. També s'observà que els micelis es ramificaven anormalment i es condensaven.

Fusarium moniliforme després de 24h de creixement en presència d'AFP, presentava una morfologia semblant a la descrita per *M. grisea*: hifes amb abundants septes i ramificacions curtes.

Els canvis morfològics més importants que s'apreciaren en el creixement de l'oomicet *Phytophthora infestans* foren la ramificació anormal de les hifes, així com la inducció de la formació d'espangis.

II.2.2 Efecte de la proteïna AFP en el creixement *in vitro* d'altres fongs fitopatògens

Es va determinar la capacitat de la proteïna AFP d'*Aspergillus* per a inhibir el creixement *in vitro* d'altres fongs fitopatògens. Els fongs utilitzats en aquest estudi foren *Fusarium culmorum*, patogen del blat, la civada i l'ordi (Institut de Patologia Vegetal, Facultat d'Agricultura de Torino, Itàlia); *Fusarium proliferatum*, patogen de l'arròs i del blat de moro (soca 53N, cedit pel Dr. Vicente Sanchis, Universitat de Lleida); *Fusarium lateritium*, patogen del blat de moro, el cotó i la soja (Institut de Patologia Vegetal, Facultat d'Agricultura de Torino, Itàlia); *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (MUCL 38936, Bèlgica), patogen del tomàquet i *Microdochium nivale* (abans anomenat *Fusarium nivale*) patogen del blat, la civada i l'ordi (Institut de Patologia Vegetal, Facultat d'Agricultura de Torino, Itàlia). Aquests fongs fitopatògens foren crescuts en presència de diferents concentracions d'AFP. Les corbes dosi-resposta obtingudes es presenten a la *Figura 100*.

Malgrat s'observaren diferències en la susceptibilitat dels diferents fongs, tots es varen veure afectats, en major o menor grau, per la presència de la proteïna AFP.

Així mateix, es realitzà un assaig antifúngic *in vitro* amb AFP amb una altra espècie del gènere *Magnaporthe*, *Magnaporthe salvinii* (*Sclerotium oryzae*; soca ES500, cedida pel Dr. Didier Tharreau, CIRAD, Montpellier), també patogen dels arrossars (veure *Figura 101*).

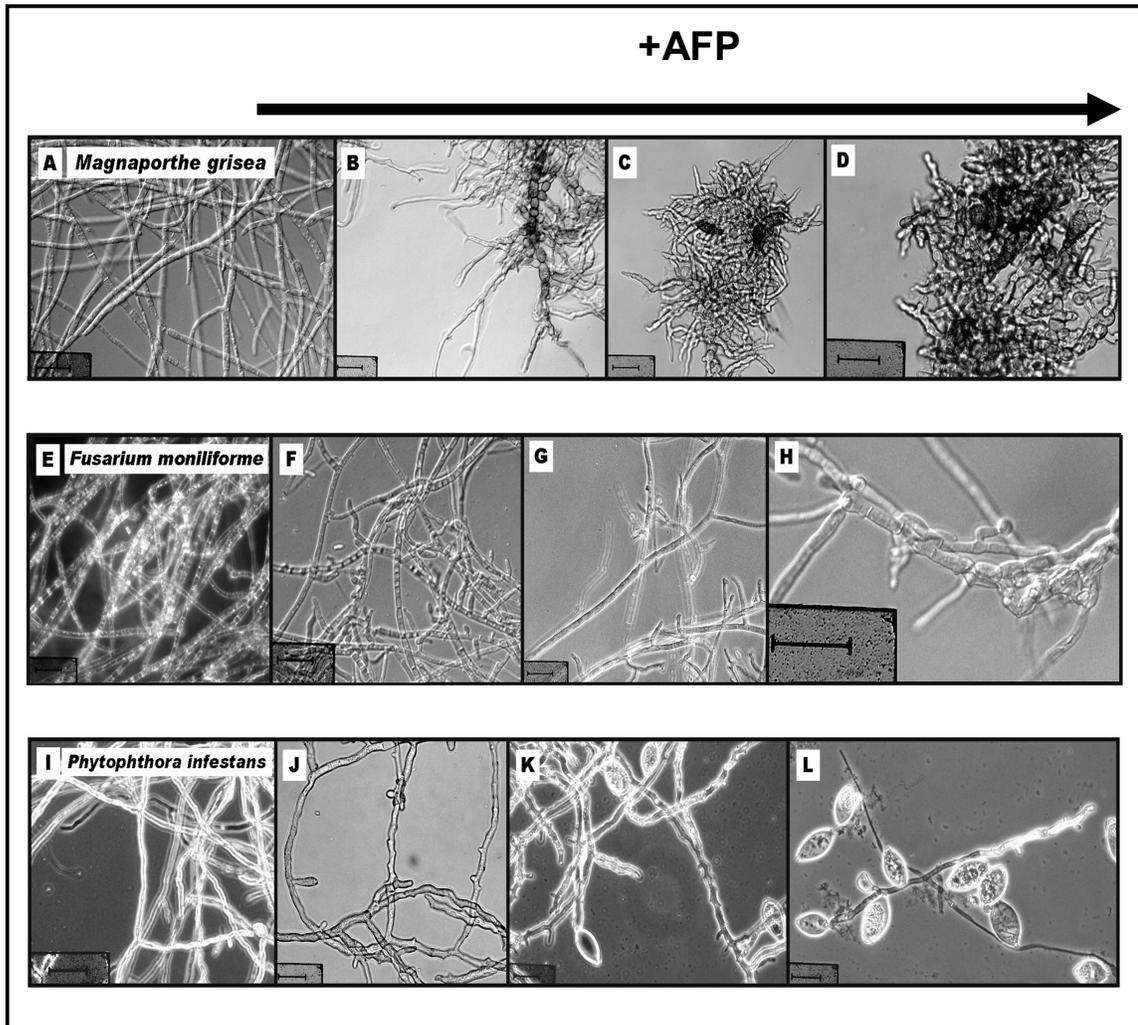


Figura 99: Canvis en la morfologia de les hifes dels fongs *Magnaporthe grisea*, *Fusarium moniliforme* i de l'oomicet *Phytophthora infestans* causats per la proteïna AFP d'*Aspergillus giganteus*. *Magnaporthe grisea* crescut en medi PDB sense AFP (A) o en presència d'AFP a concentracions de 25 nM (B), 100nM (C), i 500nM (D). *Fusarium moniliforme* crescut en medi PDB sense AFP (E) o en presència d'AFP a concentracions de 50 nM (F), 300 nM (G) i 1 μ M (H). *Phytophthora infestans* crescut en medi PDB sense AFP (I) o en presència d'AFP a concentracions de 50 nM (J), 300 nM (K) i 1 μ M (L). Les imatges corresponen a un període d'incubació de 24h. (Barres = 40 μ m).

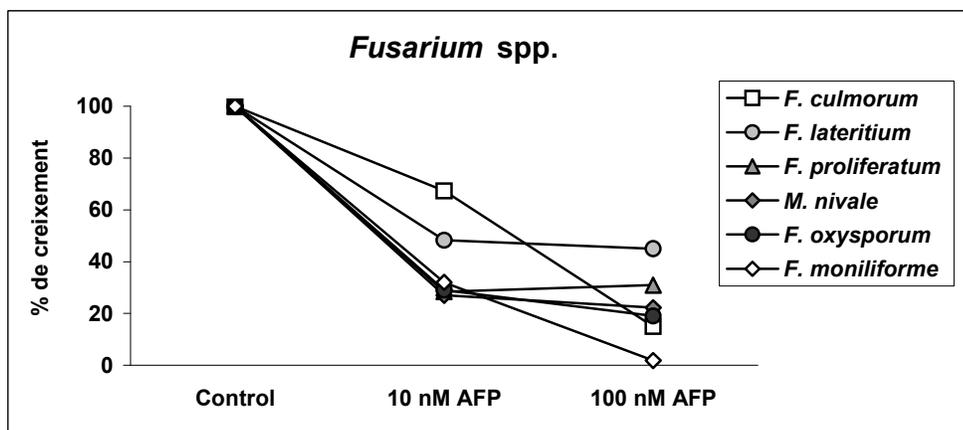


Figura 100: Activitat antifúngica *in vitro* de la proteïna AFP front diferents espècies de *Fusarium*. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense AFP (100%) determinat a les 24h d'incubació. Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

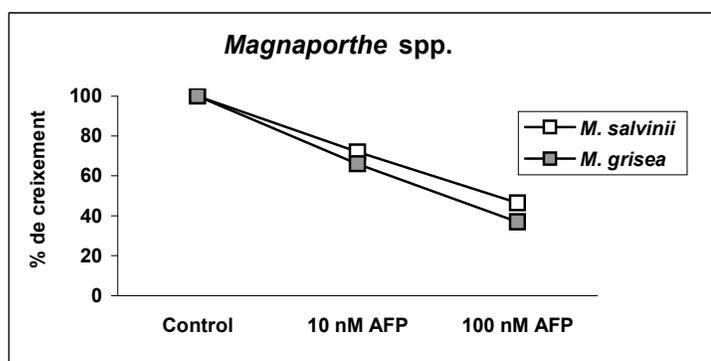


Figura 101: Activitat antifúngica *in vitro* de la proteïna AFP front *Magnaporthe grisea* i *Magnaporthe salvinii*. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense AFP (100%) determinat a les 24h d'incubació. Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

Tal com es pot observar en la *Figura 101*, el creixement de *Magnaporthe salvinii* i de *Magnaporthe grisea* es van veure afectats de manera semblant per la proteïna AFP.

Els resultats fins aquí presentats, varen demostrar les propietats antifúngiques tant de la cecropina A (com del pèptid sintètic Pep3 derivat de la mateixa), com de la proteïna AFP d'*Aspergillus giganteus*. Per a determinar un possible efecte additiu, sinèrgic o antagònic entre la proteïna AFP i el pèptid Pep3, es realitzaren assaigs *in vitro* combinant la proteïna AFP i el pèptid Pep3, a concentracions corresponents a l'IC₅₀ de cadascun d'ells pel fong

Magnaporthe grisea. La Figura 102 mostra l'evolució al llarg del temps de la inhibició del creixement fúngic per a les diferents incubacions.

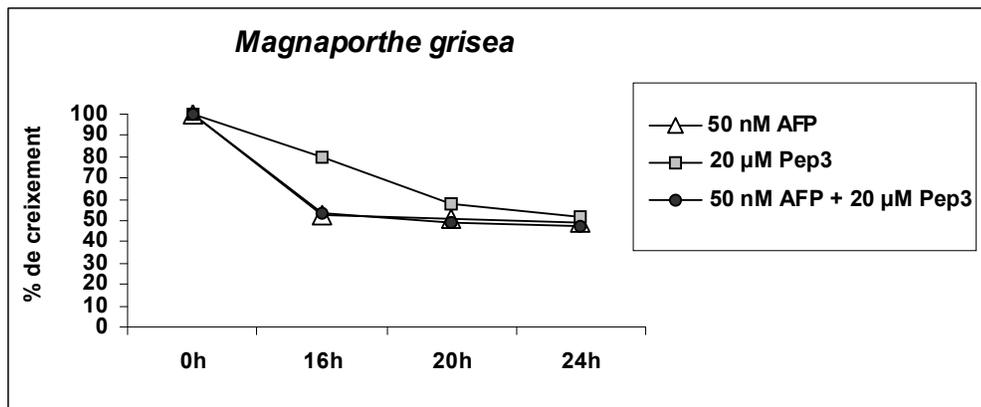


Figura 102: Evolució al llarg del temps de l'activitat antifúngica, *in vitro*, de la proteïna AFP i del pèptid sintètic Pep3 individualment, i de la combinació d'ambdós, front el fong *Magnaporthe grisea*. Les concentracions d'AFP i Pep3 corresponen a les IC₅₀ determinades anteriorment per a *M. grisea*. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense agents antifúngics (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 5%.

La combinació d'ambdós agents, AFP i Pep3 (50 nM per l'AFP i 20 μM pel Pep3), no va permetre observar un efecte additiu, sinèrgic o antagònic entre ambdós antifúngics. Així mateix, amb la combinació d'ambdós agents amb el fong *Fusarium moniliforme* (10 nM per l'AFP i 10 μM pel Pep3) tampoc va revelar cap efecte resultat de la combinació de la proteïna AFP i el pèptid sintètic Pep3 (resultats no mostrats).

II.2.3 Estabilitat de la proteïna AFP

Els estudis realitzats en el laboratori del Dr. A. Martínez del Pozo ja havien posat de manifest l'elevat grau d'estabilitat de la proteïna AFP i la seva resistència a la degradació per proteases.

En el present treball, es va estudiar l'estabilitat de la proteïna AFP en els assaigs antifúngics realitzats *in vitro*. A partir dels assaigs d'inhibició en plaques de microtitulació, es varen prendre mostres de cultius fúngics (de *Fusarium moniliforme* i de *Magnaporthe grisea*) després de 48h d'incubació de cada fong amb la proteïna AFP. Aquestes mostres foren precipitades mitjançant àcid tricloracètic al 15% i després d'una electroforesi desnaturalitzant en presència d' SDS, foren transferides a una membrana de PVDF. Seguidament es va fer

una immunodetecció mitjançant l'antisèrum anti-AFP (cedit pel Dr. A. Martínez del Pozo). El resultat de la immunodetecció es mostra a la Figura 103.

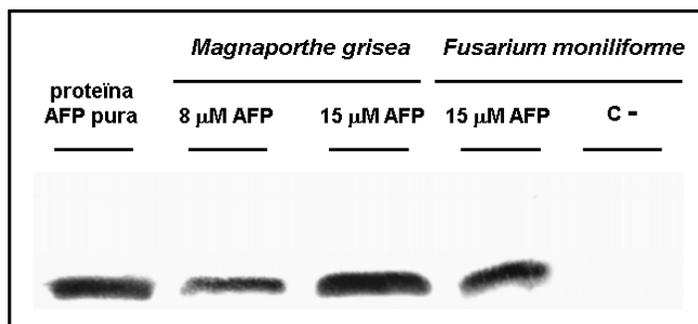


Figura 103: Immunodetecció de la proteïna d'*Aspergillus* AFP en cultius fúngics de *Magnaporthe grisea* i *Fusarium moniliforme*, crescuts en presència d'AFP. Les mostres foren preses després de 48h d'incubació de cada fong amb les concentracions de proteïna AFP que s'indiquen. Control de proteïna AFP pura, 18 μ g. C - , control negatiu, mostra presa del cultiu de *F. moniliforme* crescut sense presència d'AFP.

La proteïna AFP es mantenia estable després de 48h d'incubació per ambdós cultius fúngics assajats.

En un altre tipus d'estudis, es realitzaren nous assaigs antifúngics però en aquest cas, abans d'incorporar la proteïna AFP al cultiu fúngic, aquesta fou sotmesa a diferents tractaments. Aquests tractaments foren: escalfament a 100°C durant 10 min, incubació amb proteasa K (2h a 37°C) i incubació amb ditiotreitòl, DTT (2h a 37°C). A continuació es va determinar la capacitat d'inhibició del creixement de *Fusarium moniliforme*, després de sotmetre la proteïna AFP als citats tractaments. Es realitzaren els controls corresponents d'inhibició amb DTT i proteïnasa K. Els resultats es mostren a la *Taula 104*.

Tal i com s'havia descrit anteriorment (Lacadena *et al.*, 1995), la proteïna AFP presentà una alta estabilitat i resistència a la proteòlisi i a la desnaturalització, ja que conservà de la seva activitat antifúngica front *F. moniliforme* malgrat se la sotmetés a tractaments desnaturalitzants com escalfament a 100°C o incubació amb DTT o proteasa K.

Així mateix, la preincubació de la proteïna AFP amb antisèrum anti-AFP conduïa a la pèrdua d'activitat antifúngica (50%); no essent així quant la preincubació era amb antisèrum no immune. Així doncs, aquest assaig amb l'anticòs anti-AFP confirmava que la proteïna AFP d'*Aspergillus giganteus* era l'agent responsable de la inhibició del creixement fúngic.

Taula 104: Activitat antifúngica *in vitro* de la proteïna AFP front *Fusarium moniliforme*, després de ser sotmesa a diferents tractaments. Les determinacions es realitzaren després de 40h d'incubació de *Fusarium*. S'utilitzà una concentració d'AFP de 500nM, excepte en els experiments d'incubació amb anticossos (anti-AFP 1/50 i sèrum no immune 1/50) en els que s'utilitzà [AFP]=100nM. La proteïna AFP fou preincubada durant 1h a 100°C o incubada durant 2h a 37°C per als tractaments amb 2,5 mM ditiotreitòl (DTT) i amb 100 µg/ml de proteasa K. ⁽¹⁾ control per AFP+DTT; ⁽²⁾ control per AFP+proteïna K. El creixement fúngic s'expressa com a percentatge del creixement del cultiu control sense AFP (100%). Tres rèpliques foren realitzades per cada assaig; la desviació estàndard fou inferior al 4%.

Activitat antifúngica de la proteïna AFP després de diferents tractaments	
	% creixement fúngic
Control	100%
AFP	2,9%
AFP+100°C	2,2%
AFP+DTT	2,7%
DTT ⁽¹⁾	90,2%
AFP+ prot K	18%
proteasa K ⁽²⁾	100%
AFP+ anti-AFP	50%
AFP+ Ac no imm	10%

II.2.4 Viabilitat de protoplastes d'arròs en presència de la proteïna AFP

Havent-se comprovat ja l'elevada activitat antifúngica de la proteïna AFP (així com l'efectivitat contra diferents espècies de fongs i oomicets) juntament amb la seva estabilitat i resistència a la proteòlisi, calia determinar si la proteïna AFP presentava toxicitat per a cèl·lules vegetals, ja que això podria determinar la viabilitat de l'estratègia d'expressió del gen *afp* en plantes. Amb aquest objectiu s'aïllaren protoplastes d'arròs de la varietat Sènia (japonica) i s'incubaren 24h amb concentracions creixents de proteïna AFP. Com a controls es varen utilitzar protoplastes sense AFP i protoplastes danyats mecànicament mitjançant pipetejat enèrgic i congelació. La viabilitat de les cèl·lules d'arròs es comprovà mitjançant una tinció amb diacetat de fluoresceïna (FDA). Les molècules de FDA passen lliurement a través de la membrana plasmàtica, però només en cèl·lules (protoplastes) vives aquestes molècules poden ser hidrolitzades. La hidròlisi enzimàtica de les molècules dona

l'alliberament de fluoresceïna, que és fluorescent, polar i no pot travessar lliurement les membranes plasmàtiques que estiguin intactes. La retenció de la fluoresceïna dins de la cèl·lula depèn doncs de la integritat de la membrana plasmàtica (així, les cèl·lules fluorescents són viables). Mitjançant l'excitació amb llum ultraviolada, es poden distingir les cèl·lules fluorescents viables de les no viables. El resultat obtingut es resumeix en la *Taula 105*.

Taula 105: Viabilitat de protoplastes d'arròs després de 24h d'incubació amb 1µM, 5µM o 10µM de proteïna AFP. La densitat de les mostres fou ajustada a $1,6 \times 10^6$ protoplastes/ml i la viabilitat determinada per tinció amb FDA (diacetat de fluoresceïna). Es realitzaren dos experiments independents i tres rèpliques en cadascun d'ells.

Concentració d' AFP	Viabilitat dels protoplastes
Control sense AFP	100%
1 µM	91%
5 µM	98%
10 µM	96%
Control dany mecànic	45%

Així doncs, es pogué comprovar que la viabilitat de protoplastes d'arròs no disminuïa als ser incubats amb la proteïna antifúngica AFP (durant 24h a 28°C), tot i utilitzar-se concentracions d'AFP molt superiors a les IC_{50} determinades per a diferents fongs fitopatògens assajats.

II.2.5 Protecció de plantes d'arròs front *Magnaporthe grisea* mitjançant l'aplicació directe de proteïna AFP

Com a prova addicional, prèvia a la utilització del gen *afp* com a transgen per a la protecció de plantes d'arròs front fongs patògens, es varen inocular fulles (de manera localitzada) de plantes d'arròs de la varietat Sénia amb una suspensió d'espores de *Magnaporthe grisea* ($3,6 \times 10^5$ espores/ml + 0,02% Tween 20). Després de 24h de la inoculació, es va aplicar una solució de d'AFP (10µM) o d'H₂O en el cas dels controls, a les mateixes zones que havien sigut inoculades amb espores. Es va seguir la progressió dels símptomes de la infecció al llarg del temps. L'aspecte de les fulles d'arròs infectades després de 10 dies, no tractades o tractades amb AFP, es mostra en la *Figura 106*.

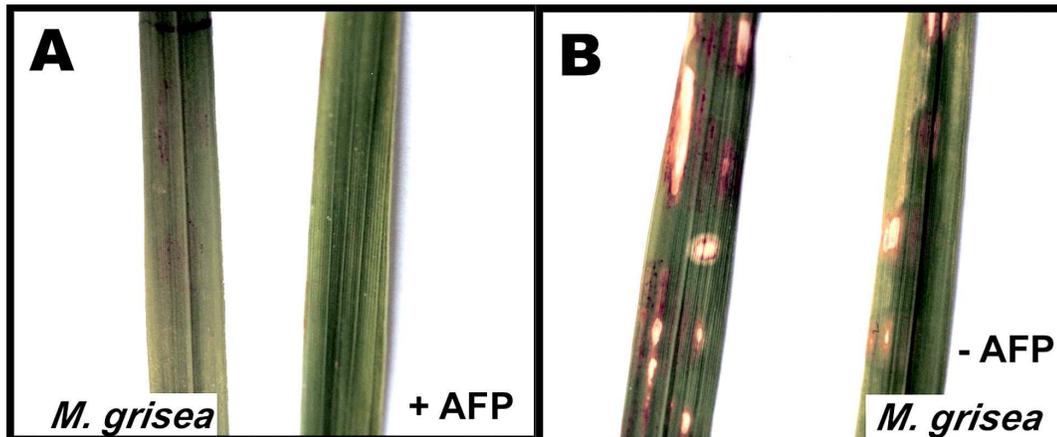


Figura 106: Protecció de plantes d'arròs contra *Magnaporthe grisea* mitjançant l'aplicació directa de proteïna AFP. Plantes d'arròs infectades amb *M. grisea* (20 µl d'una suspensió d'espores a $3,6 \times 10^5$ espores/ml) i posterior aplicació localitzada d'AFP a una concentració de 10 µM (A) o d'H₂O estèril (B). Fotografies preses 10 dies després de la infecció.

Com es pot observar a la *Figura 106*, les plantes inoculades i no tractades amb AFP presentaven un nombre significatiu de lesions causades per *Magnaporthe grisea*, mentre que les plantes d'arròs infectades i tractades tòpicament amb AFP no presentaven símptomes aparents de infecció a les seves fulles.

En un altre tipus d'assaig, plantes d'arròs de la varietat Sènia, a l'estadi de 4 fulles, foren ruixades amb una suspensió d'espores de *Magnaporthe grisea* fins a cobrir la superfície de les fulles amb petites gotes. Després de 24 hores, aquestes plantes foren de nou ruixades amb una solució aquosa de d'AFP (10 µM) o, en el cas de les plantes control amb H₂O estèril. Es feu el seguiment del desenvolupament dels símptomes d'infecció al llarg del temps. Als set dies després de la inoculació, s'observaren lesions en les fulles de les plantes control però no en les plantes tractades amb proteïna AFP (resultats no mostrats). Sis setmanes després de la inoculació, les plantes d'arròs Sènia no tractades varen morir, mentre que les plantes ruixades amb proteïna AFP no presentaven símptomes d'infecció per *M. grisea* i varen sobreviure (veure *Figura 107*).

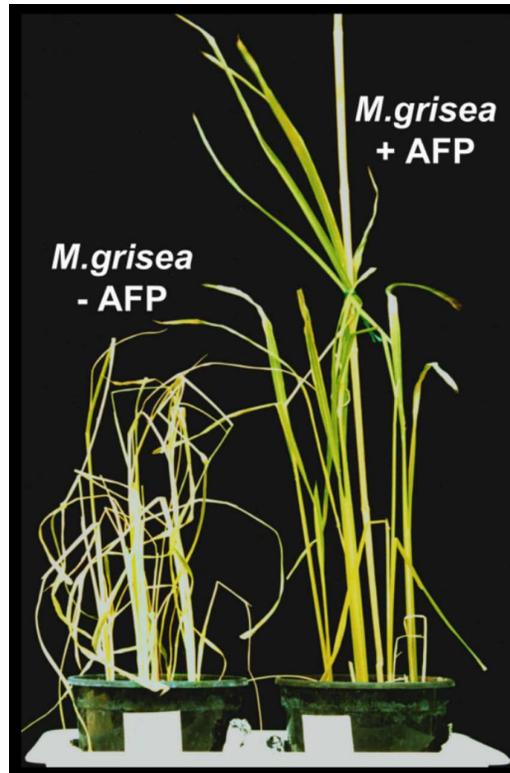


Figura 107: Tractament de plantes d'arròs infectades amb *Magnaporthe grisea* mitjançant l'aplicació directa de proteïna AFP. Plantes d'arròs infectades per aspersió amb *M. grisea* (suspensió a $2,5 \times 10^5$ espores/ml) i posterior aspersió amb AFP a una concentració de $10 \mu\text{M}$ (dreta), o d' H_2O estèril (esquerra). Fotografies preses 6 setmanes després de la infecció.

DISCUSSIÓ

I. EXPRESSIÓ DEL GEN *mpi* DE BLAT DE MORO EN PLANTES D'ARRÒS

Els insectes lepidòpters causen la pèrdua de les collites de diferents cultius d'arreu del món. Concretament, el lepidòpter *Chilo suppressalis* és la plaga més important a la que es veu confrontat el cultiu de l'arròs a nivell mundial. Actualment, el seu control es realitza fonamentalment mitjançant l'aplicació de pesticides químics. Aquests plaguicides, comporten riscos tant per a la salut humana (en l'aplicació per l'agricultor, i en l'ingesta pels consumidors) com per al medi ambient (aplicació massiva, poca especificitat per l'insecte problema, residus químics d'alta persistència en el medi ambient, contaminació de zones limítrofes i aqüífers...).

Gràcies al desenvolupament, durant les darreres dècades, de les tècniques de cultiu *in vitro* i de les tècniques de transformació de plantes (biolística i transformació per *Agrobacterium*), noves estratègies per a la protecció de les plantes front insectes plaga s'han anat desenvolupant i se n'ha obtingut resultats molt encoratjadors. Així, l'ús de la transgènia per a la millora de la resistència a plagues ofereix clares avantatges front els insecticides químics convencionals: una major especificitat per l'insecte problema, menor dependència de les condicions ambientals, la reducció de l'exposició de l'agricultor i del consumidor a productes tòxics o la reducció dels residus químics al medi ambient.

Entre aquestes estratègies, l'expressió de gens que codifiquen per inhibidors de proteases d'origen vegetal presenta certes avantatges. Essent gens d'origen vegetal, els inhibidors de proteases formen part del menjar que habitualment consumeixen animals i humans, fet que presenta aquesta estratègia com a potencialment aplicable a la protecció de cultius destinats, tant al consum humà com per a la ramaderia.

El treball presentat s'emmarca en la recerca d'estratègies per a la millora de la resistència de les plantes d'arròs a plagues i patògens, mitjançant transgènia. Concretament, pel que fa a la millora de la resistència front l'atac d'insectes, hem centrat el nostre treball en l'estudi i obtenció de plantes d'arròs resistents a *Chilo suppressalis*. L'estratègia estudiada ha estat l'expressió del gen *mpi* en plantes d'arròs. Aquest gen codifica per l'inhibidor de proteases de blat de moro, MPI (*Maize Proteinase Inhibitor*); estudis anteriors realitzats al nostre laboratori, han demostrat l'activitat inhibidora *in vitro* de l'MPI front proteases digestives del lepidòpter *Spodoptera littoralis* (Tamayo *et al.*, 2000). Amb la realització de bioassaigs amb plantes transgèniques per l'inhibidor MPI, infestades amb larves de *Chilo suppressalis*, i l'anàlisi de l'efecte de l'inhibidor MPI en el sistema digestiu d'aquest lepidòpter, s'ha determinat l'eficàcia de l'expressió del gen *mpi* per a interferir en el creixement de les larves de *C. suppressalis*. Així mateix, també s'ha dut a terme la caracterització inicial del sistema

de proteases digestives de larves de *C. suppressalis*. Hem fet extensiu l'estudi al també lepidòpter *Cacyreus marshalli*, principal plaga del gerani.

En la majoria d'estudis realitzats amb plantes transgèniques per a la millora de la resistència a insectes plaga, així com també en el cas de les plantes transgèniques comercialitzades en el marc de la Comunitat Europea, s'utilitzen promotors constitutius per a expressar els gens insecticides. La utilització d'aquests promotors comporta l'expressió constant del gen, i per tant, un malbaratament dels recursos i energia, així com el desgast del metabolisme de la planta. Així mateix, l'acumulació constant i elevada de la proteïna insecticida, malgrat que permet assolir uns elevats índex de mortalitat de l'insecte-problema (per exemple en plantes que expressen el gen de la toxina Bt) pot afavorir l'aparició de resistència en la població d'insectes. Així doncs, es fa necessària la recerca de promotors que permetin l'expressió induïble, per atac de l'insecte, del gen insecticida; així com promotors que condueixin a l'expressió del gen únicament en teixits on s'alimenti l'insecte.

Les investigacions actuals també es centren en la recerca de promotors que evitin l'expressió del gen insecticida en el pol·len (per evitar la dispersió o ingesta de la proteïna insecticida per part d'insectes) o en teixits que seran consumits (per adaptar-se a les demandes dels consumidors). Més recentment, s'està treballant en el desenvolupament de noves metodologies per a la transformació com és el cas de la transformació cloroplàstica, amb l'objectiu d'evitar la transmissió del gen a través del pol·len a cultius limítrofs no transgènics o a espècies salvatges relacionades. Basant-nos en aquestes demandes, s'ha realitzat l'estudi funcional del promotor del gen *mpi* en plantes d'arròs que es presenta en aquest treball. Estudis anteriors realitzats en el nostre grup, varen determinar la inducció de l'expressió del gen *mpi* en resposta a ferida mecànica i a la mossegada d'insectes, en blat de moro (Cordero *et al.*, 1994; Tamayo *et al.*, 2000). En el present treball es va estudiar la zona promotora del gen *mpi* amb l'objectiu de determinar la seva funcionalitat en arròs i inductibilitat per ferida, així com la seva expressió en diferents teixits de la planta d'arròs. Aquest estudi tingué continuïtat en un estudi de l'expressió del gen de l'inhibidor MPI, sota control de les seves regions promotora i terminadora, en plantes d'arròs també dirigida a la millora de la resistència a *Chilo suppressalis*.

I.1 Expressió constitutiva del gen *mpi* (Maize Proteinase Inhibitor) de blat de moro en plantes d'arròs

Mitjançant les tècniques disponibles actualment per a la transformació de plantes, bombardeig de microprojectils i transformació per *Agrobacterium*, s'obtingueren plantes d'arròs transgèniques que expressaven el gen *mpi* sota control del promotor constitutiu del gen de la Ubiquitina de blat de moro (*ubi*) i del terminador *nos*.

Calls embriogènics, derivats de llavors induïdes d'arròs, de la varietat Sènia, foren bombardejats amb la construcció pSC22ubi::mpi::nos juntament amb el plàsmid pILTAB227 que conté el gen *hph*, que permet seleccionar les plantes transgèniques mitjançant l'agent selectiu higromicina. Per altra banda, calls embriogènics d'arròs de la varietat Ariete, foren transformats mitjançant *Agrobacterium* amb la construcció pC1300ubi::mpi::nos que inclou, en el mateix plàsmid, el gen *hptII* que confereix la resistència a l'agent de selecció higromicina. Una de les avantatges que presenta el mètode de transformació mitjançant *Agrobacterium* respecte al de biolística, és el baix nombre de còpies que s'integren (1-3 còpies). La transformació per biolística dóna lloc a un major nombre d'integracions que afavoreix, en major grau, fenòmens d'integració complexa de les còpies del transgen, còpies truncades i de silenciament de l'expressió del gen transferit (Baulcombe *et al.*, 1996; Stam *et al.*, 1997).

El percentatge d'esdeveniments independents, obtinguts en la transformació per biolística de calls embriogènics de la varietat d'arròs Sènia, fou d'entre un 5-15%, valors que concorden amb els esperats per a una transformació d'arròs Sènia per biolística, segons el protocol emprat (dades no publicades, Dra. V. Marfà).

La transformació, mitjançant *Agrobacterium*, de calls d'arròs de la varietat Ariete ens va permetre obtenir un percentatge d'esdeveniments independents del 21%. Aquest percentatge concorda amb els resultats obtinguts en altres experiències de transformació amb calls embriogènics d'arròs de la varietat Ariete, al laboratori del Dr. E. Guiderdoni, on s'ha pogut constatar que el percentatge d'esdeveniments independents transformats per *Agrobacterium* sol ser superior a l'observat per el mètode de biolística, movent-se pels valors >12% fins a 50%. A més a més, cal tenir en compte que el percentatge restant de calls que no progressen, inclou els calls que esdevenen contaminats per *Agrobacterium* i que són eliminats. Els percentatges habituals de calls contaminats, seguint el protocol emprat de transformació per *Agrobacterium*, és d'aproximadament el 30-45% (D. Meynard, comunicació personal).

Malgrat que l'ús del mètode de transformació per biolística s'ha demostrat perfectament vàlid per a l'obtenció de plantes transgèniques per a la recerca (en el nostre cas, en arròs), el mètode d'*Agrobacterium* es presenta com al més idoni per a l'obtenció de plantes transgèniques; ja sigui amb l'objectiu final de la comercialització per al consum humà o ramader (no s'integren seqüències plasmídiques tals com les seqüències de l'esquelet del plàsmid) que inclouen gens de resistència a antibiòtics (p.ex. Ampicil·lina), i que sí que s'integrarien amb el bombardeig), o per a la recerca (menor nombre d'integracions del transgen i perfil d'integracions més simple).

Així mateix cal destacar les investigacions que s'estan duent a terme en el nostre laboratori, en el marc del projecte europeu ERRI, per a l'obtenció de nous vectors per a la

transformació mitjançant *Agrobacterium*, vectors amb doble ADN-T. Aquests vectors permetran la segregació independent del gen de selecció (p.ex. gen de resistència a antibiòtics) i del gen d'interès (gen insecticida) en la progènie de plantes transgèniques regenerades (projecte ERRI, 2001).

Per altra banda, els dos mètodes de transformació no difereixen significativament en el temps que es requereix, a partir del moment de la transformació del call embriogènic, fins a l'obtenció d'una plàntula d'arròs transgènica. El mètode d'*Agrobacterium* és lleugerament més llarg, i pot variar de 20-25 dies en comparació amb la durada del mètode de biolística (veure *Figura 30* de la *Introducció*). El procés de transformació de l'arròs, des del seu inici fins a l'obtenció de la planta adulta, oscil·la entre 5 i 6 mesos.

L'acumulació de la proteïna MPI en les plantes d'arròs transgèniques, tant Sènia com Ariete, es detectà en extractes proteics totals provinents de mostra foliar. Els nivells màxims d'MPI assolits en el total de proteïnes solubles de les plantes transgèniques analitzades, per a ambdues varietats d'arròs transformades, han estat de 0,4-0,5 % d'MPI en el total de proteïnes solubles. Així mateix, l'anàlisi dels nivells d'acumulació de proteïna MPI de les plantes transgèniques *ubi::mpi::nos*, en generacions successives, ha mostrat la poca variació entre els nivells d'acumulació en fulla d'aquesta proteïna en les diferents generacions de les línies seleccionades, i s'ha comprovat que en poques generacions (a partir de la generació T2), aquests nivells es fixen i mantenen en les subsegüents generacions.

Mitjançant la realització d'assaigs *in vitro* d'activitat elastasa i quimotripsina, amb extractes proteics provinents de plantes *ubi::mpi::nos* (línia SC84, varietat Sènia) es demostrà que els extractes de fulla presentaven activitat inhibidora d'elastasa, però no de quimotripsina, de mamífers. Aquests resultats concorden amb estudis anteriors realitzats al nostre laboratori, d'inhibició de proteases de mamífers utilitzant la proteïna MPI expressada en *E. coli* (Tamayo *et al.*, 2000). A diferència del que s'observà respecte a la capacitat d'inhibició de proteases de mamífers per part de l'inhibidor MPI, en el cas de les proteases digestives d'insectes s'ha comprovat que l'MPI és efectiu per a la inhibició d'activitats del tipus quimotripsina i elastasa (inhibidor bifuncional) (Tamayo *et al.*, 2000). El fet que l'MPI presenti activitat inhibidora d'elastasa de mamífer, és consistent amb la presència d'un residu d'alanina en el residu P1 del centre reactiu de la proteïna MPI, residu que determina l'especificitat d'inhibició dels IPs de serinaproteases. En altres inhibidors de proteases de plantes amb activitat contra elastases també és troba una alanina en la mateixa posició de la seqüència polipeptídica (*VSI* (Svendsen, 1984), *C-II* (Odani *et al.*, 1977) o mutants de *CMTI III* (Rolka *et al.*, 1991)).

La bifuncionalitat és una característica que presenten molts inhibidors de serinaproteases de plantes, però el que fa singular l'inhibidor MPI és que la majoria dels inhibidors de

serinaproteases de plantes descrits en la literatura solen ser inhibidors d'activitats tripsina i quimotripsina, però pocs ho són contra activitats elastasa. Els inhibidors de proteases membres de la família de l'inhibidor de patata I, a la qual pertany l'inhibidor MPI, mostren activitat inhibidora front quimotripsines de mamífers. Els inhibidors d'elastasa són els menys representats, i menys estudiats, entre els inhibidors de proteases de plantes.

Per tant, els resultats obtinguts amb els extractes de plantes transgèniques *ubi::mpi::nos* demostren la funcionalitat de l'inhibidor MPI en plantes d'arròs, així com l'estabilitat d'aquest inhibidor quant és expressat transgènicament en plantes d'arròs.

La caracterització del/s tipus de proteasa/es susceptibles d'inhibició per un inhibidor és important per a una planificació de les estratègies més adequades per a combatre insectes-plaga concrets. També es fa necessari un millor coneixement dels sistemes digestius d'insectes; sistemes digestius que, si es compara amb el que es coneix sobre els sistemes proteolítics digestius de mamífers, estan encara molt poc caracteritzats. Així és de gran importància, per a la correcta avaluació del potencial dels IPs per a la millora de la resistència de plantes, realitzar aquests tipus d'estudis utilitzant les proteases del sistema digestiu de l'insecte-problema.

El primer exemple de l'augment de la resistència a insectes mitjançant l'acumulació d'un inhibidor de proteases, demostrat mitjançant la realització de bioassaigs, fou l'estudi de Hilder i col·laboradors amb plantes transgèniques de tabac que expressaven el gen de l'inhibidor de tripsina (CpTI) del fesol *Vigna unguiculata* (Hilder *et al.*, 1987). Estudis posteriors amb plantes transgèniques (que inclouen tabac, patata, arròs, col, maduixa, colza i àlber) que acumulen IPs forans, també mostren un increment de la resistència a les seves plagues en bioassaigs. Centrant-nos en els estudis en plantes d'arròs transgèniques per IPs, cal esmentar els treballs realitzats per Xu *et al.* (1996) en què expressaven el gen de l'inhibidor de tripsina CpTI contra els lepidòpters *Chilo suppressalis* i *Sesamia inferens*, els estudis de Duan *et al.* (1996) amb el gen de l'inhibidor de proteases de patata II (*pin2*, inhibidor de tripsines i quimiotripsines) contra *S. inferens*, i els realitzats per Lee *et al.* (1999) on s'expressava el gen de l'inhibidor de tripsines Kunitz de soja, *SKTI*, contra el homòpter *Nilaparvata lugens*. En tots tres assaigs es va reportar la millora de la resistència de les plantes transgèniques a l'atac dels insectes-problema respecte les plantes control que no acumulaven els IPs, tal i com s'ha pogut demostrar en aquest treball, per les plantes transgèniques per l'inhibidor MPI.

Les característiques demostrades de l'inhibidor MPI tant d'inhibició *in vitro* d'activitats proteolítiques digestives de l'insecte lepidòpter *Spodoptera littoralis*, com de funcionalitat al ser expressat en plantes d'arròs mitjançant transgènia, ens impulsaren a dur a terme un assaig per a determinar si la sobreexpressió del gen *mpi* en arròs conferia una major

resistència a les plantes d'arròs transgèniques front la plaga més important dels arrossars, el lepidòpter *Chilo suppressalis*.

Es realitzà un bioassaig amb plantes que expressaven constitutivament el gen *mpi* (*ubi::mpi::nos*, varietat Sénia, línies SC84 i SC90, que acumulaven l'inhibidor MPI a nivells del 0,45% i 0,25%, respectivament) que foren infestades amb larves en estadi L2 de *Chilo suppressalis*. L'observació dels efectes de la infestació en les diferents línies, després de dues setmanes, va permetre demostrar la major resistència de les línies transgèniques (*ubi::mpi::nos*) a l'atac de larves de *C. suppressalis* (veure *Figura 47* de l'apartat *I.Resultats*).

Així doncs, podem concloure que l'expressió constitutiva del gen *mpi* en plantes d'arròs transgèniques, permet assolir els nivells necessaris d'expressió del gen *mpi* per a la protecció d'aquestes front la infestació de larves de *Chilo suppressalis*.

Per a tal d'estudiar l'efecte que l'ingesta de l'inhibidor MPI, expressat en les plantes transgèniques, provoca en el desenvolupament i condicionament físic de les larves de *Chilo suppressalis*, es féu un seguiment de l'evolució del desenvolupament larvari de les larves utilitzades en la infestació de les plantes que expressaven constitutivament el gen *mpi* (*ubi::mpi::nos*). En un primer bioassaig, als 7 dies d'infestació, ja es pogué observar una disminució del pes de larves recuperades en les plantes transgèniques d'entre un 11-21%, respecte les recuperades en les plantes control. Als 14 dies d'infestació, es recuperaren un 35% dels individus ja en estadi de nimfa de les plantes control, mentre que de les plantes transgèniques SC84 i SC90 només se'n recuperà un 4,9% i 0%, respectivament. Aquesta reducció en el nombre de nimfes recuperades en plantes transgèniques respecte les recuperades en plantes control, coincideix amb l'estudi realitzat per Lee *et al.* (1999) en què observaren la disminució similar del nombre de nimfes en larves de l'homòpter *Nilaparvata lugens*, alimentades en plantes d'arròs que acumulaven l'inhibidor de proteases SKTI (*Soybean Kunitz trypsin inhibitor*, a nivells de 2,5% del total de proteïnes solubles).

El correcte desenvolupament larvari dels lepidòpters ve donat per l'assoliment d'un interval de pes determinat per a cada estadi, que permetrà a la larva, la muda i el pas al següent estadi larvari. La finalització del cicle larvari s'assoleix al passar a l'estadi de nimfa. La disminució del pes de les larves recuperades en les plantes transgèniques *ubi::mpi::nos* respecte les control, juntament amb la dramàtica disminució del nombre de nimfes recuperades una setmana després, ja era indicatiu de l'efecte nociu que representa l'ingesta d'inhibidor MPI per al correcte desenvolupament i condicionament físic de les larves de *C. suppressalis*.

Per poder determinar amb més exactitud el grau en què afecta l'ingesta d'MPI al desenvolupament larvari de *C. suppressalis*, es realitzaren nous bioassaigs, tant per les

plantes transgèniques Sènia (línies SC84 i SC90) com per les diferents línies transgèniques Ariete seleccionades (en tots els casos l'expressió del gen *mpi* era constitutiva). A la *Taula 108* es resumeixen els resultats obtinguts per als diferents bioassaigs.

Plantes	línia	% MPI	% reducció de pes
	Sènia	-	-
Sènia (T4) (biolística) pSC22 <i>ubi::mpi::nos</i>	SC90	0,2	40,1%
	SC84	0,4	54%
	Ariete	-	-
	24.3	0,10	(35,6 %)
Ariete (T1) (<i>Agrobacterium</i>) pC1300 <i>ubi::mpi::nos</i>	24.6	0,15	41,8 %
	37.9	0,15	43,3 %
	38.9	0,20	55,6 %
	24.4	0,25	59,7 %
	Ariete	-	-
Ariete (T2) (<i>Agrobacterium</i>) pC1300 <i>ubi::mpi::nos</i>	38.9	0,15	(12,2 %)
	24.6	0,25	32,2 %
	24.4	0,25	25,3 %

Taula 108: Resum dels bioassaigs realitzats amb plantes transgèniques que expressen constitutivament el gen de l'inhibidor de proteases MPI, infestades amb larves de *Chilo suppressalis*. S'indica la varietat, generació, mètode de transformació i la construcció utilitzada per a cada bioassaig. El percentatge d'MPI correspon al total de proteïnes solubles. Entre parèntesi s'indica els valors no significatius. Els % de reducció de pes s'han calculat prenent el pes mitjà de les larves alimentades en plantes control com a 100% de pes.

El bioassaig realitzat amb plantes Sènia de les línies SC84 i SC90 (que acumulaven 0,4% i 0,2% d'MPI en el total de proteïnes solubles) ha permès determinar una reducció significativa de pes de les larves del 54% i 40,1%, respecte les larves alimentades en plantes control.

Aquesta severa reducció del pes de les larves alimentades en plantes *ubi::mpi::nos*, es veié igualada, i fins i tot superada, en els bioassaigs realitzats amb les línies Ariete transgèniques. Així, les larves alimentades en les plantes Ariete T1 de les línies 24.6, 37.9, 38.9 i 24.4, presentaren una important reducció de pes (de 42, 43, 55 i 60%, respectivament) respecte el pes de les larves control. En el bioassaig realitzat amb la generació T2 de les línies Ariete 24.6 i 24.4, s'assoliren també reduccions de pes significatives (25 i 32%, respectivament); tot i que en aquest experiment es va produir un creixement més lent del

conjunt de la població de larves, tant en les alimentades en plantes control com en les plantes transgèniques. Aquest fenomen s'explica pel fet que aquest bioassaig es realitzà en època hivernal, moment en què les plantes d'arròs acumulen gran quantitat d'aigua a l'interior de les tiges, i en conseqüència la consistència dels teixits varia, fent que l'alimentació de les larves en aquestes plantes sigui menys efectiva, i s'observi un menor creixement d'aquestes. Aquest fet es manifesta amb un escurçament de les diferències, de pes i desenvolupament, entre les larves control i les alimentades en les línies transgèniques.

En aquests bioassaigs, s'utilitzaren temps més curts (deu dies), per poder recollir les larves abans de que les diferències fenotípiques entre les plantes transgèniques i control es manifestessin. Així doncs, després dels deu dies d'infestació, l'aspecte de les plantes transgèniques era equivalent al de les plantes control (el temps d'infestació fou massa curt com per a copsar diferències en la resistència a *Chilo suppressalis*). Sota les condicions en què realitzarem els bioassaigs, per poder veure l'efecte de protecció en les plantes front *Chilo* calen dues setmanes d'infestació. Amb un temps menor, les larves que infesten una planta control no transformada no tenen encara limitat l'aliment; mentre que a períodes més llargs d'infestació, aquestes larves segueixen menjant i desenvolupant-se normalment i arriben a destruir tota la planta. Cal remarcar que les plantes transgèniques mostraren únicament zones enfosquides en la part de les tiges per on s'havien introduït les larves. En la majoria de les plantes en què existien panícules a l'inici de l'assaig, les panícules es reompliren correctament i la producció de llavors fou al mateix nivell que plantes de la mateixa varietat no transformades. Aquestes llavors eren perfectament viables i se'n obtingueren les següents generacions amb uns percentatges de germinació que no diferien dels habituals (dades no mostrades).

En la majoria d'estudis publicats en què es descriu l'expressió de gens d'IPs en plantes transgèniques, els bioassaigs realitzats amb diferents insectes assenyalen la necessitat d'assolir elevats nivells d'acumulació de l'IP per a aconseguir percentatges significatius de mortalitat i/o de reducció del pes de les larves, respecte les larves control. Així, aquests efectes s'observaren en larves alimentades en plantes transgèniques amb acumulacions de l'IP superiors a 0,5%, essent en la majoria dels casos superior a 1% d'IP en el total de proteïnes solubles (Hilder *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1989; McManus *et al.*, 1994; Leplé *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1997; Jongsma *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 1998 i 2001; Lee *et al.*, 1999). Diferents autors estipulen que, teòricament, la concentració mínima d'IP acumulada en planta per a assolir la inhibició total de l'activitat proteolítica digestiva de l'insecte, recau en el rang de 10-30 μ M, que correspondria a un 0,5-1,5% d'IP en el total de proteïnes solubles (Jongsma *et al.*, 1997). Concretament, si ens centrem en estudis realitzats per altres autors amb plantes transgèniques d'arròs, els nivells

d'acumulació de l'inhibidor de proteases necessaris per assolir la protecció de les plantes d'arròs en bioassaig, foren molt superiors als nivells d'acumulació de l'MPI en les plantes obtingudes en el nostre estudi; així mentre que la protecció de les plantes transgèniques per l'MPI s'assoleix amb uns nivells d'acumulació de 0,25 a 0,45% en el total de les proteïnes solubles, els nivells descrits pels altres IPs per a obtenir la protecció de les plantes transgèniques foren de 1,3% (*Cowpea trypsin inhibitor, CpTi*), de 1,25 a 2,25% (Inhibidor de proteases de patata II, *pin2*) i de 0,5-2,5% (*Soybean Kunitz trypsin inhibitor, SKTI*) (Xu *et al.*, 1996, Duan *et al.*, 1996 i Lee *et al.*, 1999, respectivament).

Així mateix, en molts estudis es descriu l'aparició de l'efecte invers (major creixement de les larves alimentades en les plantes transgèniques respecte les alimentades en les plantes control) en línies que acumulen l'inhibidor de proteases a nivells inferiors a 0,5%. Aquest efecte invers seria la conseqüència de l'existència i/o síntesi de proteases digestives insensibles a l'IP ingerit, capaces de sobrepassar l'efecte deleteri de concentracions "baixes" de l'IP expressat transgènicament (Broadway *et al.*, 1994; Bolter *et al.*, 1995; Jongsma *et al.*, 1997; Michaud *et al.*, 1997). Cal destacar que, així com s'ha observat en el nostre treball, existeixen estudis que han obtingut igualment importants reduccions en el pes de les larves, amb plantes transgèniques que expressaven els IPs a nivells d'aproximadament el 0,2% en el total de proteïnes solubles; aquest és el cas dels inhibidors de tripsina de boniato i mostassa (Yeh *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 2001) i dels inhibidors de tripsines i quimotripsines de patata i *Nicotiana glauca* (Jongsma *et al.*, 1995; Heath *et al.*, 1997).

Tanmateix, en el nostre estudi s'ha demostrat que l'acumulació de l'inhibidor de proteases MPI a nivells d'entre 0,15% a 0,4% del total de proteïnes solubles permet assolir reduccions de pes significatives, de l'ordre del 25% al 60% de reducció del pes de les larves alimentades en aquestes plantes respecte les controls. Així mateix, en aquest estudi s'observà que, en les larves alimentades en plantes transgèniques, efectivament es produeix una "estimulació" de l'activitat proteolítica total del sistema digestiu (veure apartat 1.4 d'aquesta discussió). Pot pensar-se que aquesta sobreactivació no és efectiva per a contrarestar l'efecte nociu de l'inhibidor MPI.

En el nostre estudi, no vàrem detectar índexs de mortalitat significatius, tot i que cal tenir en compte la impossibilitat de recuperar totes les larves mortes, ja que al morir i assecar-se, la majoria d'elles resulten imperceptibles entre els residus derivats de la alimentació de les larves en l'interior de les plantes. Tanmateix el percentatge de larves recuperades en les plantes de les diferents línies ens permet tenir una estimació indirecta dels índexs de mortalitat. Així, només en les línies SC84 (*pSC22ubi::mpi::nos*, varietat Sénia), 37.9 i 24.4 (*pC1300ubi::mpi::nos*, varietat Ariete, T1) s'observà una reducció del nombre de larves recuperades superior al 10% respecte el percentatge de larves recuperades en les plantes

no transformades. Es pot considerar que aquest percentatge podria correspondre a un cert nivell de mortalitat.

A més a més de la importància del nivell d'acumulació de l'IP en planta, existeixen altres factors que explicarien els efectes negatius que s'observen en el desenvolupament de les larves en plantes amb nivells baixos d'acumulació d'IPs. Així les característiques alimentàries de l'insecte problema, el perfil de les seves activitats proteolítiques digestives, l'especificitat d'inhibició de l'IP o la seva bifuncionalitat, són factors de gran importància per a l'èxit de l'estratègia de millora de la resistència de plantes a plagues. De fet, l'efectivitat d'un IP per interferir amb el sistema proteolític digestiu d'un insecte, no depèn únicament del nivell d'acumulació que s'assoleix en la planta transgènica. També depèn del/s tipus de proteasa/es que resulten inhibides; així l'efectivitat d'un IP pot ser més important si la proteasa "diana" participa en etapes clau de la digestió: encara que la proteasa "diana" participi minoritàriament en el conjunt total de les activitats proteolítiques, si ho fa en estadis importants del procés de digestió, l'efecte serà més important. Aquests factors són tractats amb profunditat en els següents apartats d'aquest treball.

Per poder analitzar amb més profunditat l'efecte de l'ingesta d'MPI en el desenvolupament larvari de *Chilo suppressalis*, s'analitzà la distribució de les larves en diferents grups de pes als 10 dies d'infestació (veure les gràfiques de les *Figures 51, 55 i 59* de l'apartat de *I.Resultats*). Aquest estudi ens ha permès constatar que, la distribució en grups de pes de les larves recuperades de les plantes control no transformades, és més o menys homogènia al llarg dels diferents grups de pes, sense que cap grup englobi, en cap dels tres bioassaigs, més del 30% de la població de larves recuperades. Així, observarem el desenvolupament normal de les larves de *Chilo suppressalis* que presentà individus en els diferents grups de pes, des de >10 mg fins a >61 mg. El fet d'obtenir larves de gran varietat de pesos, i no solament de grups de pes elevats, mostra l'heterogeneïtat intrínseca de la població de larves estudiades.

Contràriament, les larves recuperades de les plantes transgèniques per l'inhibidor MPI, en tots tres bioassaigs, presentaren una distribució que tendia a concentrar-se en els grups de pes més baixos. Així, la majoria dels individus els trobarem representats en grups de pes d'entre 10 - 40 mg; si s'observen les gràfiques de distribució en grups de pes corresponents a aquestes larves (*Figures 51, 55 i 59* de *I. Resultats*), veurem com la distribució no fou homogènia, sinó que, majoritàriament, s'esbossaven pics de grups de pes amb més individus, seguits d'una disminució marcada en els grups de pes immediatament superiors. Aquesta distribució demostra que l'ingesta de l'inhibidor posa fre al correcte

desenvolupament de les larves, i es desdibuixa un llindar a partir del qual les larves alenteixen o frenen el seu desenvolupament natural.

La distribució en els grups de pes fou interrelacionada amb els estadis larvaris corresponents, basant-nos en un estudi realitzat pel Dr. B. Vercambre (CIRAD, Montpellier) sobre el desenvolupament de larves de *Chilo suppressalis* (estudi realitzat en el marc del projecte ERRI). Aquest nou tractament de les dades dels bioassaigs, va permetre determinar amb més exactitud l'abast de l'efecte de l'inhibidor MPI en el desenvolupament larvari de *Chilo*. En la *Figura 109* es mostra un resum de la distribució de les larves segons l'estadi larvari, per a tots tres bioassaigs (així mateix, la distribució per estadi larvari es desglossa, per a cada bioassaig, en les *Figures 52, 56 i 60* de l'apartat *I. Resultats*).

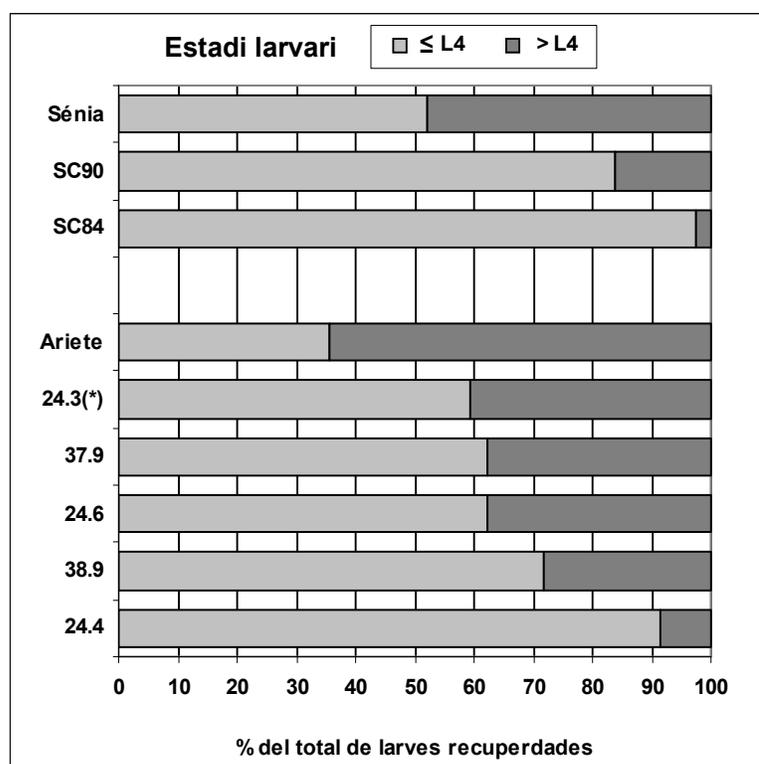


Figura 109: Distribució segons estadi larvari de les larves recuperades de bioassaigs amb plantes transgèniques que expressen constitutivament el gen de l'inhibidor de proteases MPI. S'indica el percentatge del total de larves recuperades en cada línia en estadi $\leq L4$ o $>L4$. (*) Línies transgèniques per les que no s'observà una reducció de pes significativa.

El correcte desenvolupament de les larves utilitzades en els bioassaigs (en estadi L2) després de 10 dies d'alimentació en planta conduiria, segons l'estudi del Dr. Vercambre, a la recuperació de gran part de la població de larves en estadi L5 o superiors. Aquest és el cas de les larves recuperades en les plantes control no transformades, per a tots els bioassaigs, en què els percentatges superiors del total de larves recuperades corresponia a larves en

estadi > L4. Cal destacar que, en cap de les plantes control dels bioassaigs, es recuperaren larves en estadi L2 inicial, és a dir totes les larves pogueren evolucionar a estadis superiors. En canvi, s'observà un clar impediment del desenvolupament larvari de les larves alimentades en les plantes transgèniques que expressaven l'inhibidor MPI. Així, poguérem observar que, com a mínim, el 60% de les larves recuperades es trobaven en estadi larvari igual o inferior a L4. Així mateix, cal destacar que en les línies que expressaven $\geq 0,2\%$ d'MPI en el total de proteïnes solubles, el percentatge de larves recuperades en estadis $\leq L4$ corresponia a més del 80% del total de larves recuperades. A més a més, remarcar que en la majoria de les línies transgèniques es recuperaren larves en estadi inicial L2, que no havien evolucionat en els deu dies d'infestació, a diferència de les plantes control on en cap d'elles es recuperaren larves en aquest estat inicial.

Aquests resultats confirmen l'efecte nociu que representa l'ingesta d'inhibidor de proteases MPI per larves del barrinador de l'arròs, *Chilo suppressalis*, i permeten sostenir que els nivells d'expressió del gen *mpi* que s'assoleixen en les línies d'arròs del present estudi, alenteixen significativament el desenvolupament de les larves, evitant, majoritàriament, l'assoliment d'estadi superiors a estadi larvari L4. Així mateix, cal tenir en compte que el pes assolit per les larves de *Chilo suppressalis* al moment de passar a l'estadi de nimfa, determina d'una manera directa el nombre d'ous que pondrà la femella en estadi de papallona, i determina per tant, la fecunditat de les femelles. Així, en l'estudi realitzat pel Dr. B. Vercambre, es determinà que crisàlides de *C. suppressalis* amb un pes inferior a 65 mg, comportaria una posta de les femelles reduïda, corresponent a una mitjana de 125 ous/femella, mentre que una posta normal sol ser d'entre 175 a 250 ous/femella. Per tant, aquest alentiment de l'evolució de les larves, observat en el nostre treball, podria desembocar també en una disminució de la producció d'ous de les femelles adultes i per tant, en un descens de la població d'aquest lepidòpter, tal i com s'ha descrit pel lepidòpter *Spodoptera littoralis* procedents de bioassaigs amb plantes transgèniques MTI-2 (De Leo *et al.*, 2002). Aquesta hipòtesi serà estudiada en el futur mitjançant la realització de bioassaigs, en què les larves de *Chilo* es mantindran al llarg de tot el cicle vital, fins a l'obtenció de la nova generació d'ous.

Així mateix, alguns dels estudis en què s'han obtingut elevats percentatges de mortalitat de les larves alimentades en plantes transgèniques per IPs, foren realitzats amb larves neonates (estadi L1) (Duan *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 1997; Charity *et al.*, 1999; Altpeter *et al.*, 1999; De Leo *et al.*, 1998, 2001 i 2002). En aquest sentit s'ha de mencionar que molt insectes canvien les seves activitats proteolítiques digestives al llarg del seu desenvolupament larvari, així com també al llarg de la vida adulta (Applebaum *et al.*, 1985); aquests canvis explicarien la diferent sensibilitat a la ingesta d'IPs (i altres molècules insecticides, com la toxina Bt) descrita per diferents insectes segons el seu estadi larvari

(Spates *et al.*, 1979 i 1984; Hoffmann *et al.*, 1992; Altpeter *et al.*, 1999; Alinia *et al.*, 2000; Serra *et al.*, 2001; Patankar *et al.*, 2001; De Leo *et al.*, 2002; Marfà *et al.*, 2002). Així, l'estudi realitzat amb larves de *Spodoptera littoralis* alimentades en tabac transgènic per l'inhibidor MTI-2, descriu la major susceptibilitat de les larves neonates-L1 (mortalitat) respecte larves en estadi L2 (reducció de la fertilitat)(De Leo *et al.*, 2002). Serà de gran interès la realització de nous bioassaigs utilitzant larves neonates de *Chilo*, per comprovar si aquestes són més sensibles a la ingesta d'inhibidor MPI, i si es poden obtenir percentatges significatius de mortalitat d'aquestes larves.

Les larves recuperades en bioassaigs, després de ser pesades individualment, se'n extragueren els intestins per al posterior anàlisi, tant de les característiques de les activitats proteolítiques digestives de les larves de *Chilo suppressalis*, com de l'efecte que produí la ingesta de l'inhibidor de proteases MPI, en el nivell d'activitats proteolítiques digestives d'aquest lepidòpter. Els resultats obtinguts en aquestes anàlisis es discuteixen en l'*Apartat 1.4*.

1.2 Anàlisi funcional del promotor del gen *mpi* en plantes d'arròs

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'aïllament i caracterització de promotors induïbles per ferida, per a dirigir l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes insecticides (ja siguin toxines o inhibidors de proteases) ha esdevingut un tema d'estudi de gran importància ja que, per una banda aquests promotors permeten un estalvi energètic i eviten el desgast del metabolisme de la planta, i per altra banda, permeten retardar l'aparició de resistència en la població d'insectes-problema.

Molts dels gens de defensa vegetal que codifiquen per inhibidors de proteases presenten promotors que són induïbles per ferida mecànica, així com per les fitohormones ABA i JA; entre aquests gens trobem el gen que codifica per l'inhibidor de proteases de blat de moro MPI. Així mateix, una altra de les característiques interessants que presenta el gen *mpi* és la inducció de la seva expressió en resposta a ferida, no només a nivell local sinó també a nivell sistèmic, en blat de moro (Cordero *et al.*, 1994).

L'aïllament i caracterització d'un fragment de la regió promotora del gen *mpi* (-689/+197) en el nostre laboratori (Cordero *et al.*, 1994), juntament amb l'estudi inicial realitzat en col·laboració amb el grup del Dr. E. Guiderdoni, han permès determinar la funcionalitat i inductibilitat per ferida d'aquest fragment del promotor *mpi* en plantes d'arròs (Breitler *et al.*, 2001). Tanmateix, el nivell d'inducció per ferida assolit amb aquest fragment en plantes d'arròs fou inferior al nivell d'inducció que presenta aquest gen en blat de moro. Aquest fet ens va impulsar a prosseguir amb l'estudi del promotor *mpi*, aquesta vegada ampliant l'estudi a la zona 5' més distal del promotor.

A partir del clon genòmic es va seqüenciar un fragment d'aproximadament 2kb. Aquesta seqüència fou analitzada detalladament per a tal d'identificar elements *cis*, potencialment involucrats en la inductibilitat d'aquest promotor en resposta a MeJA i a ferida mecànica (la seqüència completa d'aquest fragment es mostra en la *Figura 62* de l'apartat 1.2 de *I. Resultats*). Aquest estudi va permetre la localització de 6 seqüències diferents dins de la regió de 2kb del promotor *mpi* (algunes d'elles repetides i/o invertides) descrites en la literatura com a elements *cis* associats a la resposta defensiva de plantes; aquests elements, així com la seva localització, es mostren en la *Figura 110*.

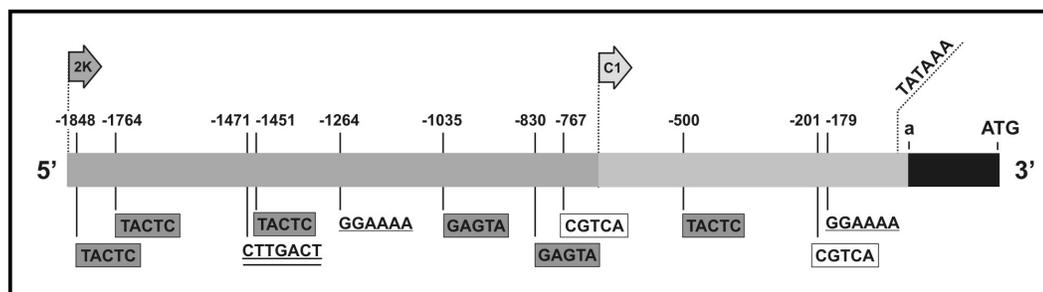


Figura 110: Elements *cis* de resposta defensiva localitzats a la regió 5' del gen *mpi* (promotor i regió 5' no traduïda). S'indica la posició del primer nucleòtid de cada element. En requadre gris, motius de resposta a MeJA (GAGTA i TACTC); en requadre blanc, motiu de resposta a MeJA invers (CGTCA); subratllat, elements GT-1 (GGAAAA); doble subratllat, caixa W-box (CTTGACT). S'indica la posició de la caixa TATA, així com de l'inici de transcripció putatiu (a) i del codó ATG. Les fletxes superiors indiquen l'inici dels fragments del promotor *mpi* (2K i C1) utilitzats en aquest treball.

L'element *cis* més abundant (repetit 6 vegades al llarg de les 2kb de promotor) fou el motiu GAGTA, descrit a la literatura com un element de resposta a MeJA en solanàcies. Aquest element sembla implicat en la regulació de l'activació transcripcional per part del MeJA dels gens *wun1* (gen induïble per ferida) i gen *cd1* (inhibidor de la catepsina D) de patata o dels gens *lap 17.1* i *17.2* de tomàquet (leucina-aminopeptidases) (Siebertz *et al.*, 1989; Ishikawa *et al.*, 1994; Ruíz & Prats, 1998). En el fragment de 2Kb vàrem localitzar 2 seqüències directes GAGTA (ambdues riu amunt del fragment C1) i 4 motius indirectes TACTC (un situat dins del fragment C1, i els 3 restants situats riu amunt de C1). Cal destacar que, tant en els motius directes com els indirectes, l'entorn és altament conservat i correspon respectivament a (AG)GAGTA(G) a TACTC(A). Així mateix es localitzaren dues seqüències que corresponen a l'element invers descrit per Rouster (1997) i que correspon a un motiu de resposta a MeJA caracteritzat en el promotor del gen *lox1* (lipoxigenasa 1) d'ordi.

Diferents estudis han descrit la disposició de motius repetits (ja sigui de forma directa i/o inversa) en dímers o multímers, tal i com hem pogut observar en el cas del promotor *mpi*

(Ishikawa *et al.*, 1994; Rouster *et al.*, 1997; Ruíz & Prats, 1998). Així mateix, els elements en *cis* repetits, tant el motiu GAGTA com el motiu TGACG, requereixen una certa proximitat entre ells per a un correcte posicionament dels factors de transcripció (Rouster *et al.*, 1997; Eulgem *et al.*, 2000). Així, en els estudis on es descriu la presència del motiu GAGTA, la distància més petita entre dos motius és de 2 nucleòtids (promotor del gen *cd1*, Ishikawa *et al.*, 1994) i la més allunyada és de 40 nt (promotor del gen *wun1*, Siebertz *et al.*, 1989). Tanmateix en el nostre cas les distàncies entre motius GAGTA consecutius són més grans: la distància mínima és de 84 nt, i la màxima és de 416 nt. Tot i aquestes distàncies, cal esmentar que en moltes interaccions entre elements en *cis* i factors de transcripció es produeixen *loops* en la cadena d'ADN que permeten l'acostament i interacció entre aquests elements distants.

Per altra banda, també es varen identificar dos elements *cis* diferents, descrits a la literatura com elements implicats en la transducció de senyals corresponents a la resposta defensiva de plantes. Aquest motius són l'element GT-1 (GGAAAA) i la caixa W-box (CTTGACT). L'element GT-1 fou trobat dues vegades al llarg del fragment de promotor *mpi* analitzat, un d'ells localitzat dins el fragment C1. Aquest element ha estat localitzat en la regió promotora de gens de defensa, com és ara el promotor del gen *PR-1a* (Buchel *et al.*, 1996); són elements que permeten la unió dels factors nuclears anomenats GT-1 (Green *et al.*, 1988). Cal destacar que la distància que separa els elements GT-1 de l'inici de transcripció en el promotor *PR-1a* està entre -900nt i +22nt, distàncies similars a les que presenten aquests motius en el promotor *mpi* (-1264 i -179nt).

Per altra banda, la caixa W-box ((T)(T)TGAC(C/T)) és present a molts promotors de gens vegetals que estan associats amb defensa (Rushton *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1994), i intervé en la transcripció de les respostes a elicitors derivats de patògens (Rushton *et al.*, 1998). En el gen PRms estudiat en el nostre laboratori, gen de blat de moro l'expressió del qual s'indueix en resposta a infecció fúngica i tractament amb elicitors, s'ha descrit la funcionalitat de l'element (AAT)TGAC(C) (posició -246) en el seu promotor (Raventós *et al.*, 1995). S'ha demostrat que a la W-box s'hi uneixen els factors de transcripció de la superfamília WRKY (Eulgem *et al.*, 2000); aquests factors de transcripció són presents en gran nombre d'espècies vegetals i estan implicats en molts processos fisiològics importants, com per exemple la resposta defensiva (Eulgem *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002). En el fragment analitzat del promotor *mpi* també s'ha pogut localitzar una caixa W-box, concretament a la posició -1471, que correspon a la seqüència (C)TTGACT. Com es pot observar, aquesta seqüència manté el centre TGAC que és essencial per a la funcionalitat i unió dels factors WRKY.

En gran nombre de gens vegetals, i fixant-nos concretament en gens de defensa, s'ha descrit que la zona promotora 5' d'aquest gens pot ser de gran longitud; en aquests

promotors s'ha localitzat diferents elements en *cis* distanciat més d'1kb de l'inici de transcripció (Albrecht *et al.*, 1992; Van de Rhee *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002; Balandin *et al.*, 1995, Wu *et al.*, 1999).

Per tal d'estudiar la funcionalitat del promotor *mpi* en arròs, així com per determinar la seva inductibilitat per ferida, es realitzaren dues construccions que constaven respectivament del fragment 2K (-1872 a +197) i del fragment C1 (-689 a +197), seguides del gen informador *uidA* i el terminador *nos* (veure construccions en les *Figures 63* i *64* de l'apartat *1.2.1* de *1. Resultats*).

La fusió d'un promotor d'interès amb el gen informador *uidA*, i el posterior l'estudi histoquímic de la planta transgènica, és una estratègia que s'ha demostrat molt vàlida en nombrosos estudis de promotors, especialment per a l'estudi de promotors induïbles per ferida i/o MeJA, com per exemple: el promotor del gen *wun1*, del gen PR-5, de gens de β -1,3-glucanases, del gen de la catèpsina D, de gens de quitinases d'àlber, del gen *lap17* o del mateix promotor *mpi*, entre d'altres (Siebertz *et al.*, 1989; Albrecht *et al.*, 1992; Van de Rhee *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1994; Ruíz-Rivero & Prats, 1998; Breitler *et al.*, 2001; Kaothien *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Es transformaren calls embriogènics d'arròs de les varietats Taipei 309 i Sènia (per al fragment 2K; transformació realitzada per la Dra. Q. Messeguer, IRTA, Cabrils) mitjançant biolística; Les plantes transformades s'utilitzaren per realitzar tests histoquímics, amb l'objectiu de localitzar l'activitat GUS dirigida pel promotor *mpi*, en diferents teixits i sota condicions d'inducció per ferida mecànica. Així mateix, s'utilitzà la construcció *pubi::gus::nos* com a control d'expressió constitutiva del gen *uidA* en plantes d'arròs; cal destacar, que aquest promotor també presenta cert grau d'inductibilitat per estrès mecànic (Takimoto *et al.*, 1994; Christensen *et al.*, 1996; present treball).

Els estudis realitzats amb plantes de les línies transgèniques que expressaven el gen *uidA* sota control del promotor *mpi*, tant el fragment llarg (2K) com el fragment curt (C1), han permès confirmar la funcionalitat d'aquest promotor de blat de moro en plantes d'arròs. L'expressió del gen *uidA* s'ha pogut detectar, sota determinades condicions i en diferents teixits de planta adulta. Les imatges dels diferents anàlisis histoquímics realitzats es mostren a les *Figures 66* a *70* de l'apartat *1.2.3.3* de *1. Resultats*.

En les **tiges** de plantes d'arròs transformades, el promotor *mpi*, tant el fragment 2K com el C1, confereix inductibilitat per ferida mecànica, que es veu traduïda en una coloració blava als extrems tallats de les tiges, mentre que no s'observa coloració a la resta de la tija. El fragment 2K dirigeix una resposta més ràpida i intensa del gen informador que el fragment 1C en totes les plantes analitzades.

En **arrel** no ferida, s'observa expressió del gen *uidA* sota control del promotor *mpi* (ambdós fragments) restringida als teixits vasculars, tant de les arrels primàries com secundàries. Cal destacar que en les construccions 2K, l'expressió del gen *uidA* fou més intensa que en les plantes C1. L'estudi de les arrels va permetre constatar que el promotor *mpi* indueix fortament l'expressió del gen *uidA* en tots els teixits de l'arrel ferida; tanmateix no es pogueren observar diferències entre les diferents construccions pel que fa a la rapidesa de la inducció en arrel, degut a la intensa coloració blava que s'observava ja a les 2h després de ferida, moment en què vàrem prendre les mostres. Aquest anàlisi coincideix amb els resultats obtinguts per a altres promotors de gens induïbles en què s'observà una expressió basal del gen *uidA* en arrels (restringida al teixit vascular o no) seguida d'una forta inducció després de ferida mecànica o tractament amb MeJA (Siebertz *et al.*, 1989; Van de Rhee *et al.*, 1993; Nischiuchi *et al.*, 1999).

En **fulla**, el patró d'expressió del gen *uidA*, que mostraren totes les línies transgèniques (tant amb el fragment 2K com C1), demostra que el promotor *mpi* confereix inducció per ferida mecànica, fet que es reflexa en l'aparició, únicament després de ferida mecànica, de coloració restringida específicament a les zones de tall. Aquest estudi ens permet afirmar que la regió -1872 /+197 (2K) confereix una inductibilitat per ferida més ràpida i més intensa que la que confereix el fragment -689/+197 (C1), tal com s'observa en la *Figura 69* de l'apartat 1.2.3.b i es resumeix en la *Taula 111*.

Per a una millor caracterització de la inductibilitat del promotor *mpi* es realitzà un assaig histoquímic de la cinètica d'inducció de l'expressió del gen *uidA* per ferida mecànica en **fulla**. Així, hem pogut observar que les plantes que contenen el fragment 2K del promotor *mpi* presentaven una ràpida inducció de l'expressió del gen *uidA*, als 10 min després de ferida mecànica; tenint en compte que és el temps mínim assajat, el temps d'inducció potser fins i tot inferior als 10 minuts. Així mateix, el nivell màxim d'expressió s'assoleix entre 1-2h després de la ferida mecànica. En el cas de les plantes amb el fragment C1, l'expressió del gen *uidA* es dona una mica més tard (entre 30min i 1h) i el grau màxim d'expressió sembla assolir-se a partir de les 6h de ferida mecànica (temps màxim analitzat). Així mateix, la intensitat màxima assolida és inferior a la observada per les plantes que contenen el fragment llarg del promotor *mpi*.

Aquestes dades ens permeten postular el possible rol dels elements en *cis* del promotor *mpi* en les característiques de la inducció per ferida, que presenta aquest promotor en plantes d'arròs. Així doncs, es proposa que els elements en *cis* existents en el fragment C1, possiblement els elements de resposta a MeJA (TACTC i CGTCA) i/o l'element GT-1 (GGAAAA), són suficients per conferir la característica d'inductibilitat per ferida mecànica. Corroborant aquests resultats, cal destacar els estudis de Breiliter *et al.* (2001) en què aquest

fragment C1 permet assolir nivells d'expressió del gen insecticida *cry1B* en arròs, que s'han demostrat suficients per aconseguir el 100% de mortalitat de larves de *Chilo suppressalis* alimentades en les plantes transgèniques. Així mateix, els estudis d'inducció per ferida obtinguts pel fragment C1 en arròs (Breitler *et al.*, 2001), suggereixen que els nivells d'inducció assolits no es correspondrien amb el fort increment en l'acumulació de trànscripats d'*mpi* que s'observà en fulles de blat de moro en resposta a ferida mecànica (Cordero *et al.*, 1994); en un primer moment es postulà que aquest fet podia ser degut a que els factors en *trans* necessaris per a la correcta expressió i regulació d'aquest fragment del promotor no existissin en l'arròs. Tanmateix els resultats obtinguts en el present treball permeten donar menys valor a aquesta hipòtesi i decantar-nos cap a la necessitat de la presència de diferents elements en *cis* en el promotor *mpi*, que actuarien cooperativament.

Varietat	Línia transgènica	Inici coloració	Màxima intensitat	Intensitat coloració
Taipei 309	pC1 <i>mpi::gus::nos</i>	30min-1h	6h(*)	+
	p2K <i>mpi::gus::nos</i>	10min	2h	+++
Sénia	p2K <i>mpi::gus::nos</i>	10min	1h	+++

Taula 111: Resum de l'assaig histoquímic GUS de la cinètica d'inducció del promotor *mpi* en fulla. S'indiquen la varietat; línia transgènica; temps requerit després de ferida mecànica per a l'observació de l'inici de la coloració; temps requerit per a assolir la màxima coloració, (*) temps màxim analitzat; +++ grau màxim d'intensitat.

Els resultats obtinguts en el present estudi semblen indicar que existeix un efecte cooperatiu entre els diferents motius de resposta a MeJA, que fa que el fragment 2K confereixi una resposta més ràpida i una inducció més forta que el fragment C1. Així en el fragment 2K trobem 6 elements de resposta a MeJA, GAGTA i TACTC, respecte a 1 únic element en el fragment C1; també l'element putatiu de resposta a MeJA, CGTCA, que es duplica en el fragment 2K. Per altra banda, no podem descartar la importància dels altres elements en *cis* relacionats amb la resposta defensiva, ja que l'element GT-1 (GGAAAA) també es duplica en el fragment 2K i, a més a més, trobem la presència de la caixa W-box (CTTGACT) que no trobàvem al fragment curt C1. Cal esmentar que no s'ha realitzat un anàlisi suficientment detallat del promotor 2K com per poder determinar la funcionalitat o aportació individualitzada de cada un dels elements *cis* localitzats en la seva seqüència nucleotídica.

Per altra banda, es realitzaren assaigs histoquímics amb les plantes p2K*mpi::gus::nos* (d'ambdues varietats) per tal de comprovar si, tal i com s'observà en blat de moro (Cordero *et al.*, 1994), el promotor *mpi* s'indueïa tant local com sistèmicament per ferida. Les plantes d'ambdues varietats presentaren inducció per ferida a nivell local restringida a les zones de tall. Efectivament, després de 18h, en les mostres sistèmiques no ferides, a més de la coloració induïda en les zones de tall, s'observà una coloració basal més accentuada en els vasos vasculars de la fulla, essent aquesta coloració més intensa en les plantes transgèniques de la varietat Sénia. El fet que la resposta local sigui més forta que la que es dona a nivell sistèmic sembla correspondre, segons mostren els estudis realitzats amb el gen *win3.10* d'àlber, a l'existència de mecanismes diferents per a la transmissió del senyal local i sistèmic (Clarke *et al.*, 1994).

També es realitzà un assaig histoquímic GUS amb **llavors** de la línia p2K*mpi::gus::nos* (varietat Sénia) sota diferents tractaments. La decorticació manual no implicà, en cap cas, l'aparició d'activitat GUS, fet comprensible si es té en compte que és un mètode poc agressiu que no implica lesions importants en la cutícula de la llavor. La decorticació manual seguida de tall longitudinal va permetre demostrar que el fragment 2K no és actiu en l'endosperm de llavors d'arròs. L'expressió del gen *uidA* només es pogué observar estrictament confinada a l'epiteli escutelar. La decorticació per abrasió intensa mostrà una lleugera coloració en el tegument, únicament on s'havien produït les lesions més profundes. Fins i tot sotmetent les llavors a una incubació prolongada en substrat X-GLU no es detectà expressió del gen *uidA* en l'endosperm. Aquests resultats, que concorden amb els resultats obtinguts conjuntament amb Breitler *et al.* (2001) per el fragment curt C1, permeten afirmar que aquesta característica del promotor *mpi* el fa un promotor idoni per a la utilització en transgènia, ja que s'adiu a les directrius que regulen els OGMs destinats al consum humà i a ramaderia, en relació a l'adequació a les demandes dels consumidors.

Els estudis del promotor *mpi* presentats en aquest treball, ens permeten afirmar la idoneïtat d'aquest promotor per a l'expressió de gens insecticides per a la millora de la resistència de les plantes a plagues d'insectes. La inductibilitat d'aquest promotor en resposta a ferida, juntament amb la ràpida i intensa inducció de l'expressió que confereix aquest promotor en la proximitat de la zona ferida, permetrien l'expressió regulada del gen insecticida. D'aquesta manera, l'expressió del gen insecticida es produiria només quant l'insecte s'alimentés de la planta. Així mateix, el patró d'expressió en tija i fulla, el fan especialment idoni per la lluita contra insectes barrinadors. Aquests insectes no poden ser eficaçment combatuts amb els pesticides d'aplicació externa, ja que la major part del seu desenvolupament larvari es realitza a l'interior de les plantes. A més a més, el fet que aquest promotor no condueixi a l'expressió del gen insecticida en l'endosperm de la llavor d'arròs i tampoc en el pol·len (fragment C1 (Breitler *et al.*, 2001)), convergeix amb les demandes per

part dels consumidors, i permetria també minimitzar els possibles riscos mediambientals, tan ampliamment criticats per determinats sectors en referència a les plantes transgèniques.

I.3 Expressió induïble del gen *mpi* en plantes d'arròs

Havent demostrat la funcionalitat i inductibilitat per ferida del promotor del gen *mpi* en plantes d'arròs, així com l'eficàcia del gen *mpi* expressat (expressió constitutiva) en plantes d'arròs front a *C. suppressalis*, es volgué comprovar si l'expressió induïble del gen *mpi* exercia els mateixos efectes sobre el creixement i desenvolupament de *Chilo suppressalis*, que els prèviament observats amb les plantes d'arròs que expressen constitutivament aquest gen.

Es realitzà un bioassaig amb plantes transgèniques d'arròs *pC1300::S-MPI* (varietat Ariete) que acumulaven la proteïna MPI a nivells de 0,15-0,2% del total de proteïnes solubles (6 hores després de ferida mecànica, veure *Figura 78* de l'apartat 1.3.3.2 de *I. Resultats*). Cal esmentar que els nivells d'acumulació de l'MPI en resposta a ferida són "relatius", ja que depenen en gran part de la superfície de mostra de fulla analitzada en relació a les ferides realitzades: en els punts pròxims a la zona de tall hi haurà major concentració d'MPI que en les zones més allunyades, on la concentració disminuirà progressivament en relació amb la distància a la ferida. Per tant, els nivells d'acumulació de proteïna MPI de les línies induïbles L-MPI i S-MPI no són comparables als nivells calculats per a les línies constitutives *ubi::mpi::nos*. El nivell basal d'acumulació d'MPI observat per les diferents plantes, triades per a la realització del bioassaig, fou nul o inferior al 0,1%. La recuperació de les larves, 10 dies després de la infestació, i el pesatge individual ens va permetre determinar el pes de les larves alimentades en les línies transgèniques i compararlo amb el pes assolit per les larves recuperades a les plantes control no transformades (veure *Taula 112*).

Plantes	línia	% MPI	% reducció de pes
	Ariete	-	-
Ariete (T2)	10.2	0,20	22,7 %
(Agrobacterium)			
pC1300::S-MPI	4.6	0,10	28 %
	5.2	0,20	28,5 %

Taula 112: Resum del bioassaig realitzat amb plantes transgèniques que expressen el gen de l'inhibidor de proteases MPI, sota control del seu propi promotor induïble (fragment C1), infestades amb larves de *Chilo suppressalis*. S'indica la varietat, generació, mètode de transformació i la construcció utilitzada. El percentatge d'MPI correspon al total de proteïnes solubles. Els % de reducció de pes s'han calculat prenent el pes mitjà de les larves alimentades en plantes control com a 100% de pes.

Els resultats d'aquest bioassaig ens permeten concloure que larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes que expressen de manera induïble el gen de l'inhibidor MPI, veuen afectat el seu creixement, presentant una reducció de pes d'entre un 23-29% respecte larves alimentades en plantes d'arròs control no transformades. Tal i com s'ha demostrat amb les plantes transgèniques que expressaven de manera constitutiva l'inhibidor MPI, l'expressió del gen *mpi* sota control del seu propi promotor confereix nivells d'expressió i acumulació de l'MPI, suficients per a afectar el creixement i desenvolupament de les larves de *Chilo*.

Tot i que mitjançant ferida mecànica es detecten nivells d'acumulació de 0,15-0,20% d'MPI, probablement l'acumulació en planta durant l'atac de les larves, és molt més elevada. Aquesta afirmació es basa en els resultats obtinguts en el nostre laboratori amb plantes de blat de moro, on s'ha pogut demostrar que l'alimentació de larves d'*Spodoptera littoralis* provoca una acumulació més gran d'MPI que la que es produeix en resposta a ferida mecànica (Tamayo *et al.*, 2000). A més a més, cal destacar que les larves, en alimentar-se continuadament en la planta d'arròs, provoquen un efecte ferida constant, que reforça la resposta a ferida. A més a més, s'ha demostrat que la inducció de la resposta defensiva de plantes, i l'expressió de gens de defensa com són els IPs, pot ser desencadenada i/o amplificada per determinats compostos de la secreció salival d'insectes. Un exemple d'aquest tipus de compostos és la *volicitina*, identificada en saliva del lepidòpter *Spodoptera exigua* (Alborn *et al.*, 1997; Korth *et al.*, 1997; Turlings *et al.*, 2000; Gang *et al.*, 2001).

Els resultats obtinguts en el present treball amb el fragment 2K del promotor *mpi* (que presentà una inducció més ràpida i intensa en els estudis histoquímics GUS que el fragment C1), permeten predir una acumulació més elevada d'MPI en resposta a ferida, respecte als nivells aquí presentats pel fragment curt del promotor. La realització de nous bioassais amb les línies L-MPI permetran comprovar si el desenvolupament de les larves de *Chilo* es veu afectat en igual o major grau que l'observat per les plantes S-MPI.

En aquest bioassaig, el nombre de larves recuperades de les plantes S-MPI fou molt inferior al nombre recuperat en les plantes control, i també lleugerament inferior al recuperat habitualment en les plantes que expressen constitutivament el gen *mpi*. Si valorem el percentatge de larves no recuperades com una estimació de la mortalitat de les larves alimentades durant el bioassaig, aquests resultats indicarien un important efecte deleteri de les plantes que expressen de manera induïble el gen *mpi*; tanmateix, la reducció del pes respecte les larves control fou menor que en les plantes que expressen constitutivament l'inhibidor MPI.

Analitzant els resultats de la distribució en grups de pes de les larves de *C. suppressalis* recuperades en aquest bioassaig, podem veure com la majoria de les larves recuperades en les tres línies transgèniques presenten un pes d'entre 10-40 mg, mentre que les larves

alimentades en les plantes control tenen un desenvolupament correcte, presentant la majoria dels individus un pes d'entre 20-50 mg.

Tal i com vàrem veure també en els anteriors bioassaigs realitzats, en les plantes control no es recuperaren larves en estadi inicial L2, i en aquest cas tampoc en L3, mentre que en les plantes transgèniques que acumulaven l'inhibidor MPI es recuperaren un 2-9% d'individus. L'anàlisi de la distribució en estadis larvaris segons la correspondència amb el pes mesurat es mostra a la *Figura 113*. El 50-60% de les larves recuperades en les plantes transgèniques es trobaven en estadi larvari igual o inferior a L4, mentre que les larves control presentaven només un 30% de les larves en estadis inferiors a L4.

Aquest anàlisi ens permet confirmar que, tal i com observàvem en la distribució segons estadi larvari de les larves alimentades en plantes que expressaven constitutivament el gen *mpi* (veure *Figura 109* de l'apartat 1.1), l'ingesta de l'inhibidor MPI dificulta el correcte desenvolupament larvari, frenant-lo en el llindar de l'estadi L4.

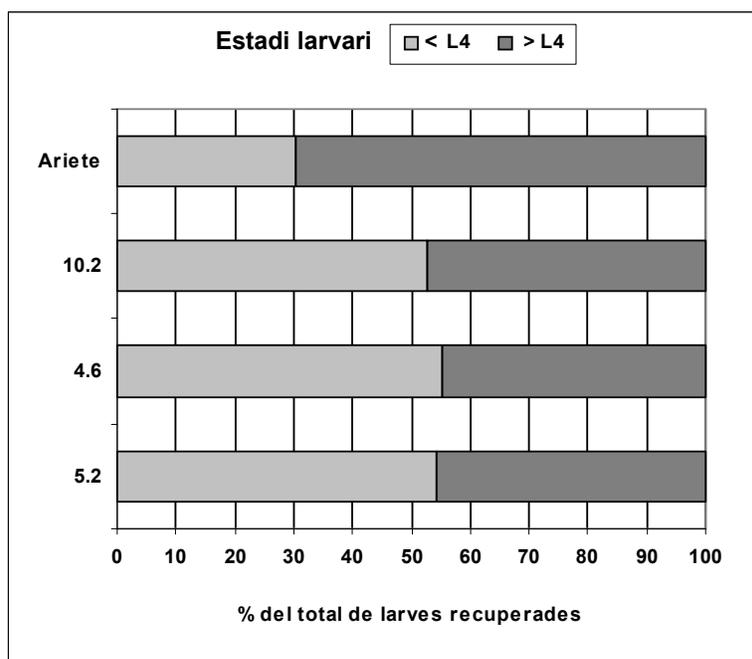


Figura 113: Distribució segons estadi larvari de les larves recuperades del bioassaig amb plantes transgèniques que expressen el gen de l'inhibidor de proteases MPI sota control del seu propi promotor induïble (fragment C1). S'indica el percentatge del total de larves recuperades en cada línia en estadi \leq L4 o $>$ L4.

El resultat d'aquest bioassaig ens permet concloure que l'expressió del gen *mpi* sota control del seu propi promotor induïble en plantes d'arròs (així com de la seva regió terminadora), permet assolir uns nivells d'expressió del gen *mpi* suficients per aconseguir una reducció del pes de larves de *Chilo suppressalis* que s'hi alimenten. Nous bioassaigs en les següents generacions, així com amb les plantes que contenen el fragment llarg del

promotor *mpi* (L-MPI), permetran obtenir més dades sobre l'efecte de l'expressió del gen *mpi* en plantes d'arròs infestades amb larves de *C. suppressalis*.

I.4 Efecte de l'inhibidor MPI sobre les proteases digestives de larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs transgèniques

Havent demostrat que larves del barrinador *Chilo suppressalis*, alimentades en plantes transgèniques d'arròs que expressaven el gen de l'inhibidor de proteases MPI, presentaven una reducció important del seu pes i un retard significatiu en el seu desenvolupament larvari, es varen estudiar les implicacions que aquesta ingesta d'inhibidor MPI comportava a nivell de les activitats proteolítiques digestives.

Primerament es determinà el pH òptim de les activitats proteolítiques presents en extractes proteics, obtinguts a partir d'intestins de larves de *Chilo*. El sistema digestiu de *Chilo suppressalis* presentà activitats proteolítiques digestives amb un pH òptim alcalí de pH 10,5 (veure *Figura 83* a l'apartat *I.4.1* de *I. Resultats*). Aquest resultat concorda amb els resultats descrits en la literatura, on es demostra que la majoria d'insectes de l'ordre dels lepidòpters presenten un pH alcalí en l'interior del seu sistema digestiu, i que les proteases digestives majoritàries en l'intestí dels lepidòpters, com per exemple les serinaproteases i les metal.loproteases, que presenten una activitat òptima en el rang de pH 9-11 (Applebaum *et al.*, 1985; Christeller *et al.*, 1992; Johnston *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ortego *et al.*, 1996; De Leo *et al.*, 1998 i 2001; Novillo *et al.*, 1999; Tamayo *et al.*, 2000).

Es varen analitzar els nivells d'activitats proteolítiques, d'extractes proteics dels intestins de les larves alimentades en les plantes transgèniques *ubi::mpi::nos* (varietat Sènia, línies SC84 i SC90), comparant-los amb els nivells que presentaven les larves alimentades en les plantes no transformades. A partir d'aquest assaig es pogué concloure que les larves alimentades en les plantes transgèniques, presentaven un nivell més elevat d'activitats proteolítiques totals que les larves alimentades en planta d'arròs no transformades (40% respecte les larves control; veure *Figura 84* de l'apartat *I.4.2* de *I. Resultats*).

En la literatura podem trobar diferents estudis en què s'analitza el nivell d'activitat proteolítica dels intestins de larves d'insectes, alimentades amb dietes artificials suplementades amb IPs o en plantes transgèniques que expressen IPs, amb resultats molt diferents. Diferents autors postulen que, com a conseqüència de l'ingesta d'IP, es produiria una hiperproducció de proteases en el sistema digestiu de l'insecte, que podria conduir a la limitació d'aminoàcids essencials per a la síntesi de proteïnes i, en conseqüència a una reducció del creixement i desenvolupament de l'insecte (Broadway *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1989; Jongasma *et al.*, 1997).

Tanmateix, l'observació d'un increment en el nivell d'activitats proteolítiques en l'intestí d'insectes alimentats amb IPs de plantes, pot correspondre també a la resposta de l'insecte per tal de sobrepassar l'efecte deleteri de l'inhibidor. Estaríem parlant de l'estratègia que s'ha descrit, en diferents ordres d'insectes, d'adquisició de resistència mitjançant la sobreproducció de proteases insensibles a l'inhibidor ingerit (Jongsma *et al.*, 1995; Bolter *et al.*, 1995; Broadway *et al.*, 1996; Bown *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Bonadé-Bottino *et al.*, 1999) o bé de proteases que podrien degradar-lo (Orr *et al.*, 1994; Michaud *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1998; Giri *et al.*, 1998). Així, l'insecte s'adaptaria a la dieta amb IP, produint altres classes de proteases que no fossin sensibles a l'IP ingerit. A més a més, s'ha demostrat que els hàbits alimentaris de l'insecte determinen el fenomen de l'adaptació (i rapidesa en què aquesta es pugui donar), tant en l'adaptació a dietes suplementades com en l'alimentació en plantes transgèniques que expressin un IP concret (Broadway *et al.*, 1996; Harsulkar, 1999; Patankar *et al.*, 2001; De Leo *et al.*, 2001). Seria factible que *Chilo* s'adaptés a la ingesta de l'MPI mitjançant la producció d'altres proteases insensibles (això explicaria l'augment de les activitats proteolítiques de les larves alimentades en plantes *mpi*), però que aquestes proteases no fossin tan efectives per "digerir" l'aliment com les que són inhibides per l'MPI. Aquest fet conduiria a una menor capacitat de nodrir-se de la planta per part de les larves, i per tant desembocaria en un menor creixement i a un retard en el desenvolupament larvari.

En altres estudis han descrit que, en alimentar larves d'insectes en plantes transgèniques que expressen IPs, no es detectà cap reducció del creixement o desenvolupament de la larva, arribant a observar, fins i tot, l'efecte contrari. Així, molts estudis han demostrat que l'ingesta d'IPs a baixes dosis (per sota d'un determinat llindar), la expressió d'IPs que es troben ja en els teixits que la larva consumeix en la seva dieta habitual, o bé l'ús d'IPs que no són efectius per inhibir les proteases majoritàries del sistema digestiu de l'insecte problema, condueixen al desenvolupament de resistència per part de l'insecte (Broadway *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1998a i 1998b; De Leo *et al.*, 1998 i 2001; Bonadé-Bottino *et al.*, 1999).

Aquestes estudis evidencien la necessitat de realitzar estudis en profunditat per cada cas inhibidor de proteasa - insecte problema, tant a nivell de capacitat d'inhibició com d'especificitat per a les proteases digestives de l'insecte-problema en relació al tipus d'alimentació d'aquest. L'anàlisi posterior mitjançant l'expressió transgènica, de l'efecte *in vivo* en el creixement i desenvolupament de l'insecte, així com de l'efecte de la ingesta de l'IP en el sistema digestiu de l'insecte-problema, ens donaran les claus per determinar la idoneïtat de l'IP per a la protecció de la planta contra una determinada plaga, i si aquesta serà susceptible o no de desenvolupar resistència a l'IP.

En el present treball, s'ha constatat que l'inhibidor MPI és capaç d'inhibir el 40% del total de les activitats proteolítiques digestives de *Chilo* (assaigs *in vitro*). Aquests resultats són similars als anteriorment obtinguts en el laboratori amb *Spodoptera littoralis*, i suggereixen que l'efecte de l'inhibidor MPI sobre les proteases digestives d'ambdós lepidòpters, *C. suppressalis* i *S. littoralis*, és molt semblant. En ambdós lepidòpters, una part important de l'activitat proteolítica present en el tracte digestiu de les larves, és susceptible de ser inhibida per la proteïna MPI.

Així mateix, s'analitzà la capacitat d'inhibició *in vitro* de l'MPI front les activitats digestives de larves alimentades en plantes transgèniques MPI (veure *Figura 85* d' *I.Resultats*). En aquest cas, l'efecte inhibitor fou menor (d'aproximadament el 20% d'inhibició) que l'observat per les larves alimentades en plantes control. Per una banda aquest fet podria donar-se perquè, una fracció de les activitats proteolítiques de les larves alimentades en les línies *mpi*, ja es troba inhibida per efecte de l'expressió del transgen. Tanmateix, aquesta disminució de la capacitat d'inhibició per l'MPI podria reflectir l'augment, també observat en aquest treball, de l'activitat proteolítica del sistema digestiu i participació de noves proteases insensibles a l'MPI.

Cal tenir en compte que els resultats d'inhibició *in vitro* poden reflectir situacions que *in vivo* es donaran de manera o amb intensitat diferents. És evident que hi ha diferents factors que poden intervenir (les proteases dels extractes proteics poden ser extreïdes diferencialment; l'accessibilitat de les proteases per a l'inhibidor "ingerit" *in vivo*; la diferent afinitat/estabilitat del complex proteasa/MPI segons sigui en condicions *in vitro* o *in vivo*; l'especificitat de substrat de la proteasa susceptible d'inhibició per l'MPI, etc.) i cal tenir en compte que en el nostre estudi s'estan detectant proteases amb capacitat de degradar caseïna, la qual no és el substrat natural de les proteases digestives d'aquestes larves.

Tot i això, els resultats *in vivo* derivats dels bioassaigs ens confirmen que, la inhibició de les proteases de l'intestí de *Chilo suppressalis* per part de l'MPI que també s'observa en els assaigs *in vitro*, es suficient per afectar el creixement i desenvolupament de les larves *in vivo*; així mateix, malgrat que les larves alimentades en les línies d'arròs *mpi* presenten un augment de la seva activitat proteolítica digestiva, no s'han observat efectes no desitjats, p.ex. major creixement de les larves o fenòmens d'adaptació en aquesta generació que permetin sobrepassar l'efecte de l'inhibidor MPI.

L'espectre que compon la diversitat de proteases digestives de l'intestí dels insectes, està encara per determinar completament. Tot i això, els anàlisi bioquímics dels extractes d'intestins de gran varietat d'insectes indica que deuen existir entre tres i sis classes principals d'activitats proteolítiques, que englobarien de 10 a 20 activitats minoritàries (Jongsma *et al.*, 1996). En el cas dels lepidòpters, la major part dels estudis s'han centrat majoritàriament en les activitats proteolítiques del tipus serinaproteasa, i més concretament

en les activitats tripsina i quimotripsina, que són majoritàries en l'intestí dels insectes d'aquest ordre (Johnston *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ortego *et al.*, 1996; Novillo *et al.*, 1999; Mazumdar-Leighton *et al.*, 2000). Tanmateix existeixen diferents estudis que demostren la participació, en menor grau que les serinaproteases, d'altres classes de proteases en les activitats digestives dels lepidòpters; així, diferents lepidòpters presenten activitats cisteïnoproteasa (Jongsma *et al.*, 1996, Iarygin *et al.*, 2001; Patankar *et al.*, 2001), aspartilproteasa (Iarygin *et al.*, 2001; Patankar *et al.*, 2001; i el present estudi) i metal·loproteasa (Lenz *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Ortego *et al.*, 1996; Valaitis *et al.*, 1999; Patankar *et al.*, 2001). Aquest ventall d'activitats diferents és més ampli en els insectes polífags, ja que es veuen confrontats a una varietat més gran d'IPs de plantes (Patankar *et al.*, 2001).

En aquest treball es determinà la participació de determinats tipus de proteases en els digestius de larves de *Chilo*, mitjançant una bateria d'inhibidors dirigits contra activitats proteàsiques específiques. Aquests inhibidors han sigut utilitzats també per altres autors per a la caracterització de les proteases digestives de diferents ordres d'insectes (Lee *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1995; Bian *et al.*, 1996; Jongsma *et al.*, 1996; Novillo *et al.*, 1997a, 1997b i 1999; Gatehouse *et al.*, 1999; Ortego *et al.*, 1996 i 2000; Wilhite *et al.*, 2000). D'aquest estudi es conclou que, en el sistema proteolític digestiu de les larves de *Chilo suppressalis*, hi intervenen activitats del tipus serinaproteasa i aspartilproteases com a activitats majoritàries (veure *Figura 86* de l'apartat *I.Resultats*). Aquest resultat es desprèn de l'observació d'una important reducció de les activitats proteolítiques totals de larves de *Chilo*, per part dels inhibidors que presenten especificitat per a les activitats serinaproteasa (com són els inhibidors Leupeptin, Soybean Bowman-Birk Inhibitor (SBBi) o Chymostatin) o aspartilproteases (inhibidor Pepstatin), que en tots els casos fou superior al 40% de l'activitat proteolítica digestiva, i que arribà al 95% en el cas de l'inhibidor Leupeptin. Així mateix, aquest estudi en ha permès determinar que en el sistema digestiu de *C. suppressalis*, hi participen serinaproteases del tipus tripsina i quimotripsina, essent les proteases del tipus elastasa menys importants quantitativament.

Les activitats de tipus elastasa, malgrat ser quantitativament menys importants que les activitats tripsina o quimotripsina, són presents en molts digestius de lepidòpters (Houseman *et al.*, 1991; Markwick *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1995; Ortego *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1999). Cal esmentar que estudis preliminars, que hem realitzat amb substrats específics per a elastases (SA₃PNA), apunten cap a una participació més important, de l'observada amb el substrat general caseïna, d'activitats elastasa en el sistema digestiu de *Chilo suppressalis*; així mateix, tampoc es pot desestimar la presència de cisteïnoproteases en l'intestí de *Chilo*. Estudis posteriors, amb un ventall més ampli i específic d'inhibidors, ens

permetran determinar amb més exactitud la implicació de cisteïnaproteases, així com d'altres activitats, en les activitats proteolítiques digestives de *C. suppressalis*.

L'eficàcia de l'inhibidor MPI front les larves de *C. suppressalis* a uns nivells d'acumulació en planta que, si es comparen amb altres estudis, podrien considerar-se com insuficients, podria recaure en diferents factors. Per una banda, la bifuncionalitat de l'inhibidor MPI front activitats quimotripsina i elastasa és un factor important per a explicar l'eficàcia d'aquest inhibidor. Així, la possible adaptació de l'insecte per compensar l'efecte de l'ingesta de l'inhibidor MPI amb producció de noves proteases, es veuria dificultada; aquests canvis adaptatius doncs, serien ineficaços en el cas en estudi degut a la bifuncionalitat de l'inhibidor MPI, i podrien predir, en part, la dificultat de *Chilo* d'adaptar-se a l'ingesta d'MPI en una generació.

Així mateix, diferents autors han demostrat que els insectes monòfags presenten menys capacitat adaptativa a l'ingesta d'IPs que insectes polífags o generalistes (Broadway *et al.*, 1995; De Leo *et al.*, 2001; Patankar *et al.*, 2001). *Chilo suppressalis* és un lepidòpter bàsicament monòfag i s'alimenta quasi exclusivament de plantes d'*Oryza sativa*, i només s'ha detectat larves esporàdicament en plantes de *Panicum miliaceum* (mill), *Echinochloa spp.* (panissola), *Phragmites communis* (senill), *Zea mays* (blat de moro), *Sorghum spp.* (melca), *Typha latifolia* (Balca) o *Zizania aquatica* (anomenat arròs salvatge), sense que s'hagi demostrat l'alimentació habitual de *C. suppressalis* (Walker) en aquestes espècies; el fet que aquest lepidòpter monòfag no està *pre-adaptat* a l'inhibidor de blat de moro, ja que no és una planta de la que s'alimenti habitualment, seria un factor més que permetria esperar que l'adaptació de les larves de *Chilo* front l'inhibidor MPI sigui dificultosa.

1.5 Efecte de l'inhibidor MPI en les activitats proteolítiques de digestives de *Cacyreus marshalli*

Cacyreus marshalli és la plaga més important del gerani, planta de gran importància econòmica en el sector de producció d'ornamentals. Aquest lepidòpter, introduït des d'Àfrica sudoriental, s'ha estès ràpidament per tota la zona mediterrània esdevenint una plaga molt difícil de combatre. Els mètodes de lluita biològica es veuen limitats pel fet que no es coneixen predadors naturals d'aquesta plaga a la regió mediterrània; per altra banda, el gran nombre de generacions que presenta aquest lepidòpter en un sol any, així com el seu caràcter de minador, fan que la lluita química hagi de ser intensiva i resulti poc efectiva. Degut a la problemàtica mediambiental que suposa la lluita química, així com al perfeccionament de les tècniques de transformació de vegetals, actualment s'estan desenvolupant noves estratègies per a la protecció del gerani contra *Cacyreus marshalli*.

Una de les estratègies actuals que s'estan investigant és l'expressió de la toxina de *Bacillus thuringiensis Bt* mitjançant transgènia, estratègia que s'ha demostrat eficaç per aconseguir elevats percentatges de mortalitat en altres lepidòpters (Herrero *et al.*, 2001 i 2002).

Demostrada la capacitat de l'inhibidor MPI de conferir protecció a les plantes d'arròs front el també lepidòpter i barrinador, *Chilo suppressalis*, es va decidir determinar la utilitat d'aquesta estratègia en el cas del lepidòpter *Cacyreus*, per a la protecció de la planta *Pelargonium*.

Tot i que el Barrinador del gerani és una de les plagues més difícils d'eradicar en el sector del cultiu d'ornamentals, no s'han descrit en la literatura estudis sobre el sistema digestiu de *Cacyreus marshalli*. En aquest treball es realitzaren estudis preliminars sobre les activitats proteolítiques de l'intestí de larves de *Cacyreus marshalli*. El sistema digestiu d'aquest lepidòpter presentà activitats proteolítiques digestives amb un pH òptim alcalí de pH 10,0 (veure *Figura 87* a l'apartat 1.5.1 de *I. Resultats*). Aquest resultat concorda amb els resultats anteriorment descrits sobre el pH alcalí del sistema digestiu dels lepidòpters.

L'anàlisi d'extractes d'intestí de larves de *Cacyreus* va permetre determinar que, en les mateixes condicions de preparació dels extractes proteics d'intestí, l'activitat proteàsica de l'intestí d'aquest lepidòpter és molt superior als nivells proteolítics observats per altres lepidòpters com *Chilo suppressalis* o *Spodoptera littoralis* (veure *Figura 89* a l'apartat 1.5.2 de *I. Resultats*). Es pogué demostrar que activitats susceptibles d'inhibició per Elastatinal i Chymostatin (tipus elastasa i quimotripsina), corresponen aproximadament al 50-60% del total de les proteases digestives de *Cacyreus*. En el present estudi no s'ha valorat l'aportació de les serinaproteases del tipus tripsina, habitualment molt abundants en el sistema digestiu de lepidòpters. Nous estudis utilitzant un ventall més ampli d'inhibidors, així com de substrats, per a diferents activitats permetran determinar la implicació d'altres tipus de proteases en el sistema digestiu de *Cacyreus marshalli*. L'assaig d'inhibició *in vitro* de les activitats proteiques d'extractes d'intestí de larves de *C. marshalli*, ens permet afirmar que l'inhibidor de proteases MPI pot inhibir un percentatge important de l'activitat proteolítica total de *Cacyreus*.

Aquests estudis preliminars suggereixen que l'estratègia de protecció de *Pelargonium* mitjançant l'expressió del gen de l'inhibidor MPI, pot ser factible per a la lluita contra el Barrinador del gerani. En el nostre laboratori ja s'està treballant per a l'obtenció de plantes transgèniques de gerani amb el gen *mpi*, per tal de confirmar definitivament la idoneïtat d'aquest inhibidor de proteases contra *Cacyreus marshalli*.