

## **II. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA FRONT FITOPATÒGENS**

L'agricultura moderna amb l'ús intensiu de monocultius amb poca diversitat genètica ha fet augmentar significativament la susceptibilitat a patògens; així a nivell mundial, les pèrdues globals degudes a patògens representen aproximadament el 12% de la producció potencial de collites, això sense comptar les pèrdues post-collita també causades per patògens. Les pèrdues es donen malgrat l'increment de la quantitat de fungicides aplicats anualment (Shah, 1997). En els últims deu anys, el desenvolupament de les tècniques de transgènia han permès explorar i validar noves estratègies per al control de les malalties fúngiques dels cultius. La transgènia ha permès travessar les barreres entre espècies i permetre la introducció de gens, de plantes no relacionades o de gens d'altres organismes, en diferents espècies vegetals. En el present estudi hem analitzat les propietats antifúngiques de diferents proteïnes o pèptids d'origen no vegetal, amb la finalitat de poder avaluar el potencial dels seus gens corresponents per al desenvolupament de plantes resistents a fitopatògens.

Les pèrdues més importants, degudes a fongs fitopatògens, es donen en els cultius de hortalisses, fruites i cereals, destacant els greus efectes en el cultiu d'arròs. En el cas del cultiu de l'arròs, la malaltia fúngica més important és la *Piriculariosi* i el seu principal causant és *Magnaporthe grisea*. Els nostres estudis s'han centrat en aquest important fong fitopatogen de l'arròs, així com en el fong *Fusarium moniliforme* (causant de malalties a gran nombre de collites de diferents cereals, inclòs l'arròs; actualment *F. verticillioides*) i l'oomicet *Phytophthora infestans* (infecta diferents espècies de Solanàcies, com el tomàquet o la patata).

Una part del present treball s'ha centrat en el pèptid cecropina A així com els pèptids derivats de la seva regió N-terminal, el pèptid Pep3 i el seu trímer. Així mateix, s'han analitzat les propietats antifúngiques i característiques de la proteïna antifúngica AFP, excretada pel fong filamentós *Aspergillus giganteus*.

### **II.1. Activitat antifúngica de la Cecropina A sobre fitopatògens**

En la literatura s'han descrit alguns estudis realitzats amb la cecropina B, o anàlegs sintètics d'aquesta, i la seva activitat antifúngica. En el nostre laboratori hem centrat els estudis en la cecropina A i pèptids sintètics derivats d'ella.

Els assaigs *in vitro*, d'inhibició del creixement fúngic de *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*, ens han permès confirmar l'activitat antifúngica de la cecropina A a concentracions en el rang baix de  $\mu\text{M}$ . Així hem pogut determinar que concentracions de

IC<sub>50</sub> de 5-7µM són suficients per inhibir el 50% (IC<sub>50</sub>) del creixement fúngic de *Fusarium*, i que valors lleugerament més baixos (3-4µM) permeten inhibir el 50% del creixement de *Magnaporthe* (veure Figures 91 i 92 de l'apartat II.1.1 de II. Resultats). Si bé la IC<sub>50</sub> fou similar per a ambdós fongs, la MIC (o concentració mínima inhibidora) varià significativament; així el creixement de *F. moniliforme* s'inhibia completament amb concentracions de l'ordre de 7µM de cecropina A, mentre que no es pogué assolir la inhibició total del creixement de *M. grisea* a concentracions menors o iguals a 15µM (concentració màxima assajada).

En l'expressió de gens de proteïnes o pèptids antifúngics en plantes transgèniques, com a estratègia per a combatre les infeccions per fongs fitopatògens, és de gran importància considerar el lloc d'acumulació del producte gènic. L'acumulació de l'agent antifúngic en l'espai intercel·lular comporta dues avantatges: per una banda, permetria frenar la infecció en estadis primerencs, ja que molts fongs fitopatògens envaeixen aquest espai en el procés inicial de penetració dels teixits vegetals; i per altra banda, l'activitat antifúngica no dependria de la lisi cel·lular per a què actués l'agent antifúngic. Tanmateix, aquesta estratègia també comporta cert risc, ja que la proteïna o pèptid antifúngic podria ser susceptible de degradació per les proteases existents en els fluids intercel·lulars (ICFs) de la planta. Varis estudis han demostrat que proteases del fluid intercel·lular són capaces de degradar, i per tant de disminuir o anular l'activitat de pèptids o proteïnes antifúngiques, la cecropina B inclosa (Mills *et al.*, 1994; Florack *et al.*, 1996; Owens & Heutte, 1997; Okamoto *et al.*, 1998). Tanmateix aquesta degradació, que es dona via proteòlisi limitada, varia molt segons l'espècie vegetal (Owens & Heutte, 1997). Altres estudis realitzats amb la cecropina B demostren que la seva vida mitja en ICFs d'arròs és molt més llarga (més d'un dia) que la observada en presència d'altres fluids com patata (minuts) o tabac (hores); així mateix, estudis en què la cecropina B s'expressa en l'espai extracel·lular de plantes d'arròs, aquest pèptid no es veu degradat per les proteases de la planta i confereix resistència al bacteri *Xanthomonas oryzae* (Sharma *et al.*, 2000). És doncs convenient realitzar estudis encaminats a determinar l'activitat antifúngica del pèptid o proteïna en presència d'ICFs de l'espècie vegetal on es voldrà expressar, per tal de preveure el comportament de l'agent antifúngic en la planta transgènica.

Amb aquest objectiu es realitzà un assaig d'inhibició del creixement de *Fusarium moniliforme* amb la cecropina A en presència d'extractes proteics d'ICF d'arròs, ja que l'arròs és el cultiu en el que centrem els nostres estudis de millora de la resistència a fongs. Els resultats obtinguts (es mostren a la Figura 93 de l'apartat II.1.1 de II. Resultats) ens permeten concloure que l'activitat antifúngica de la cecropina A no es veu afectada per la presència d'ICFs d'arròs, fent factible l'estratègia d'expressió de la cecropina A en l'espai intercel·lular de plantes per a combatre malalties fúngiques.

A part de l'estudi de l'activitat antifúngica de la cecropina A, també vàrem realitzar assaigs d'inhibició del creixement fúngic amb el pèptid Pep3, derivat de la cecropina A, i amb el seu trímer. Aquest pèptid és un 11-mer de la regió N-terminal de la cecropina A amb la substitució de dos aminoàcids (Leu<sub>8</sub> i Leu<sub>11</sub>) (veure apartat 6.1 de la *Introducció*). El Trímer-Pep3 resulta de la unió de tres monòmers de Pep3 separats per la seqüència espaiadora AGPA, que no trenca l'estructura del monòmer. El disseny d'aquest pèptid fou realitzat basant-se en consideracions sobre la estructura secundària en hèlix- $\alpha$  (característica bàsica per a la seva funcionalitat com a antifúngic) així com per a minimitzar la degradació per proteases d'origen vegetal (Cavallarin *et al.*, 1998). Diferents estudis han demostrat que modificacions de la seqüència aminoacídica de pèptids antimicrobians coneguts permeten el manteniment o fins i tot l'increment de la potència antifúngica, antibacteriana o antivírica (Osborn *et al.*, 1995; Marcos *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1995; Rao, 1995; Reed *et al.*, 1997; Tossi *et al.*, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998; Tiozzo *et al.*, 1998).

Els assaigs d'inhibició del creixement dels fongs fitopatògens *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea*, realitzats amb el Pep3 i amb el Trímer-Pep3, varen permetre determinar que, tant el pèptid curt derivat de la cecropina A com el seu trímer, conserven l'activitat antifúngica també observada per la cecropina A.

Tant pel pèptid Pep3 com pel seu trímer, els valors d'IC<sub>50</sub> per a *Fusarium* foren quasi idèntics als observats per al mateix fong i la cecropina A. Pel contrari, els valors MIC per el Pep3 i el seu trímer augmentaren fins a 25-30 $\mu$ M respecte la MIC observada per la cecropina A (veure la *Taula 114* on es resumeixen els valors obtinguts). L'assaig amb *F. moniliforme* i el Trímer-Pep3 ha permès demostrar que la juxtaposició de monòmers del Pep3 separats per la seqüència espaiadora AGPA constitueix un trímer funcional i amb activitat antifúngica.

L'activitat antifúngica del pèptids en hèlix- $\alpha$  es postula que radica en la seva habilitat per formar porus a través de les bicapes lipídiques de microorganismes, així serien necessaris com a mínim 20 aminoàcids de llargada perquè el pèptid pogués abastar completament la porció de bicapa lipídica (Lear *et al.*, 1988; Anzai *et al.*, 1991); així doncs, el mecanisme pel qual actuen pèptids de menys de 20 aminoàcids, com és el cas del Pep3, seria diferent i es postula que seguiria el model "catifa" (veure *Figura 24* de l'apartat 6 de *Introducció*). Els pèptids en conformació d'hèlix- $\alpha$  es situarien de manera paral·lela a la bicapa i, un cop assolida una concentració lliardar, s'integrarien en la capa exterior que patiria un engruiximent produint una forta tensió; els diferents monòmers, de manera cooperativa, formarien porus toroïdals que conduiria a l'internalització del pèptids i, finalment, al col·lapse de la membrana (Shai, 1995; Oren & Shai, 1998; Matsuzaki, 2001; Zasloff, 2002).

Per altra banda, els assaigs *in vitro* del pèptid Pep3 amb *Magnaporthe grisea*, mostren un valor IC<sub>50</sub> de quasi un ordre de magnitud més gran que l'IC<sub>50</sub> obtinguda per a la cecropina A. Aquests assaigs també ens han permès comprovar que, contràriament al que passava amb *Fusarium moniliforme*, el Trímer-Pep3 no presenta activitat antifúngica front *M. grisea*. La diferència en la llargada entre el Pep3 i el Trímer-Pep3 podria condicionar el mecanisme antifúngic pel qual presenten activitat contra fongs específics (Oren & Shai, 1998; Zasloff, 2002). Així mateix, les diferències en l'especificitat d'inhibició del creixement de diferents espècies de fongs, és una característica dels pèptids antifúngics que s'ha observat sovint (Oren & Shai, 1998; Osborn *et al.*, 1995). Les diferències en l'estructura de les membranes de les diferents espècies de fongs poden ser una de les causes, fent que la interacció entre els pèptids i la membrana variï, i en conseqüència que la potència antifúngica del pèptid sigui diferent segons el fong estudiat.

		Cecropina A	Pep3	Trímer-Pep3
<i>Fusarium moniliforme</i> ( <i>F. verticillioides</i> )	IC <sub>50</sub>	5-6 µM	5-7 µM	5-7 µM
	MIC	7 µM	30 µM	25 µM
<i>Magnaporthe grisea</i>	IC <sub>50</sub>	3-4 µM	20 µM	-
	MIC	>15 µM	40 µM	-

**Taula 114:** Valors d'IC<sub>50</sub> i MIC obtinguts en assaigs *in vitro* d'inhibició del creixement de *Fusarium moniliforme* i *Magnaporthe grisea* per a la cecropina A, i pels pèptids sintètics Pep3 i Trímer-Pep3 derivats de la mateixa. (-) indica que no existeix inhibició del creixement fúngic.

L'activitat antifúngica del pèptid Pep3 ha estat analitzada en altres estudis al nostre laboratori i per altres autors, front altres patògens (*Fusarium spp.*; *Phytophthora infestans* (oomicet patògen de solanàcies), *Botrytis cinerea*, *Trichoderma spp.*, o *Erwinia spp.* entre d'altres) donant en tots els casos un resultat d'inhibició del creixement, obtenint l'IC<sub>50</sub> a concentracions compreses en el rang 2-6 µM (Cavallarin *et al.*, 1998; Ali & Reddy, 2000). A més a més, s'ha demostrat que l'aplicació tòpica del Pep3 en tubercles de patata permet la reducció al 50% dels símptomes de la malaltia produïda per *Alternaria solani* o *Phytophthora infestans* a concentracions baixes d'aproximadament 2µM, i la reducció del 100% dels símptomes a 20µM; així mateix, l'aplicació del pèptid en les fulles de patata prevé la infecció pels dos fongs citats; a aquestes concentracions, el Pep3 no presenta fitotoxicitat per plantes de patata (Ali & Reddy, 2000).

Vista l'eficàcia d'aquest pèptid per inhibir el creixement *in vitro* de gran varietat de patògens vegetals (fongs, oomicets i bacteris), així com el cert grau d'estabilitat que presenta davant d'ICFs d'arròs, aquest pèptid es presenta com a un bon candidat per a ser

introduït, mitjançant transgènia, en arròs per tal de millorar-ne la resistència a l'atac de patògens.

## **II.2. Activitat antifúngica de la proteïna AFP d'*Aspergillus giganteus***

Diferents estudis han demostrat l'activitat antifúngica de molècules provinents de microorganismes del sòl, i s'ha pogut comprovar la seva efectivitat, tant *in vitro* com *in vivo* (plantes transgèniques), per a controlar el creixement de fongs fitopatògens. La majoria dels gens utilitzats per a la millora de la resistència a fitopatògens, codifiquen per proteïnes amb activitats glucanasa o quitinasa, i provenen principalment del fong micoparàsit *Trichoderma spp.* (*chi42*) o del bacteri del sòl *Serratia marcescens* (*chiA*) (Bolar *et al.*, 1997; Lorito *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Kikkert *et al.*, 2000; i Jones *et al.*, 1988; Suslow *et al.*, 1988; Jach *et al.*, 1992; Howie *et al.*, 1994).

Tanmateix, altres estudis s'han encaminat cap a la recerca de noves molècules antifúngiques que són secretades per fongs filamentosos com *Aspergillus* o *Penicillium* (Olson & Goerner, 1965; Lacadena *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999; Geisen, 2000). En el present treball ens hem centrat en l'estudi d'una de les proteïnes que secreta el fong *Aspergillus giganteus*, la proteïna AFP. En estudis preliminars, aquesta proteïna mostrà activitat antifúngica *in vitro* contra determinats fongs filamentosos (*Trichoderma koningii*, *T. harzianum*, *Penicillium purpurogenum*, *Fusarium oxysporum*), així com una elevada estabilitat tèrmica i resistència a la proteòlisi (Lacadena *et al.*, 1995; Martínez-Ruiz, 2000). En el present treball s'ha determinat l'activitat antifúngica *in vitro* de l'AFP front a fongs fitopatògens, com és ara *Magnaporthe grisea*, responsable de la Piriculariosi de l'arròs.

Els assaigs *in vitro* d'inhibició del creixement fúngic amb la proteïna AFP ens permeten afirmar que aquesta proteïna presenta una elevada potència antifúngica front *Magnaporthe grisea* i *Fusarium moniliforme*. Les IC<sub>50</sub> per aquests dos fongs fitopatògens s'assoliren a concentracions tan baixes com 50nM i 7nM respectivament. Així mateix, per l'oomicet *Phytophthora infestans*, la IC<sub>50</sub> s'assolí amb concentracions baixes en el rang de micromolar (2,5µM). Els valors MIC per els tres patògens també foren relativament baixes, essent 4µM per *M. grisea*, 100nM per *F. moniliforme* i 10µM per l'oomicet *P. infestans* (veure Figures 97 i 98 de l'apartat II.2.1 de II. Resultats).

Aquests valors són comparativament baixos en relació amb altres proteïnes antifúngiques d'origen vegetal i que han estat àmpliament estudiades, com són les defensines o les tionines (Terras *et al.*, 1992; Cammue *et al.*, 1992; Molina & García-Olmedo, 1993a), amb les que la proteïna AFP comparteix semblança en l'estructura (Bruix *et al.*, 1993; García-Olmedo *et al.*, 1998). Així mateix, si comparem la potència antifúngica de la proteïna AFP amb els pèptids antifúngics assajats (cecropina A, Pep3 o TrímerPep3) aquesta presenta

una activitat antifúngica més forta contra *Fusarium* o *Magnaporthe* que la cecropina A (o els pèptids derivats d'ella). En el cas de *Phytophthora infestans*, la potència antifúngica de l'AFP és similar a la que presenten els altres pèptids antifúngics aquí estudiats front aquest oomicet (Cavallarin *et al.*, 1998; Ali & Reddy, 2000).

L'observació microscòpica dels cultius dels diferents fongs crescuts en presència de proteïna AFP revelen que, tant els dos fongs fitopatògens com l'oomicet, presentaren marcades anomalies morfològiques que consistiren en la deformació de les hifes, augment del nombre de septes, ramificacions anormals dels micelis i, en el cas de *Phytophthora*, a més a més la inducció de la formació d'esperangis (Vila *et al.*, 2002). Els canvis morfològics en les hifes o espores fúngiques degut a la presència de molècules antifúngiques ha estat observat en altres estudis *in vitro* amb molècules antifúngiques (Lorito *et al.*, 1993; Cavallarin *et al.*, 1998; Ali & Reddy, 2000).

L'estudi de l'activitat antifúngica *in vitro* de la proteïna AFP s'amplià a altres fongs del gènere *Fusarium*, tots ells importants patògens de plantes (*Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* i *Microdochium nivale* (abans anomenat *Fusarium nivale*)). Tots aquests fongs fitopatògens es varen veure afectats, en major o menor grau, per la presència de la proteïna AFP, obtenint valors d'IC<sub>50</sub> propers a 10nM en la majoria dels casos (excepte *F. culmorum* que presentà una IC<sub>50</sub> superior, entre 10-100nM). També s'assajà l'activitat antifúngica de l'AFP front *Magnaporthe salvinii*, fong que causa el podriment de la tija, una altra important malaltia dels arrossars. Aquest fong presentà el mateix grau de susceptibilitat que *M. grisea*, amb una IC<sub>50</sub> entre 10 i 100nM.

A part de l'ampli espectre de fongs fitopatògens pels quals la proteïna AFP presenta activitat inhibidora (i en certs casos amb una elevada potència antifúngica), cal destacar l'efecte inhibidor del creixement *in vitro* de l'oomicet *Phytophthora infestans*. *P. infestans* ha estat la malaltia més important del conreu de patata: l'any 1840 provocà la pitjor pèrdua de collites a Europa provocant una gran epidèmia de fam en la que varen morir gran nombre de persones; malgrat els esforços per a controlar aquest oomicet, tant químicament com mitjançant els creuaments d'espècies més resistents, soques més agressives d'aquest oomicet han ressorgit i s'han estès ràpidament a nivell mundial (Fry & Goodwin, 1997). Els oomicets, a diferència dels fongs, no presenten quitina a la paret cel·lular i l'estratègia d'expressar quitinases (d'origen vegetal o provinents de microorganismes), que dona molts bons resultats per a la millora d'espècies vegetals front determinats fongs, no és aplicable a la protecció front oomicets. L'expressió del gen *afp* en plantes és presenta doncs, com una bona alternativa per a lluitar contra gran nombre de patògens de plantes, inclosos els oomicets.

Fins a l'actualitat no es coneix el mode d'acció de la proteïna AFP. En el nostre laboratori, estudis preliminars amb AFP marcada amb FITC, semblen indicar que la proteïna AFP es localitza en els àpexs de les hifes de *Magnaporthe grisea*, on al mateix temps s'observa lisi cel·lular. Així mateix, s'estan duent a terme estudis amb microscopia electrònica de transmissió utilitzant la proteïna AFP, marcada amb nanopartícules d'or, per a la seva posterior localització subcel·lular en el fong *M. grisea*. També es duran a terme estudis per a comprovar si la proteïna AFP té alguna acció ribonucleásica, ja que presenta homologia estructural amb les proteïnes de tipus RIP descrites (Martínez-Ruiz, 2000). Recentment, Theis i col·laboradors han proposat una hipòtesis sobre el mecanisme general pel qual la proteïna AFP actuaria sobre diferents fongs filamentosos (Theis *et al.*, 2002, *en premsa*). A grans trets, sembla que la proteïna AFP podria unir-se a algun component de la membrana fúngica. Aquesta unió seria deguda probablement a una interacció iònica, i el creixement fúngic seria inhibit. Tot i això, fins a una certa concentració d'AFP, el fong podria seguir creixent sense que hi hagués permeabilització de la membrana. En assolir un llindar (específic per a cada espècie de patogen) la interacció entre la proteïna AFP i la membrana fúngica conduiria a la formació de porus i a la permeabilització de la membrana (Theis *et al.*, 2001).

Per altra banda, els darrers estudis presentats pel Dr. A. Martínez del Pozo, aporten noves dades pel que a fa al possible mode d'acció de la proteïna AFP. Per una banda, s'ha demostrat que la proteïna AFP interacciona fortament amb vesícules de fosfolípids àcids. Així mateix, i basant-se també en les característiques estructurals de la proteïna AFP, proteïna que conté un motiu estructural d'unió a oligonucleòtids/oligosacàrids (*OB-fold containing protein*), s'explica la propietat d'unió a àcids nucleics que presenta l'AFP, fet que caracteritza aquest grup de proteïnes, i que promou la neutralització de la càrrega i condensació de l'ADN (Martínez del Pozo *et al.*, 2002).

Diferents estudis han demostrat que la coexpressió de dos o més agents antifúngics, p.ex. quitinases i glucanases (o quitinases i RIPs) augmenten les propietats de resistència de la planta a infeccions (Van den Elzen *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Jach *et al.*, 1995; Melchers & Stuver, 2000). Tot i que la proteïna AFP per si sola ja presenta una elevada potència antifúngica contra un gran ventall de fongs i oomicets, i que el Pep3 també presenta activitat *in vitro* contra diferents fongs fitopatògens, es va voler determinar un possible efecte sinèrgic o additiu entre aquestes dues molècules antifúngiques. L'assaig antifúngic *in vitro* amb *M. grisea*, amb concentracions d'AFP i Pep3 corresponents a les IC<sub>50</sub> per aquest fong, ens permet concloure que, a aquestes concentracions, no existeix un efecte sinèrgic o additiu en l'acció d'aquestes dues molècules. Tanmateix cal destacar que tampoc s'observà un efecte antagònic, pel que l'acció conjunta d'ambdues molècules no sembla que

pogués ser contraproductiu, al contrari, podria permetre augmentar el ventall de fongs susceptibles de ser inhibits.

Així mateix s'ha pogut comprovar que la proteïna AFP presenta una elevada estabilitat: l'AFP es mantingué estable després de 48h d'incubació en cultiu fúngic *in vitro*, presentà una alta estabilitat i resistència a la proteòlisi, així com a la desnaturalització (veure *Figures 103 i 104* de l'apartat II.2.3 de II. *Resultats*). Així doncs, les característiques estructurals de la proteïna AFP fan que sigui molt estable i resistent a la proteòlisi, tal com s'ha demostrat tant en aquest estudi com en estudis anteriors realitzats per Lacadena *et al.* (1995).

La proteïna AFP no presenta activitat contra llevats o bacteris (Lacadena *et al.*, 1995), així com tampoc s'ha detectat que presenti activitat contra cèl·lules humanes (Nayaka *et al.*, 1995). Tanmateix, era important determinar si l'AFP presenta toxicitat contra cèl·lules d'arròs. En diferents estudis, on s'expressen molècules antifúngiques en diferents espècies vegetals, s'han descrit efectes tòxics per a les plantes transformades que expressaven aquestes molècules (Broekaert *et al.*, 1997; Zoubenko *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1999). En el cas de l'AFP, hem pogut demostrar que la viabilitat de protoplastes d'arròs no disminueix als ser incubats amb concentracions de la proteïna AFP, concentracions molt superiors a les IC<sub>50</sub> determinades per a diferents fongs fitopatògens assajats. Així mateix, Oldach i col·laboradors han demostrat que l'expressió de la proteïna AFP en blat no resulta en un efecte fitotòxic per la planta (Oldach *et al.*, 2001).

Amb la intenció d'utilitzar el gen *afp* com a transgen per a la protecció de plantes d'arròs front fongs patògens, es va realitzar una prova addicional per tal de comprovar si l'aplicació directe de proteïna AFP conferia protecció a plantes d'arròs infectades per *Magnaporthe grisea* (veure *Figures 106 i 107* de l'apartat II.2.5. de II. *Resultats*). Si s'observava la progressió dels símptomes d'infecció al llarg del temps, en les fulles de les plantes control apareixien lesions i, sis setmanes després de la inoculació, aquestes plantes morien a causa de la Piriculariosi. Contràriament, les plantes tractades amb proteïna AFP no arribaven a presentar símptomes d'infecció per *M. grisea* i varen sobreviure. Amb aquests resultats podem afirmar que l'aplicació directe de proteïna AFP en plantes d'arròs confereix protecció front *Magnaporthe grisea*, i obre el camí cap a noves estratègies de control de fongs fitopatògens com és ara l'aplicació directe. El fet que l'AFP sigui una proteïna que és secretada al medi exterior pel fong *Aspergillus giganteus*, facilitaria el procés d'obtenció i purificació d'aquesta (Lacadena *et al.*, 1995; Hao *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002). A part de l'aplicació directe sobre plantes, la producció d'AFP també seria interessant per a la preservació dels aliments; així es podia aplicar, tal i com s'està estudiant per a altres molècules antifúngiques (El-Neshawy & Wilson; 1997; López-García *et al.*, 2000) contra els patògens que malmeten cereals i fruits en estoc després de les collites.



L'elevada potència antifúngica de la proteïna AFP i el gran ventall de patògens que inhibeix, juntament amb l'elevada estabilitat que presenta i la no toxicitat (tant per a cèl·lules vegetals com cèl·lules eucariotes) fan de la proteïna AFP una candidata idònia per a la protecció de cultius mitjançant transgènia, concretament per a la millora de la resistència de l'arròs al fong *Magnaporthe grisea*. Actualment, en el nostre laboratori s'està treballant en l'obtenció de plantes d'arròs que expressin el gen *afp* de manera constitutiva o induïble (promotor induïble per infecció fúngica).

## A. MATERIALS

---

### 1. MATERIAL BIOLÒGIC

---

#### 1.1. Bacteris

- Soques d'*Escherichia coli*:
  - DH5 $\alpha$ F' (Hanahan, 1983): Emprada en els clonatsges
- Soques d'*Agrobacterium tumefaciens*:
  - EHA 105 (Hood *et al.*, 1993): Transformació estable de *Oryza sativa*

#### 1.2. Fongs i oomicets

S'han utilitzat les següents soques:

- *Fusarium culmorum*, Institut de Patologia Vegetal - Facultat d'Agricultura de Torino (Itàlia)
- *Fusarium lateritium*, Institut de Patologia Vegetal - Facultat d'Agricultura de Torino (Itàlia)
- *Fusarium moniliforme*, actualment anomenat *F. verticillioides* (soca aïllada de llavors de blat de moro) IBMB-CSIC (Barcelona)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (MUCL 38936) (Bèlgica)
- *Fusarium proliferatum* (soca 53N), Universitat de Lleida (Lleida)
- *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*, SP1), CIRAD (Montpellier, França)
- *Magnaporthe salvinii* (*Sclerotium oryzae*; soca ES500), CIRAD (Montpellier, França)
- *Microdochium nivale*, Institut de Patologia Vegetal - Facultat d'Agricultura de Torino (Itàlia)
  
- *Phytophthora infestans* (soca 149/98), Centro Arkaute (Vitòria)

#### 1.3. Plantes

- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Sènia
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Ariete
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Taipei 309

#### 1.4. Insectes

- Insectes lepidòpters:
  - *Chilo suppressalis* (Walker), CIRAD (Montpellier, França)
  - *Cacyreus marshalli*, Universitat de València (València)

## 2. MATERIAL NUCLEIC

---

### 2.1. Plasmidis

- **pGEMTeasy**: Plasmidi utilitzat pel clonatge de productes de PCR, Amp<sup>R</sup>, (Promega)
- **pGEX**: Plasmidi utilitzat per a l'expressió de la proteïna MPI en *E. Coli*, (Amersham Biosciences)
- **pBluescript KS o SK**: Utilitzat pels clonatsges de fragments d'ADN, i com a vector per a la transformació d'arròs mitjançant biolística, Amp<sup>R</sup>, (Stratagene)
- **pAHC17**: Plasmidi amb l'esquelet del plasmidi *pUC8* i que conté el promotor del gen de l'*Ubiquitina 1* de blat de moro (1 intró i 1 exó) i el terminador *nos*. Amp<sup>R</sup>, (Dr. Tepperman (Christensen & Quail, 1996))
- **pCAMBIA13000**: Utilitzat pels clonatsges de fragments d'ADN, i com a vector per a la transformació d'arròs mitjançant *Agrobacterium*, Kan<sup>R</sup>, Higromicina<sup>R</sup>, (CAMBIA)

## 2.2. Oligonucleòtids

Oligonucleòtids emprats en aquest treball.

Nom	Seqüència	Tm (°C)
ALL	5' AGT ACT CAA ACC TCA TGT TTT AC 3'	62
XHO	5' CCT CGA GAG ACG ATA TTT AG 3'	58
TER	5' ATG AAC CAA TGA ATC GTG AC 3'	56

## 2.3. Construccions

Construccions utilitzades en aquest treball

Construcció	Utilització
$\lambda$ m35	Conté el DNA genòmic del gen <i>mpi</i>
pSC22ubi:: <i>mpi</i> ::nos	Expressió constitutiva del gen <i>mpi</i> en arròs (biolística)
pC1300ubi:: <i>mpi</i> ::nos	Expressió constitutiva del gen <i>mpi</i> en arròs ( <i>Agrobacterium</i> )
pILTAB227	Utilitzat en biolística, portador del gen <i>hph</i> (Higromicina <sup>R</sup> ) (ILTAB, EEUU)
pGEX:: <i>mpi</i>	Expressió del gen <i>mpi</i> en <i>E. coli</i>
p2K <i>mpi</i> :: <i>gus</i> ::nos	Expressió del gen <i>uidA</i> sota control del promotor <i>mpi</i> en arròs (biolística)
pC1 <i>mpi</i> :: <i>gus</i> ::nos	Expressió del gen <i>uidA</i> sota control del promotor <i>mpi</i> en arròs (biolística)
<i>pubi</i> :: <i>gus</i> ::nos	Expressió constitutiva del gen <i>ubi</i> en arròs (biolística)
pALL.MPI	Expressió del gen <i>mpi</i> sencer (promotor -1872 a +197) en arròs (biolística)
pX.TER	Expressió del gen <i>mpi</i> sencer (promotor -689 a +197) en arròs (biolística)
S-MPI	Expressió del gen <i>mpi</i> sencer (promotor -689 a +197) en arròs ( <i>Agrobacterium</i> )
L-MPI	Expressió del gen <i>mpi</i> sencer (promotor -1872 a +197) en arròs ( <i>Agrobacterium</i> )

## 3. ANTICOSSOS

S'ha utilitzat el següent anticòs policlonal:

*Ac anti-MPI*: obtingut contra la proteïna recombinant MPI, dilució 1:1000 (Tamayo *et al.*, 2000).  
*Ac anti-AFP*: obtingut contra la proteïna AFP, dilució 1:2000 (Martínez-Ruiz *et al.*, 1997).

## 4. MEDIS DE CULTIU

### 4.1 Bacteris

#### Medi LB:

Triptona	1 %
Extracte de llevat	0,5 %
NaCl	1 %
pH 7.5 amb NaOH	

#### Medi AB per *Agrobacterium*:

20x solució AB stock	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g/l
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g/l
	autoclavar	

20x sals AB stock	NH <sub>4</sub> Cl	20 g/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6 g/l
	KCl	3 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,2 g/l
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 mg/l
	autoclavar	

Per 1l d'AB sòlid

- Barrejar 5g glucosa, 15g *Difco* agar i 900ml H<sub>2</sub>O destil·lada
- Autoclavar
- Afegir 50ml de solució AB i 50ml sals AB, i els antibiòtics adients, en el nostre cas kanamicina (concentració final 50µg/ml) i rifampicina (concentració final 25µg/ml)

## 4.2 Fongs i oomicets

**Medi PDB** (emprat per a *Fusarium sp.*, *Magnaporthe grisea* i *M. salvinii*):

Medi Potato Dextrose Broth (PDA) <i>Difco</i>	24 g/l
Agar	15 g/l
No cal ajustar el pH (ha d'estar a 5,1). Autoclavar.	
Afegir 0,03 µg de cloramfenicol (Sigma)	

**Medi V8** (emprat per a *Phytophthora infestans*):

<i>Ensaladilla russa</i> congelada	½ kilo
Aigua destil·lada	2 l
Agar	15 g/l
Autoclavar. Afegir 0,03 µg de cloramfenicol (Sigma)	

## 4.3 Plantes

**Components bàsics de medis per a cultiu *in vitro* d'arròs:**

· <i>Macroelements N6</i> ( <i>Chu et al.</i> , 1975):	KNO <sub>3</sub>	2830 mg/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400 mg/l
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	165 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185 mg/l
· <i>Microelements B5</i> ( <i>Gamborg et al.</i> , 1968):	MNSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg/l
	KI	0,75 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
· <i>Vitamines B15</i> ( <i>Gamborg et al.</i> , 1968):	Àcid nicotinic	1 mg/l
	Piridoxina HCl	1 mg/l
	Tiamina HCl	10 mg/l

· Medi MS (Murashige & Skoog, 1962)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l
	KCl	170 mg/l
	KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 mg/l
	MNSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,2 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	22,3 mg/l
	KI	0,83 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
	Àcid nicotínic	0,5 mg/l
	Piridoxina HCl	0,5 mg/l
	Tiamina HCl	0,1 mg/l
	Mio-inositol	100 mg/l
	Glicina	2 mg/l

Solució nutritiva de rec per arròs:	solució mare	dosi utilització
	KNO <sub>3</sub>	100 g/l 2 ml/l
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	350 g/l 2 ml/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75 g/l 2 ml/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35 g/l 2 ml/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 g/l 2 ml/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 g/l 2 ml/l
	NaCl	3 g/l 2 ml/l
	Fe (fer EDTA)	60 g/l 2 ml/l
<i>Oligoelements</i>	MnSO <sub>4</sub>	3,8 g/l* 2 ml/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5 g/l* 2 ml/l
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,41g/l* 2 ml/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,98g/l* 2 ml/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	19 g/l* 2 ml/l

\*(conservar a 4°C; diluir 1/10 abans de la utilització)

## 5. TAMPONS I SOLUCIONS

<b>TE</b>	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA	5 mM
<b>SSC 20x</b>	NaCl	3 M
	Citrat trisòdic deshidratat	0,3 M
<b>TMx2</b>	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	Glicerol	20 %
	SDS	4 %
	Blau de bromofenol	0,04 %
<b>PBS</b>	NaCl	136 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	pH 7,4	

## **B. MÈTODES**

---

Les tècniques de manipulació i anàlisi d'àcids nucleics i proteïnes s'ha realitzat seguint els manuals *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1998). Els mètodes que es descriuen seguidament corresponen a tècniques que s'han posat a punt en el decurs d'aquest treball o bé aquelles que resulten d'especial interès per a l'obtenció dels resultats que es presenten.

### **1. RELACIONATS AMB ÀCIDS NUCLÈICS**

---

#### **1.1 Extracció d'ADN genòmic**

Aquest mètode permet extraccions ràpides sense haver de realitzar després una purificació per gradients de clorur de cesi. Cal tenir en compte que tots els passos s'han de realitzar molt suaument per tal d'evitar la ruptura de l'ADN genòmic. Un cop obtingut l'ADN genòmic s'ha de guardar a 4°C per evitar que es fragmenti durant els processos de congelació/descongelació.

#### **Protocol:**

1. Aliquotar 5ml de tampó d'extracció en tubs de 15ml i preescalfar-los a 74°C.
2. Triturar aprox. 1g de teixit foliar en un morter prèviament refredat amb N<sub>2</sub> líquid i traslladar a un tub de 15ml amb tampó d'extracció. Invertir 3 vegades el tub.
3. Incubar de 20min a 1h a 74°C amb agitació suau.
4. Refredar a temperatura ambient. Afegir 6ml de cloroform/alcohol isoamílic (24v/1v) per tub. Barrejar les dues fases invertint el tub varies vegades suaument.
5. Centrifugar 10min a 6500 rpm a TA.
6. Transferir el sobrenedant a un tub de 15ml nou. Afegir 10 unitats d'RNAsa T<sub>1</sub> Merck. Incubar 30min a 37°C dins una estufa.
7. Afegir de nou 6ml de cloroform/alcohol isoamílic (24v/1v) per tub. Barrejar invertint el tub varies vegades suaument.
8. Centrifugar 10min a 6500 rpm a TA.
9. Transferir el sobrenedant a nous tubs de 15ml.
10. Afegir 5ml d'Isopropanol. Barrejar invertint el tub varies vegades suaument per fer precipitar l'ADN (apareixerà un cabdell blanc d'ADN).
11. Resuspendre suaument el cabdell blanc d'ADN en 300µl de tampó TE, dins un *ependorf*.
12. Comprovar la qualitat del DNA mitjançant fraccionament en una electroforesi d'agarosa i quantificar a l'espectrofotòmetre a densitat òptica 260 nm.

<i>Tampó d'extracció MATAB:</i>	Tris-HCl pH 8	100mM
	NaCl	1,4M
	EDTA	20mM
	MATAB*	2%
	PEG 6000	1%
	Sulfit de sodi	0,5%

\**mixed alkyltrimethylammonium bromide* (Sigma)

## 1.2 Obtenció d'ADN plasmídic

### 1.2.1 A gran escala

Per a l'obtenció d'ADN plasmídic a gran escala s'utilitzà el kit per midipreparacions (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Normalment s'ha partit de 50 ml de cultiu i el rendiment obtingut per plasmidis tipus pBluescript sol estar entre 75-100µg d'ADN plasmídic. L'ADN obtingut per aquest mètode és de gran puresa i lliure de DNases el qual pot ésser utilitzat en tot tipus de reaccions enzimàtiques.

### 1.2.2 Minipreparacions

El mètode utilitzat és el de la lisi alcalina descrit per Birnboim (1983). S'ha partit de 5 ml de cultiu i el rendiment obtingut normalment per plasmidis tipus pBluescript es troba entre 15-20µg d'ADN plasmídic.

## 1.3 Subclonatge de fragments d'ADN en plasmidis

### 1.3.1 Reaccions de modificació de l'ADN

Durant la realització d'aquest treball s'han emprat les següents reaccions de modificació d'ADN: digestió amb enzims de restricció, fosforilació i defosforilació, emplenat d'extrems protuberants i lligacions. Els protocols utilitzats són els descrits per Ausubel *et al.* (1998) i Sambrook *et al.* (1989). D'altra banda, també s'han tingut en compte les recomanacions dels fabricants per a cadascun dels productes utilitzats.

### 1.3.2 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode emprat està basat en la utilització d'una reïna que uneix l'ADN. S'ha utilitzat el kit *DNA and Gel Band Purification Kit* (AmershamPharmacia) seguint les instruccions del fabricant.

## 1.4 PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) és una tècnica àmpliament utilitzada per amplificar fragments d'ADN. Els protocols generals i la seva base teòrica es poden trobar en (Ausubel *et al.*, 1998).

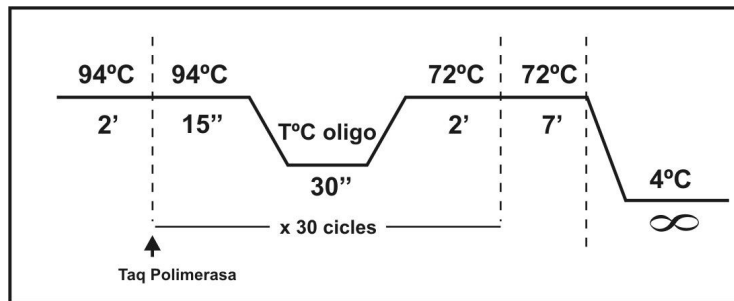
### 1.4.1 Condicions de PCR emprades en aquest treball

Les condicions generals de PCR van ser:

· **PCR utilitzant Taq Polimerasa** (per amplificació de fragments <1kb)

- 10 ng de vector on es troba el fragment que es vol amplificar
- 1 µl de cada encebador a 10 µM
- 1 µl dNTP 10 mM
- 5 µl tampó 10 x de la Taq Polimerasa
- 1,5 – 4,5 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- H<sub>2</sub>O fins 50 µl

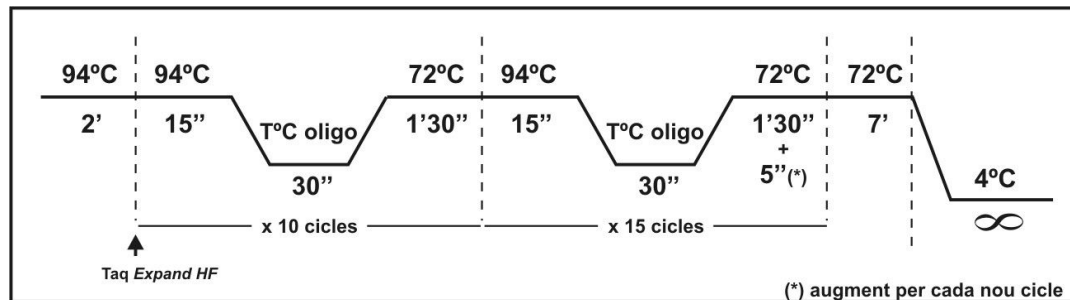
Barrejar tots els components anteriors i mantenir en gel. Programar l'aparell de PCR i introduir-hi la mostra. Després de 2min a 94°C, afegir 0,3 µl de Taq Polimerasa. (*Hot start*). Els cicles bàsics de PCR van ser:



· **PCR utilitzant *Expand High Fidelity PCR System (Roche)*** (per amplificació de fragments >1kb)

- 10 ng de vector on es troba el fragment que es vol amplificar
- 2 µl de cada encebador a 10 µM
- 2 µl dNTP 10 mM
- 10 µl tampó 10 x de la Taq *Expand HF*
- 7 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- H<sub>2</sub>O fins 100 µl

Barrejar tots els components anteriors i mantenir en gel. Programar l'aparell de PCR i introduir-hi la mostra. Després de 2min a 94°C, afegir 0,75 µl de Taq *Expand HF* (*Hot start*). Els cicles bàsics de PCR van ser:





### 1.4.2 Clonatge de fragments d'ADN amplificats per PCR

Els fragments resultants de la PCR s'han purificat directament amb el kit comercial de purificació de productes de PCR de Qiagen seguint el protocol proposat o bé retallant el producte d'interès després de la seva resolució en un gel d'agarosa. Un cop purificat el producte de PCR s'han emprat el kit *pGEM<sup>R</sup>-T Easy Vector System* (Promega) el qual aprofita el fet que la Taq polimerasa pot tenir una certa activitat terminal transferasa, afegint una adenosina en l'extrem 3'. S'han seguit les instruccions del fabricant. Els resultats obtinguts amb aquest sistema han estat molt bons.

### 1.5 Transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*

Aquesta tècnica es basa en el fet que en cèl·lules d'*E.coli* sotmeses a baixes temperatures en presència de cations bivalents, que alteren la seva membrana, s'afavoreix la incorporació de DNA plasmídic. En les transformacions s'ha utilitzat cèl·lules competents d'*E.coli* (soca DH5 $\alpha$ F') preparades mitjançant el tractament amb CaCl<sub>2</sub> 50mM (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Protocol:

- Barrejar l'ADN plasmídic amb 100 $\mu$ l de cèl·lules competents i incubar en gel 30 min.
- Fer el xoc tèrmic a 42°C durant 90 segons.
- Incubar en gel 2 min.
- Afegir 800ml de medi LB.
- Incubar a 37°C per a l'expressió fenotípica durant 1h.
- Sembrar en plaques de medi LB selectives amb l'antibiòtic escaient per cada cas, i X-gal.

En general, els vectors utilitzats (pBluescript SK-, pGEM-T, pCAMBIA1300) presenten la seqüència del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Quant s'insereix un fragment d'ADN en aquesta regió, les cèl·lules perden la capacitat de sintetitzar l'enzim  $\beta$ -galactosidasa i per tant de metabolitzar el substrat X-gal; com a conseqüència, les cèl·lules que han incorporat l'insert formaran colònies blanques, en contraposició al color blau característic de la degradació del substrat per la  $\beta$ -galactosidasa, que presentaran les cèl·lules que no han incorporat l'insert.

### 1.6 *Cracking* per al ràpid cribratge de plasmidis recombinants

Quant, producte d'una lligació i transformació, es vol analitzar un elevat nombre de clons recombinants, es realitzà un cribratge ràpid i senzill mitjançant el mètode *Cracking*. Aquest mètode permet un cribratge ràpid per a una primera selecció dels plasmidis que contenen l'insert. Consisteix en el trencament (*cracking*) de les cèl·lules i electroforesi del llisat en gel d'agarosa, on es pot veure, a més del RNA i DNA cromosòmic, l'ADN plasmídic circular covalentment tancat (ADNccc) migrant de forma proporcional a la seva grandària. Cal que el plasmidi sigui d'elevat o mitjà nombre de còpies, i fer migrar com a referència el mateix plasmidi sense l'insert i un amb insert de grandària coneguda.

**Protocol:**

- Preparar *ependorfs* amb 25µl d'H<sub>2</sub>O MQ estèril.
- Mitjançant un escuradents estèril, disposar (per cada clon) una mostra d'estria en placa dins un *ependorf* i resuspendre.
- Afegir 25µl de solució de *Cracking* i homogeneïtzar al vòrtex.
- Deixar 15 min a temperatura ambient. No sobrepassar aquest temps perquè després la solució es torna molt viscosa i és difícil de carregar les mostres al gel d'agarosa.
- Carregar les mostres en un gel d'agarosa al 1% i doble de BrEt.

*Solució de Cracking:*

NaOH 10N	1ml
SDS 10%	2,5ml
sacarosa	10g
H <sub>2</sub> O MQ estèril fins a	50ml

Afegir blau de bromofenol fins que la solució tingui un intens color violeta. Es pot guardar a temperatura ambient i a la foscor. Cada cop que s'utilitzi afegir blau de bromofenol si és necessari.

### 1.7 Cinètica de deleccions unidireccionals

Per a l'obtenció de deleccions unidireccionals es va utilitzar el sistema *Erase-a-base* (Promega). Aquest sistema permet la construcció de subclons de manera ràpida i que continguin deleccions progressives d'un insert d'ADN, podent-se així seqüenciar grans fragments d'ADN. Aquesta tècnica es basa en la metodologia desenvolupada per Henikoff (1984) que aprofita la capacitat de l'Exonucleasa III de digerir només extrems d'ADN 5'-protuberats o roms, quedant-ne protegits els extrems 3'-protuberants. Actualment aquesta tècnica és menys utilitzada degut als avenços en les tècniques de seqüenciació d'ADN amb oligonucleòtids específics.

**Protocol:**

- L'ADN plasmídic es digereix amb dos enzims de restricció que no tallin dins l'insert: un, més proper a l'inici de l'insert, que ha de permetre l'acció de l'Exonucleasa III; i l'altre, més lluny de l'insert, que permeti la degradació per l'Exonucleasa III.
- Precipitar i resuspendre en H<sub>2</sub>O MQ i tampó Exonucleasa III.
- Afegir l'Exonucleasa III. Segons la temperatura de la cinètica, l'Exonucleasa III digerirà un nombre determinat de pb per minut (consultar taules que acompanyen el kit comercial). S'aniran prenent mostres a diferents temps a intervals fixats.
- Al treure les mostres, parar la reacció i, mitjançant la S1 nucleasa, es digereix la cadena senzilla sobrant.
- Prendre una mostra de cada temps i migrar en un gel d'agarosa 0,7% per comprovar la qualitat del procés de delecció.
- Mitjançant una ADN polimerasa *Klenow* es fan extrems roms, i els fragments es recircularitzen mitjançant l'acció d'una ADN lligasa.

- Es transformen cèl·lules competents DH5 $\alpha$ F' (veure apartat 1.5) amb 10 $\mu$ l de cada lligació i són sembrats en placa. L'anàlisi dels clons es pot fer pel mètode de *cracking* descrit a l'apartat 1. 6.

## **1.8 Hibridació Southern**

### **1.8.1 Transferència de l'ADN a filtre de niló**

#### **Protocol:**

- Resoldre l'ADN digerit (normalment 5  $\mu$ g) en un gel d'agarosa del 0.8 % i fotografiar amb un regle al costat.
- Depurinitzar: incubar, en un recipient de vidre, el gel ja migrat, en HCl 0,25N durant 15-30 min en agitació, fins que el blau de bromofenol es torni groc. Deixar 5-10 min més. Llençar el líquid i rentar amb H<sub>2</sub>O destil·lada.
- Desnaturalitzar: incubar 30 min en NaOH 0,4N. Ha de tornar a aparèixer el blau.
- Mentre es fan les incubacions es pot preparar el següent muntatge per a la transferència:
  - Tallar 6 fulls de paper de la mida del gel
  - Tallar una membrana de niló *Hybond-N (Amersham-Pharmacia)*
  - Amarar una esponja (de la mida del gel i de 5 cm de gruix) en NaOH 0,4N
  - Amarar els fulls de paper en NaOH 0,4N. Dipositar 3 fulls sobre l'esponja
  - Treure les bombolles d'aire
- Dipositar el gel sobre els fulls. Treure les bombolles d'aire.
- Identificar la membrana utilitzant un llapis.
- Dipositar la membrana de niló. Treure les bombolles d'aire.
- Dipositar les 3 fulles de paper amarades de NaOH sobre de la membrana. Treure les bombolles d'aire.
- Afegir un plec de paper absorbent. Cobrir amb una placa de vidre.
- Deixar transferir fins a l'endemà.
- Treure la membrana i netejar-la amb 2x SSC.
- Deixar assecar completament la membrana en paper absorbent. Poden conservar-se a 4°C.
- Fixar el DNA: embolicar el filtre en paper *Saran Wrap* i deixar a l'U.V. durant 3 min.

### **1.8.2 Hibridació**

#### **Protocol:**

- *Prehibridació*: Submergir la membrana amb 2x SSC.
- Posar la membrana dins un tub i afegir la solució de prehibridació (20 ml/tub).
- Prehibridar durant 5h a 65°C a l'estufa en constant rotació.
- *Hibridació*: Desnaturalitzar la sonda en un *ependorf* amb una mica de solució d'hibridació, incubar a 90-100°C, 10 min.
- Afegir la sonda a la solució d'hibridació.
- Abocar la solució de prehibridació del tub on hi ha la membrana. Afegir la solució d'hibridació amb la sonda. Deixar O/N a 65°C a l'estufa en constant rotació.

- *Rentats*: Abocar la solució d'hibridació utilitzada en el recipient per a residus radioactius.
- Rentar durant 5 min amb solució de rentat S1, a T.A. Llençar la solució.
- Rentar 2 vegades durant 30 min amb solució de rentat S2, a la mateixa temperatura que la d'hibridació per sondes curtes, i a 68°C per sondes  $\geq 100$ bp.
- Rentar 2 vegades durant 30 min amb solució de rentat S3, a la mateixa temperatura que la d'hibridació.
- Assecar amb compte la membrana amb paper absorbent i embolicar-la amb *Saran Wrap*, evitant bombolles d'aire o arrugues del plàstic.
- Dipositar la membrana en un *cassette* amb un film i dues pantalles protectores.
- Deixar 5-7 dies a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

<i>Solució d'hibridació i prehibridació:</i>	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA pH 8	10mM
	SSC	5x
	SDS	0,2% (p/v)
	Esperma de salmó	0,1mg/ml
	Denhart	1x

Per a la *solució d'hibridació* s'afegeix Dextran sulfat 10% (p/v) i la sonda prèviament desnaturalitzada.

<i>Solucions de rentat:</i>	S1	SSC	2x
		SDS	0,1% (p/v)
	S2	SSC	0,1x
		SDS	0,1% (p/v)
	S3	SSC	0,1x
		SDS	10% (p/v)

### 1.8.3 Marcatge de la sonda

S'utilitza el kit *Megaprime* (Amersham-Pharmacia) que es basa en el *Random priming*, seguint les indicacions del fabricant. El fragment d'ADN a marcar es desnaturalitza a  $100^{\circ}\text{C}$  durant 2 min en presència dels hexanucleòtids (dATP, dTTP i dGTP). Els primers hibridaran amb cadascuna de les cadenes cada 100-200pb. Les cadenes d'ADN complementàries seran sintetitzades a partir dels primers per acció de l'ADN polimerasa Klenow, en presència d' $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP i dels tres altres nucleòtids freds. Les cadenes d'ADN sintetitzades són radioactives i constitueixen la sonda.

## 2. RELACIONATS AMB PROTEÏNES

### 2.1. Extracció de proteïnes totals

#### 2.1.1 Extracció de proteïnes totals de teixits vegetals

Aquest protocol ha resultat de gran utilitat per a l'anàlisi dels nivells d'acumulació d'MPI mitjançant *Western blot* de les plantes transgèniques produïdes en el decurs d'aquest estudi. El mètode és ràpid i senzill i permet obtenir grans quantitats de proteïnes totals d'una gran diversitat de teixits.

**Protocol:**

- Homogeneïtzar el teixit en un morter refredat contínuament amb N<sub>2</sub> líquid.
- Passar el teixit fet pols a un *ependorf* i afegir 300-500 µl de tampó d'extracció.
- Centrifugar 10 min a 10.000 rpm a 4°C.
- Descartar el sediment.
- Centrifugar 5 min a 10.000 rpm a 4°C.
- Del sobrenedant obtingut separar una alíquota de 2 µl per fer una determinació de la quantitat de proteïnes pel mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad). La determinació per Bradford es realitzà d'acord amb les instruccions del fabricant.

<i>Tampó d'extracció:</i>	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA	1 mM
	Glicerol	5 %
	Ditiotreitol (DTT)	1 mM
	Triton X-100	0,1%

**2.1.2 Extracció de proteïnes totals d'intestins de larves de Lepidòpters**

Aquest protocol s'ha emprat en intestins de larves dels lepidòpters *Chilo suppressalis* (Walker) i *Cacyreus marshalli*. La conservació dels extractes alíquotats a de ser a -80°C. Són mostres molt sensibles i només poden ser descongelats una vegada i ser utilitzats el mateix dia de la descongelació.

**Protocol:**

- En un vidre de rellotger amb solució fisiològica (NaCl 0,9%) s'extreuen els intestins i es guarden en *ependorfs* a - 80°C.
- Mantenint l'*ependorf* en neu carbònica, es tritura el contingut utilitzant un èmbol de plàstic.
- Dividir en alíquotes (dividir en *ependorfs* el corresponent aproximadament a 10 intestins), guardar a - 80°C.
- En el moment de la utilització, afegir 500 µl de tampó d'extracció fred i barrejar.
- Centrifugar 10 min a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant.
- Centrifugar 5 min a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant.
- Amb una alíquota de 2 µl es determina la quantitat de proteïnes pel mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad). La determinació per Bradford es realitzà d'acord amb les instruccions del fabricant.

<i>Tampó d'extracció insectes:</i>	Tris-HCl pH 8,8	0,5 M
	NaCl	0,15 M

**2.2 SDS-PAGE**

El mètode utilitzat és el descrit per Laemmli (1970). L'aparell emprat és un *Miniprotean* (BioRad). Seguidament es descriuen els tampons utilitzats i la composició dels gels emprats en aquest treball.

*Tampó del gel concentrador (capa superior):* Tris-HCl pH 6,5 0,5 M  
SDS 0,4 %

*Tampó del gel separador (capa inferior):* Tris-HCl pH 8,8 1,5 M  
SDS 0,4 %

· Volums necessaris per preparar 2 ml de gel concentrador

Gel concentrador	
H <sub>2</sub> O	2,25 ml
Tampó gel concentrador	1 ml
Acri:bisacrilamida (30:0,8)	0,5 ml
APS 15 % (p/v )	40 µl
Temed	6 µl

· Volums necessaris per preparar 10 ml de gels separadors amb diferents % d'Acrilamida /bisacrilamida

<i>Gel separador</i>	15 % (*)	12,5 %	10 %
H <sub>2</sub> O	3,75 ml	4,38 ml	5 ml
Tampó gel separador	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acri:bisacrilamida (30:0,8)	3,75 ml	3,13 ml	2,5 ml
APS 15 % (p/v )	40 µl	40 µl	40 µl
Temed	5 µl	5 µl	5 µl

(\*) % utilitzat per als *Westerns* realitzats amb extractes proteics de plantes transgèniques *mpi*

*Tampó d'electroforesi:* Glicina 1,92 M  
Tris-HCl 0,25 M  
SDS 10 %  
pH entre 8,3 i 8,8

Per tal de preparar les mostres per a ser resoltes en un gel SDS-PAGE, s'afegeix un volum igual al volum de mostra de TM x 2 (el volum màxim de mostra i TM x 2 és 25-30 µl), en alguns casos resulta més útil utilitzar TM x 5, seguidament s'afegeix β-Mercaptonetanol al 10 % (v/v) i s'incuba 3 min a 100 °C. Les mostres es mantenen en gel fins a la seva distribució en el gel de SDS-PAGE.

*TM x 2:* Tris-HCl pH 6,8 125 mM  
Glicerol 20 %  
SDS 4 %  
Blau de bromofenol 0,04 %

### 2.3 Immunotransferència

### 2.3.1 Transferència

S'ha utilitzat el sistema *SemiDry* (BioRad), que és un sistema força ràpid, per a realitzar la transferència de les proteïnes resoltes en gels d'acrilamida cap a membranes de nitrocel·lulosa (0,45 µm), en el cas de la detecció de la proteïna MPI. Per a la detecció de la proteïna AFP s'utilitzà una membrana de PVDF (*Immobilon-P<sup>sq</sup>*, Millipore). Els protocols detallats es descriuen a *Current Protocols in Protein Science*, Coligan *et al.* (2002).

#### Protocol:

- Equilibrar el gel abans de la transferència fent rentats amb tampó de transferència a 4°C:
  - 2 rentats de 5 min en agitació.
  - 1 rentat de 10 min en agitació.
  - Els papers i membrana ha d'incubar-se 10 min en tampó de transferència.
- Les condicions de treball emprades per a l'electrotransferència han estat de 12 V durant 40 min amb el següent tampó.

<i>Tampó de transferència:</i>	Tris	48 mM
	Glicina	39 mM
	Metanol	20 %
	SDS	10 %
	No cal ajustar el pH, ha d'estar al voltant de pH 9	

- Desmuntar i tenyir el gel amb Blau de Coomassie i la membrana amb Roig de Ponceau per tal de confirmar si hi ha hagut una transferència correcte. Marcar les bandes corresponents al marcador de pes molecular.

### 2.3.2 Immunodetecció

Les condicions emprades en aquest treball ha estat:

#### Protocol:

- Fer 2 rentats de la membrana amb PBS durant 5 min en agitació.
- Incubar en solució de bloqueig (3 % de llet en pols desnatada en PBLs) durant 1h a TA o bé O/N a 4 °C en agitació.
- Fer 3 rentats de 5 min amb PBLs.
- Incubar amb la dilució de l'anticòs primari que ens interressi (veure apartat 3 de *A. Materials*) en solució de bloqueig durant 1 h a T.A. o bé O/N a 4°C en agitació.
- Eliminar el sèrum.
- Fer 4 rentats de 5 min amb PBLs.
- Incubar amb l'anticòs secundari en solució de bloqueig durant 1 h a TA o bé O/N a 4°C en agitació. En aquest treball sempre s'ha utilitzat un secundari anti IgG de conill lligat a una fosfatasa alcalina (Dako A/S) a dilució (1:5000).
- Fer 4 rentats de 5 min amb PBLs.

- Equilibrar amb tampó fosfatasa.
- Revelar amb substrat NBT/BCIP, mantenint la membrana a l'obscuritat. Per accelerar la reacció es pot mantenir a 37°C.
- Parar la reacció amb PBS+EDTA 0,2M.

<i>PBLS:</i>	PBS	1 x
	Tween-20	0,1 %
<i>Tampó fosfatasa:</i>	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	Tris-HCl pH 9,5	100 mM
<i>NBT:</i>	NBT (Boehringer)	0,05 g
	Dimetilformamida(DMF)	700µl
	H <sub>2</sub> O	300µl
<i>BCIP:</i>	BCIP (Duchefa)	0,05 g
	H <sub>2</sub> O(*)	1 ml
	(*) Si el BCIP està en <i>Toluidin salt</i> , dissoldre en DMF	
<i>Substrat NBT/BCIP:</i>	NBT (50 mg/ml)	66 µl
	BCIP (50 mg/ml)	33 µl
	tampó fosfatasa	10 ml

## 2.4 Determinació d'activitats proteolítiques

### 2.4.1 Activitat proteolítica total d'extractes proteics

Per tal de valorar l'activitat proteolítica total, tant d'extractes proteics d'intestins de larves de lepidòpters com d'extractes proteics de teixits vegetals, s'utilitzà el substrat universal per a proteases *Casein, resorufin-labeled* (Boehringer Mannheim). De manera habitual, es realitzaren tres rèpliques de cada mostra.

#### Protocol:

- Ajustar en un *ependorf*
  - 50 µl de caseina al 0,4% (p/v) (*Casein, resorufin-labeled*, Boehringer Mannheim).
  - Extracte de proteïnes totals (\*)
  - Tampó Glicina-(NaOH) 0,1M pH 10,5 (\*\*) fins a 200 µl.
- Incubar 30 min a 37°C.
- Parar la reacció afegint 480 µl d'àcid tricloracètic 5%.
- Incubar 10 min a 37°C.
- Centrifugar 5 min a 12.000 g.
- Lectura: barrejar 400 µl del sobrenedant de la centrifugació anterior amb 600 µl de tampó 0,5 M Tris-HCl pH 8.8. Llegir la DO a 574 nm.

(\*) Normalment s'han utilitzat quantitats creixents de mostra per poder definir correctament el nivell d'activitat.



(\*\*) Tampó òptim determinat en el marc d'aquest treball per a les activitats proteolítiques de *Chilo suppressalis*. Per *Cacyreus marshalli* el tampó utilitzat fou NaOH 0,1M pH 10. Cal determinar en cada cas d'estudi, el tampó i pH òptim per a les activitats proteolítiques dels intestins a analitzar, mitjançant un sistema de tampons discontinus. En el nostre cas s'utilitzaren els següents tampons:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M) amb pH 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5
- Tris-HCl (0,1M) amb pH 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0 - 8,5 - 9,0 - 9,5
- Glicina (NaOH) (0,1M) amb pH 9,0 - 9,5 - 10,0 - 10,5 - 11,0
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M) amb pH 10,0 - 10,5 - 11,0 - 11,5 - 12,0 - 12,5

Tots els tampons contenen NaCl 0,15M

#### **2.4.2 Inhibició de les activitats proteolítiques totals d'extractes proteics**

Tant per valorar l'efecte inhibidor de la proteïna recombinant MPI com d'altres inhibidors de proteases comercials sobre proteases digestives d'insectes, s'utilitzà igualment el substrat universal per a proteases *Casein, resorufin-labeled* (Boehringer Mannheim). Per a aquests tipus d'assaigs, l'extracte proteic s'incuba prèviament amb l'inhibidor de proteases, en tampó Tris-HCl 0,1M pH 8, durant 30 min en gel. Seguidament es segueix el protocol descrit per a determinar el nivell de les activitats proteolítiques totals, tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior 2.4.1. En aquests assaigs s'han utilitzat habitualment d'1 a 3µg d'extractes proteics d'intestins de larves de lepidòpter.

Els inhibidors comercials utilitzats i les corresponents concentracions de treball foren:

- Elastatinal (0,1mM) (Sigma)
- Chymostatin (0,1mM) (Sigma)
- Soybean Bowman-Birk Inhibitor (SBI) (10µM) (Sigma)
- Leupeptin (100µM) (Sigma)
- Pepstatin (25µM) (Sigma)
- Maize Proteinase Inhibitor (MPI) (concentració variable segons l'assaig) (proteïna recombinant produïda al laboratori (Tamayo, 2000)
- Potato Carboxypeptidase Inhibitor (PCI) (10µM) (proteïna recombinant cedida pel Dr. FX. Avilés, Dept. Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB)
- EDTA (1mM)

#### **2.4.3 Activitat proteolítica d'extractes proteics utilitzant substrats específics (SA<sub>3</sub>pNA i SA<sub>2</sub>PPpNA)**

Els substrats comercials utilitzats foren SA<sub>3</sub>pNA (Sigma) per a activitats serinaproteasa del tipus elastasa, i SA<sub>2</sub>PPpNA (Sigma) per a activitats serinaproteasa del tipus quimotripsina; ambdós a una concentració de treball de 0,1 mM. Les proteases de mamífer utilitzades en aquest treball foren Elastasa porcina (1µg) i α-Quimotripsina bovina (1µg) (ambdues de Sigma). Es varen utilitzar 50, 75, 100, 150 i 200µg d'extractes proteics de teixit vegetal.

**Protocol:**

- Barrejar els extractes proteics de teixit vegetal amb l'inhibidor escollit, i completar fins a 50µl amb tampó Tris-HCl 0,1M pH8.
- Incubar 30 min en gel.
- En cubetes de l'espectrofotòmetre d'1 ml, afegir 100µl de substrat específic 10x i 850µl de tampó Glicina (NaOH) 0,1 M pH 10,5.
- Afegir els extractes incubats a la cubeta i fer la lectura.
- Lectura: es llegeix l'absorbència a 410 nm cada 30 min, fins a 4h en el cas del substrat SA<sub>3</sub>pNA i fins a 2h per al substrat SA<sub>2</sub>PPpNA.
- Els valors d'absorbència es processen per obtenir l'activitat de l'inhibidor en nmol / min / µg d'inhibidor, utilitzant la fórmula:  
$$1 \text{ mmol} / 8,8 \text{ UDO} = x \text{ mmol substrat} / \text{interval lectura (min)}$$

(8.8 UDO correspon al coeficient d'extinció molar calculat per als substrats pNA)

**Substrats SA<sub>3</sub>pNA i SA<sub>2</sub>PPpNA:**

- Solució *stock*: 500mM en DMSO  
conservar a -20°C
- Solució 10x: 2 µl solució *stock* 500mM  
998 µl Tris-HCl 0,2M pH 8

---

### **3. TRANSFORMACIÓ D'ARRÒS**

---

Els mètodes de transformació d'arròs, tant de bombardeig de microprojectils (biolística) com per *Agrobacterium*, foren aplicats per a la transformació de les varietats *japonica* Sènia, Ariete i Taipei 309 d'*Oryza sativa*. Els mètodes detallats a continuació han estat desenvolupats (o perfeccionat en el cas del protocol de transformació per *Agrobacterium*) al laboratori del Dr. E. Guiderdoni del CIRAD, Montpel·lier.

#### **3.1 Inducció de calls embriogènics a partir de l'escutel de l'embrió zigòtic madur**

**Protocol:**

· *Desinfecció dels grans:*

- Decorticar aproximadament 100-200 llavors sanes d'arròs.
- Submergir-les en alcohol al 70% durant 1 minut sota la cambra de flux laminar i en condicions d'esterilitat.
- Transferir les llavors a un *Erlenmeyer* autoclavat que contingui 30-40ml de lleixiu comercial diluïda al 30% amb H<sub>2</sub>O destil·lada. Es pot afegir una gota d'un detergent d'ús comú.
- Mantenir 30 minuts, agitant de tant en tant.
- Rentar les llavors successives vegades amb abundant H<sub>2</sub>O destil·lada estèril fins a utilitzar un volum final aproximat d' 1 litre.
- Assecar les llavors posant-les sobre un paper de filtre estèril.

· *Sembra en cultiu:*

- Les llavors d'arròs desinfectades són disposades, emprant unes pinces esterilitzades a la flama, en medi d'inducció NB en plaques *Optilux* 100x20, a raó de 12 llavors per placa. La placa es deixa entreoberta sota el flux laminar amb la finalitat d'evitar l'excés de líquid al voltant de la llavor; després són segellades amb *Parafilm*.
- Incubar les plaques a 28°C i a la foscor durant 17-20 dies.
- Després d'aquest període, l'escutel de l'embrió ha format un call primari compacte de 0,5-1cm, a partir d'aquests calls primaris es poden formar petites unitats embriogèniques individualitzades. Aquestes unitats esfèriques i compactes, de 0,5-1mm aproximadament, són transferides a nou medi NB en plaques de Petri estàndards 100x15, a raó de 15 per placa. El call primari no és transferit però pot ésser conservat en la mateixa placa durant uns dies, ja que pot donar noves unitats embriogèniques.
- Incubar les unitats embriogèniques recuperades a 28°C i a la foscor durant 14 dies.
- Després d'aquest període, les unitats embriogèniques hauran proliferat en tres tipus de formacions: i) unitats de talla inferior a 0,8mm que seran transferits a medi fresc NB (estàndard 100x15, a raó de 15 per placa) per a una incubació de 14 dies. ii) unitats esfèriques que presenten la superfície rugosa i de talla entre 0,8-1,6mm que seran utilitzades per a la transformació. iii) calls de forma més complexa i de talla superior a 2mm que seran eliminats.
- Després de 14 dies, els nòduls de talla petita repicats s'hauran desenvolupat de nou i fragmentat, donant altre cop els tres tipus de formacions descrits, que seran utilitzats de la mateixa manera. Aquest sistema es pot repetir fins a tres vegades i permet disposar d'unitats embriogèniques per 3-4 experiències successives de transformació, espaiades entre elles 14 dies aproximadament.

## **3.2 TRANSFORMACIÓ PER BOMBARDEIG DE MICROPROJECTILS**

### **3.2.1 Preparació de les unitats embriogèniques per el bombardeig de micropartícules**

Les unitats embriogèniques seleccionades per al bombardeig han de tenir unes característiques que garanteixin a l'explant un estat fisiològic òptim per a la transformació. Els criteris són els següents:

- *Talla:* les unitats han de mesurar entre 0,8-1,6mm. Calls més grans presenten un estat de diferenciació massa avançat i condueixen a freqüències de transformació inferiors, mentre que calls massa petits no suporten l'impacte del bombardeig i condueixen igualment a freqüències de transformació inferiors.
- *Forma:* les unitats seleccionades han de tenir una forma esfèrica i una superfície rugosa. Els calls de forma més complexa, de superfície llisa i blanca són diferenciats i s'han d'evitar.
- *Color:* les unitats han de ser blanques i opaques. Els calls translúcids, beix o grogosos s'han d'eliminar.
- *Textura:* els calls han de ser compactes i resistents a les pinces.

Quatre hores abans del bombardeig, de 80-100 unitats embriogèniques seleccionades es disposen, les unes al costat de les altres, al centre d'una placa de Petri de medi NBO enriquit amb *osmoticum*, dins un cercle de 3cm de diàmetre, que serà la superfície que abraçaran les partícules de bombardeig. La placa es deixa oberta 10 minuts sota el flux laminar i després es segella amb *Parafilm*.

### **3.2.1 Bombardeig**

Per una millor eficàcia, es realitzaran les operacions de preparació del material necessari seguint el següent ordre:

- i) Neteja amb alcohol al 70% de la cambra de flux laminar, cambra del canó de partícules, placa de suport de la placa de Petri, suport del disc de ruptura i placa i vis de suport del macroprojectil.
- ii) Els accessoris (reixa de contenció, discs de ruptura, macroprojectils, suports dels macroprojectils, embut cilíndric vermell) es submergeixen en alcohol absolut, per a la seva desinfecció. Deixar assecar els accessoris.
- iii) Preparació dels microprojectils. Pesar en una balança de precisió, dins un tub *ependorf* siliconat autoclavat, 3 mg d'una barreja a parts iguals de micropartícules d'or de diàmetre mitjà 1,0 i 1,6  $\mu\text{m}$ , per a cada construcció a bombardejar. Aquesta quantitat de partícules permet realitzar el bombardeig de dues plaques, a raó de dos trets per placa.

#### **· Neteja de les partícules d'or (les quantitats són per una construcció):**

- Afegir 50  $\mu\text{l}$  d'alcohol absolut a 3 mg de micropartícules, vòrtex 1-2 min.
- Centrifugar 10 s i eliminar el sobrenedant.
- Vòrtex 1-2 min en 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bidestil·lada estèril.
- Centrifugar 10 s i eliminar el sobrenedant.
- Vòrtex 1-2 min en 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bidestil·lada estèril.
- Centrifugar 10 s i eliminar el sobrenedant.
- Resuspendre bé les partícules en 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O bidestil·lada estèril amb el vòrtex.

#### **· Recobriment de les micropartícules:**

Les etapes següents es realitzen agitant contínuament el tub *ependorf* amb el vòrtex, sempre a una velocitat baixa i constant.

- Afegir en un tub *ependorf* l'ADN (construcció amb el gen d'interès) i l'ADN portador del gen de selecció. En les nostres experiències utilitzem el plàsmid pILTAB227 portador del gen de resistència a l'higromicina. La quantitat total d'ADN utilitzada en el nostre treball per a recobrir els microprojectils és de 3  $\mu\text{g}$ , en una relació 2:1 entre el plàsmid amb el gen d'interès i el plàsmid portador del gen de resistència.
- Afegir 20  $\mu\text{l}$  d'una solució 0,1 M d'espermidina.
- Afegir lentament, gota a gota, 50  $\mu\text{l}$  d'una solució 2,5 M de CaCl<sub>2</sub>.
- Barrejar bé amb el vòrtex a una velocitat constant i deixar reposar 10 min a TA.
- Mentrestant muntar 4 macroprojectils esterilitzats sobre el seu suport.
- Centrifugar 10 s la preparació i eliminar el màxim possible de sobrenedant.

- Afegir 35 µl d'alcohol absolut i agitar amb el vòrtex.
- Pipetejar fins que s'hagi barrejat completament i dispensar ràpidament 8 µl al centre de cadascun dels quatre macroprojectils preparats en el seu corresponent suport. Deixar evaporar l'alcohol. Els quatre macroprojectils seran apunt per el bombardeig de la construcció sobre 2 plaques, a raó de 2 trets per placa.

· **Realització del bombardeig:**

Els paràmetres del bombardeig són els següents: buit a 27 inches de mercuri; disc de ruptura de 1100 psi; suport de la placa de Petri a 6 cm de la reixa de contenció; dos trets per placa fent una rotació de la placa de 180° entre els trets.

- El disc de ruptura es disposa sobre el seu suport i s'acobla, assegurant-se de que queda ben cargolat, a l'orifici d'entrada de l'heli.
- Disposar la reixa de contenció al fons de l'orifici de la placa del macroprojectil, disposar el suport del macroprojectil cap per avall i fixar bé cargolant.
- Col·locar la placa del macroprojectil ja muntada a dins la cambra de tir.
- La placa amb els nòduls es col·loca, oberta, a la seva placa de suport i es situen dins la cambra de tir a 6 cm de la placa del macroprojectil. Es tanca la porta de la cambra i es passa la balda.
- La bomba de buit s'engega fins a obtenir una pressió de 27 inches de mercuri, i es manté la pressió.
- La vàlvula d'arribada d'heli s'obra fins a la ruptura del disc. Llavors es talla l'arribada d'heli i es torna la cambra a pressió normal.
- Es retira la placa de suport de la placa dels nòduls i se li dona una rotació de 180°. Treure la placa del macroprojectil i reemplaçar-lo (recordar canviar també la reixa de contenció), i tornar a cargolar-lo. Treure les restes del disc de ruptura i reemplaçar-lo.
- Realitzar un segon tir.
- La placa amb els nòduls es segella amb *Parafilm* i es manté 16-20 h a la foscor i a 28°C.

### **3.2.2 Selecció i regeneració del material transformat**

- Les unitats bombardejades són transferides a medi NB que contingui 40 mg/l d' Higromicina (NBH40) a raó de 12 nòduls per placa (Optilux 20x100mm). Es deixen en incubació durant 12-14 dies a la foscor i a 28°C.
- A aquest estadi, a la superfície de les unitats embriogèniques, apareixen glòbuls beix i translúcids. Aquests seran dispersats al voltant del calls d'origen amb l'ajut de les pinces. El calls inicial es necrotitzarà, les unitats que no han donat glòbuls seran eliminades.
- Es deixen en incubació durant 10-12 dies més. Els glòbuls repicats s'hauran desenvolupat com a calls resistents de talla superior, compactes, de color blanc-groc i aspecte rugós. Els calls translúcids, de talla menor, beix i de consistència tova es consideren com a no transgènics. Els nòduls resistents que sortiran posteriorment del mateix call d'origen, poden considerar-se clònics i representen un mateix esdeveniment de transformació independent.

- Els calls resistents són transferits a medi de preregeneració PRH50, que conté 50 mg/l d'Higromicina, en plaques *Optilux* 20x100 mm i incubats a la foscor a 28°C durant 7-8 dies. És important no passar mai dels 10 dies d'incubació en aquest pas.
- Els calls transgènics augmentaran de talla i esdevindran compactes, opacs, de color crema a lleugerament grocs, d'estructura lobulada i invaginada. Els altres tipus de calls poden ser eliminats. Es transferiran els calls òptims a un medi de regeneració RH50, en plaques *Optilux*, conservats d'1 a 10 dies a l'obscuritat.
- Passar les plaques a la llum. La intensitat lumínica serà 110-130 mM/mPAR a 28°C. Els calls esdevindran més compactes i blancs, i seran transferits a la llum continua.
- Després de 14-17 dies, els calls que s'han tornat verdosos i que han desenvolupat tija, són transferits a tubs de cultiu *Magenta*, que continguin medi MS 1/2, vitamines B5 1/2, 0,05 mg d'ANA, 1% de sacarosa i 0.25% de *Phytigel*. Els cultius es conservaran sota les mateixes condicions.
- Les plantes joves seran transferides a la cambra de cultiu (amb solució nutritiva) quant les seves fulles arribin al tap del tub de cultiu *Magenta*.
- Es tallen uns mm-cm de fulla i d'arrel, es renten les arrels de *Phytigel* i es deixen O/N en aigua. Es transfereixen al substrat comercial *Jiffy*.
- Finalment, transferir les plantes a test i creixement a l'hivernacle fins a planta adulta.

<b>Medis</b>	<i>Medi BASIC :</i>	Macro N6 (20x)	50 ml/l
		Micro B5 (100x)	10 ml/l
		Vitamines B5 (100x)	10 ml/l
		FeEDTA (100x)	10 ml/l
		Prolina	500 mg/l
		Glutamina	500 mg/l
		Hidrolisat de caseïna	300 mg/l
		Sacarosa	30 g/l
		<i>Phytigel</i>	2,6 g/l
	<i>Medi NB:</i>	Medi BASIC	
		2,4-D (auxina)	2 mg/l
	<i>Medi NBO:</i>	Medi NB	
		Manitol	0,4 M
		Sorbitol	0,4 M
	<i>Medi NBH40:</i>	Medi NB	
		Higromicina	40 mg/l
	<i>Medi PRH50:</i>	Medi BASIC	
		Higromicina	50 mg/l
		Citoquinina	2 mg/l
		Auxina	1 mg/l
		ABA	5 mg/l
	<i>Medi RN50:</i>	Medi BASIC	
		Higromicina	50 mg/l
		Citoquinina	3 mg/l
		Auxina	0,5 mg/l
		ABA	5 mg/l

### **3.3 TRANSFORMACIÓ PER AGROBACTERIUM**

S'utilitza com a material per a transformar, calls embriogènics a partir de l'escutel de l'embrió zigòtic madur obtinguts segons el mateix protocol descrit a l'apartat 3.1.

#### **· Cocultiu amb *Agrobacterium*:**

- Inocular *Agrobacterium* en medi AB sòlid (\*) suplementat amb els antibiòtics corresponents a la soca (en el nostre cas kanamicina i rifampicina) i es deixar créixer 3 dies a 28°C. En general es preparen 2 plaques. (\*) *Medi AB: veure apartat 4.1*
- Recollir els bacteris amb una espàtula i resuspendre en 30-50ml de medi líquid de cocultiu R2L fins una densitat de  $3-5 \times 10^9$  cèl·lules/ml. (D.O.<sub>600</sub>=1).
- Passar la suspensió a una placa de Petri i submergir-hi els calls (100 per cada construcció) durant 10-15 min.
- Assecar els calls, d'un en un, fent-los rodar suaument per sobre un paper de filtre esterilitzat, fins que presentin una aparença seca.
- Disposar 10 calls per placa de medi sòlid de cocultiu R2-CS, segellar amb *Parafilm* i incubar durant 3 dies a 25°C, a la foscor.

#### **· Selecció dels calls resistents a l'higromicina:**

- Disposar els calls cocultivats en medi de selecció R2S i incubar a la foscor a 28°C. Controlar freqüentment el creixement bacterià, si hi ha massa proliferació d'*Agrobacterium*, passar els calls no contaminats a nou medi i llençar els altres. Canviar de medi quant el medi es torni groc/marró degut a l'excés de compostos polifenòlics alliberats. Aproximadament 2 setmanes d'incubació.
- A partir d'aquí, els criteris de selecció dels calls (aspecte, mida, color...) seran els mateixos que els descrits en l'apartat 3.2.2.
- Per a una nova selecció, els calls es passaran a plaques amb medi NBS, i seran incubats a 28°C i obscuritat durant 3 setmanes.
- Es comença el procés de regeneració dels calls transformats transferint-los a plaques amb medi PR-AG. Incubar a 28°C i obscuritat, durant 1 setmana.
- Transferir els calls a plaques amb medi RN-AG, i incubar-los a 28°C, durant 2 dies a l'obscuritat, seguits de 3-4 setmanes de 12h de llum/dia.
- Els calls que s'han tornat verdosos i que han desenvolupat tija, són transferits a tubs de cultiu *Magenta*, que continguin medi MS 1/2, vitamines B5 1/2, 0,05 mg d'ANA, 1% de sacarosa i 0.25% de *Phytigel*.
- Les plantes joves seran transferides a la cambra de cultiu (amb solució nutritiva) quant les seves fulles arribin al tap del tub de cultiu *Magenta*.
- Es tallen uns mm-cm de fulla i d'arrel, es renten les arrels de *Phytigel* i es deixen O/N en aigua. Es transfereixen al substrat comercial *Jiffy*.
- Finalment, transferir les plantes a test i creixement a l'hivernacle fins a planta adulta.

**Medis**

<i>Medi bàsic R2:</i>	Macro N6	100 ml/l
	Micro B5	1 ml/l
	Vitamines B5	25 ml/l
	FeNaEDTA	10 ml/l
<i>Medi líquid de cocultiu R2L:</i>	Medi bàsic R2	
	Glucosa	10 g/l
	2,4-D	2,5 mg/l
	Acetosyringone	100 µM
	pH 5,2	
<i>Medi sòlid de cocultiu R2-CS:</i>	Medi líquid de cocultiu R2L	
	Agarosa tipus I	7 g/l
	pH 5,2	
<i>Medi de selecció R2S:</i>	Medi bàsic R2	
	Sacarosa	30 g/l
	2,4-D	2,5 mg/l
	Cefotaxime	400 mg/l
	Vancomicina	100 mg/l
	Higromicina	50 mg/l
	Agarosa tipus I	7 g/l
	pH 6	
<i>Medi NBS:</i>	Medi BASIC(*)	
	2,4-D	2,5 mg/l
	Cefotaxime	400 mg/l
	Vancomicina	100 mg/l
	Higromicina	50 mg/l
	Agarosa tipus I	7 g/l
	pH 6	
	(*) veure apartat 3.2.2	
<i>Medi PR-AG:</i>	Medi BASIC	
	Cefotaxime	100 mg/l
	Vancomicina	100 mg/l
	Higromicina	50 mg/l
	Citoquinina	2 mg/l
	Auxina	1 mg/l
	ABA	5 mg/l
	BAP	2 mg/l
	ANA	1 mg/l
	Agarose type I	7 g/l
	pH 5,8	
<i>Medi RN50:</i>	Medi BASIC	
	Higromicina	50 mg/l
	BAP	2 mg/l
	ANA	1 mg/l
	Phytigel	4,5 g/l
	pH 5,8	



#### 4. BIOASSAIGS

Els bioassaigs es realitzaren amb larves de *Chilo suppressalis* (Walker) en estadi L2 provinents de la població mantinguda a l'insectari de CIRAD de Montpellier. Les plantes d'arròs utilitzades es trobaven, en tots els bioassaigs, en estadi de 4-5 fulles. Totes les plantes utilitzades foren prèviament seleccionades en relació al nivell d'acumulació de l'inhibidor MPI, mitjançant immunotransferència.

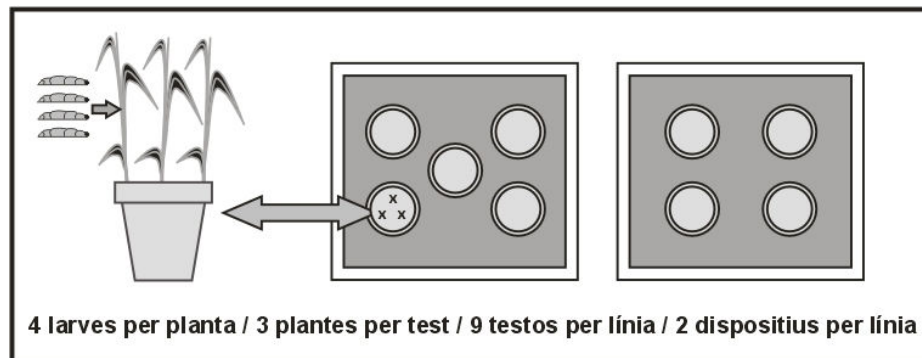
· *Bioassaig per avaluar la resistència a la infestació de plantes d'arròs transgèniques:*

Es disposà de 20 plantes transgèniques (1planta per test) agrupades en dispositius entomològics per línia. S'infestaren a raó de 4 larves L2 per línia. La duració total del bioassaig fou de 2 setmanes.

· *Bioassaig per avaluar l'efecte de l'expressió del gen mpi en plantes d'arròs, en el pes i desenvolupament de larves de Chilo suppressalis :*

Es disposà de 12 a 28 plantes transgèniques (3-4 plantes per test). Els testos foren repartits pels diferents dispositius entomològics per tal d'obtenir de 2 a 7 repeticions del bioassaig. S'infestaren a raó de 4 larves L2 per línia. La duració total del bioassaig fou de 10 dies.

*Exemple de bioassaig:*



**Protocol:**

- Infestar les plantes amb larves en estadi L2. És necessari utilitzar un pinzell humit per a manipular-les sense danyar-les. S'obre la 2a-3a fulla en el punt on s'uneix a la tija i es disposen les 4 larves.
- Col·locar les plantes dins els dispositius amb molt de compte de no fer moviments bruscs, ja que les larves podrien desprendre's.
- Després de 10 dies d'infestació, recuperar les larves de l'interior de les tiges. Cal obrir completament tota la planta per recuperar totes les larves. És de gran utilitat emprar un bisturí per tallar, de manera longitudinal, les tiges; s'ha d'anar amb molt de compte perquè la majoria de les larves es trobaran en aquest punt.
- Les larves es pesen individualment en una balança de precisió.
- Si es requereix l'estudi dels intestins, s'extrauran amb l'ajut d'una lupa binocular i pinces especials d'entomologia.

- La larva es situa en un vidre de rellotger en solució fisiològica (NaCl 0,9%), mantinguda en gel (les temperatures baixes actuen d'anestèsia suau per a la larva, i així alentirà els seus moviments).
- S'extreu l'intestí i es congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **5. ANÀLISIS HISTOQUÍMICS DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *uidA* (enzim GUS) EN PLANTES TRANSGÈNIQUES**

L'enzim  $\beta$ -glucuronidasa o GUS és codificat per el gen *uidA*. Aquest enzim hidrolitza el substrat incolor 5-bromo-4-clor-3-indol  $\beta$ -D-glucurònid (X-GLU) en un compost que forma cristalls blaus, el *diXH-indigo*. En el present treball, s'han realitzat anàlisis histoquímics de l'expressió del gen *uidA* sota control de la zona promotora del gen *mpi*, en diferents teixits de plantes d'arròs transgèniques, així com sota condicions de ferida mecànica. El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Jefferson *et al.* (1987). Les mostres de teixit vegetal han estat preses sota diferents condicions que es detallen a continuació. Les mostres es prengueren de plantes en estadi de 3-4 fulles.

- *Tija*: es seccionaren fragments de tija d'aproximadament 1,5 cm de longitud i es processaren.
- *Arrel*:
  - a) Es seccionaren fragments de les arrels d' 1 cm de longitud i es processaren (t=0h).
  - b) En una altra arrel de la planta, es realitzà un tall longitudinal mitjançant un bisturí. Les mostres foren recollides 2h després de realitzar la ferida (t=2h), i es processaren.
- *Llavor*:
  - a) Decorticació manual de les llavors i processament.
  - b) Decorticació manual de les llavors i tall longitudinal, processament.
  - c) Decorticació mitjançant abrasió intensa amb paper de vidre, i processament.
- *Cinètica d'inducció per ferida mecànica en fulla*:
  - a) Es va prendre mostra foliar d'1,5 cm de longitud i es processà (t=0h).
  - b) Es realitzaren talls paral·lels entre sí i perpendiculars al marge de la fulla, amb l'ajut d'un bisturí.
  - d) Es prengueren mostres d'1,5 cm a temps 10 min, 30 min, 1h, 2h i 6h després de ferida mecànica; rebutjant sempre els primers 0,5 cm de fulla ferida. Es processaren les mostres.
- *Inducció per ferida mecànica a nivell local i sistèmic*:
  - a) Es va prendre mostra foliar d'1,5 cm de longitud i es processà (t=0h).
  - b) Mitjançant un bisturí, vàrem fer talls paral·lels entre sí i perpendiculars al marge de la primera fulla emergida.
  - c) 6 hores després de la primera ferida, vàrem repetir el procés de ferida però en la segona fulla emergida.
  - d) A les 18h després de la primera ferida, vàrem prendre mostres de les fulles ferides (mostra local) i de la última fulla emergida no ferida (mostra sistèmica). Les mostres es processaren.

**Protocol:**

- La mostra es submergeix en solució X-GLUC.
  - S'aplica el buit durant 20 min per tal que el substrat penetri en els teixits.
  - S'incuba la mostra durant 1h 30 min a 37°C (\*).
  - Es retira el substrat i es procedeix a fer rentats amb etanol 70%.
  - Es realitza un rentat amb etanol 90%.
  - Les mostres es conserven en etanol 90% a 4°C.
- (\* en l'assaig amb les llavors, les mostres es dividiren i una part s'incubà durant 1h30min en solució X-GLU, mentre que l'altra part de les mostres foren incubades tota la nit.

*Tampó P (per 10 ml) :*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (100 mM)	1 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (100 mM)	4 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml
(50 µM; pH 7,0)	

*Solució X-GLU (per 10 ml) :*

Tampó P (50 µM)	8 ml
metanol 20%	2 ml
X-GLUC(*)	1 µM
(*)10 mg X-GLUC en 100 µl de DMSO	

**6. ASSAIGS D'ACTIVITAT ANTIFÚNGICA DE PÈPTIDS I PROTEÏNES****6. 1 Assaigs d'activitat antifúngica *in vitro*****Protocol:**

- Treballar sempre sota la campana de flux laminar i en condicions d'esterilitat.
- Créixer els fongs plaques d'agar amb el medi adequat (veure taula) durant aproximadament 2 setmanes (fins que el miceli del fong ocupi tota la placa de Petri).

Espècie	Temperatura	Medi (*)
<i>Fusarium spp.</i>	25°C	PDB
<i>Magnaporthe grisea</i> i <i>M. salvinii</i>	28°C	PDB
<i>Phytophthora infestans</i>	18°C	V8

(\*) veure apartat 4.2

- Afegir 5 ml d'H<sub>2</sub>O estèril a la placa i passar suaument per sobre una nansa de sembres esterilitzada per tal de desprendre les espores del miceli.
- Recollir les espores amb una pipeta, filtrar per *Mira cloth* (Calbiochem) estèril i comptar amb una càmera *Burker*.

- Diluir amb H<sub>2</sub>O estèril a la concentració de 1x10<sup>5</sup> espores/ml (per *Fusarium spp.*) o 1x10<sup>6</sup> espores/ml (per *Magnaporthe spp.* i *Phytophthora infestans*).
- En una placa d'ELISA, afegir:
  - 150 µl medi PDB líquid (amb 0,03 µg/l de cloramfenicol)
  - 50 µl d'espores a les concentracions citades.
- Incubar segons el fong
  - 5h per *Fusarium spp.* a 25°C a la llum.
  - 6h per *Magnaporthe spp.* a 28°C a la llum.
  - 6h per *P. infestans* a 18°C a la llum.
- Afegir el pèptid o la proteïna a assajar a diferents concentracions (sempre en un volum inferior als 2 µl; per concentracions més elevades es redueix el volum de medi líquid PDB per obtenir un volum final de 200 µl). En els controls negatius s'hi afegeix Nystatin (a 0,1µg/µl, Sigma).
- Llegir la D.O. a 595 nm, prenent aquesta lectura com a t=0h.
- Incubar la placa (a 28°C amb fotoperíode de 12h de llum i 12h de foscor) i llegir a les 16, 20, 24 i 48h.

En el present estudi, es realitzaren habitualment tres rèpliques per a cada concentració de pèptid o proteïna a assajar.

## **6. 2 Assaigs d'activitat antifúngica *in vitro* en presència d'ICF**

### **6.2.1 Extracció d'ICF d'arròs**

#### **Protocol:**

- Tallar les fulles de plantes d'arròs de 10 dies, en fragments d' 1 cm.
- Submergir-les en un matràs de Kitasato amb tampó d'infiltració. Col·locar el matràs de Kitasato en gel.
- Aplicar el buit durant 30 segons, de 4 a 5 vegades consecutives (els fragments de fulla es tornaran més foscos si hi ha hagut infiltració).
- Assecar lleugerament les fulles sobre un paper secant.
- Embolicar els fragments de fulla en teixit *Miracloth* (Calbiochem). Introduir dins una columna (tipus PD-10 (Pharmacia Biotech). Utilitzar únicament el recipient, sense resines).
- Introduir la columna en un tub i centrifugar a 2.000g, 5 min.
- Recuperar el líquid resultant i determinar la quantitat de proteïnes pel mètode de *Bradford* (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad).
- Es comprova l'activitat proteàsica d'aquests fluids intercel·lulars mitjançant el substrat universal per a proteases *Casein, resorufin-labeled* (Boehringer Mannheim) (veure el protocol a l'apartat 2.4.1).

<i>Tampó d'infiltració per fulles d'arròs:</i>	Hepes pH 7,5	50 mM
	Sacarosa	100 mM

Es pot comprovar la qualitat dels ICF, fent un gel SDS-PAGE (15%) i tenyint amb Blau de Coomassie. Si s'ha donat ruptura de les cèl·lules vegetals durant el procés d'infiltració, s'apreciarà una banda

corresponent al dímer de la Rubisco (70 kDa), així com bandes que corresponen a la subunitat gran (55 kDa) i la subunitat petita (15 kDa). Si és així, els ICFs d'arròs no poden ser utilitzats ja la presència de la Rubisco indica contaminació amb fluids intracel·lulars.

### **6.2.2 Assaig d'activitat antifúngica *in vitro* en presència d'ICF**

El pèptid o proteïna per la qual es vol assajar l'activitat antifúngica, s'incuba durant 30 min en gel amb diferents concentracions d'ICF d'arròs. Seguidament, es segueix el protocol per a l'assaig d'activitat antifúngica *in vitro* tal i com es descriu en l'apartat 6.2.1. Cal realitzar un control en presència d'ICFs però no de la proteïna antifúngica a assajar.

### **6.3 Assaigs de resistència a patògens en arròs**

En el present estudi s'utilitzaren plantes d'arròs de la varietat Sènia, que foren crescudes fins a l'estadi de 4 fulles. S'obtingueren espores del fong *Magnaporthe grisea* mitjançant el mètode descrit a l'apartat 6.1.

#### **Protocol:**

- Preparar una suspensió d'espores a  $2-4 \times 10^5$  espores/ml i 0,02% de Tween 20.
- Les plantes són inoculades amb aquesta suspensió mitjançant la deposició de gotes localitzades en la superfície de la fulla o bé mitjançant aspersió fins a cobrir la superfície de les fulles. És important que la superfície de la fulla no s'assequi ràpidament, ja que les espores no podrien germinar.
- Després de 24h de la inoculació, aplica la proteïna AFP (10  $\mu$ M) ja sigui en la zona localitzada on s'havia dipositat la gota d'espores o bé, si s'havia ruixat, es ruixa també amb la proteïna AFP. Les plantes control són tractades amb H<sub>2</sub>O estèril.
- Es fa un seguiment visual del desenvolupament dels símptomes de la infecció al llarg del temps. Vàrem poder apreciar les primeres lesions en les plantes control després de 7 dies. Per poder copsar la resistència de la planta a *M. grisea*, vàrem perllongar l'assaig 6 setmanes.

## **7. VIABILITAT DE PROTOPLASTES D'ARRÒS**

---

### **7.1 Obtenció de protoplastes d'arròs**

En el present estudi s'utilitzaren llavors d'arròs de la varietat Sènia per a l'obtenció de protoplastes.

#### **Protocol:**

- Es desinfecten llavors d'arròs i es fan germinar en gerres amb medi MS, a raó de 12 llavors per gerra.
- Quant assoleixen aproximadament 50 cm d'alçada, es tallen en fragments d'1 cm.
- Incubar en 8 ml de solució enzimàtica per g de pes fresc. La incubació es realitza en agitació (50 r.p.m.) a la foscor i a 24°C, durant 18h.
- Filtrar a través d'una malla de niló de 63  $\mu$ m.
- Afegir al líquid filtrat, 15 ml de medi W5.
- Centrifugar el líquid a 80g durant 5 min.

- Resuspendre el pellet en 8 ml de medi W5 + 0,6 M sacarosa.
- Centrifugar el líquid a 80g durant 5 min.
- Recuperar la interfase amb molta cura.
- Contar les cèl·lules amb una càmera de Nageotte.
- Ajustar la densitat de protoplastes a  $1,6 \times 10^6$  protoplastes /ml amb medi CPW13M.

<i>Solució enzimàtica:</i>	Cel·lulasa Onozuka RS*	2% p/v
	Macerozyme*	0,5% p/v
	Manitol	13% p/v
	pH 5,6	
	(* ambdós de Yakult Honsha)	

<i>Medi W5:</i>	NaCl	9 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	18,3 g/l
	KCl	0,37 g/l
	Glucosa	0,99 g/l
	pH 6	

<i>Medi CPW13M:</i>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,16 mM
	KNO <sub>3</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
	KI	1 μM
	CuSO <sub>4</sub>	0,1 μM
	Manitol	71 mM
	pH 5,8	

## 7.2 Viabilitat de protoplastes d'arròs en presència de la proteïna AFP

La viabilitat de protoplastes d'arròs en presència de la proteïna AFP fou comprovada mitjançant una tinció amb diacetat de fluoresceïna (FDA). Es realitzaren 2 experiments independents i tres rèpliques en cadascun d'ells.

### Protocol:

- L'AFP es dissolt en medi CPW13M fins a obtenir la concentració final desitjada (1, 5 i 10 μM), i s'afegeix amb molta cura a la suspensió de protoplastes.
- Els protoplastes s'incuben amb l'AFP durant 24h a 28°C, a la foscor.
- Afegir una gota de solució de FDA a 10 ml de medi CPW13M.
- Afegir a la suspensió de protoplastes, el mateix volum d'aquesta solució FDA-CPW13M.
- Abans d'afegir aquesta solució, en els controls negatius s'efectua el següent tractament:
  - congelació a -80°C
  - pipetejat brusc
  - congelació a -80°C
  - + 65°C
- Després de 5 min s'observa la mostra al microscopi de fluorescència.