

Universitat Autònoma de Barcelona

**Expressió simultània de gens de defensa
per a la producció
de varietats d'arròs resistents a patògens i
insectes plaga**

Memoria presentada per:

Jordi Quilis Blasi

Per a optar al grau de Doctor
en Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Blanca San Segundo de los Mozos
al Consorci CSIC-IRTA de Genètica Molecular Vegetal.

Departament de Genètica Molecular

Financiat amb una beca predoctoral per la formació de personal investigador
(2002FI 00035) de la Generalitat de Catalunya

Dra. Blanca San Segundo
Directora de la tesi doctoral

Jordi Quilis Blasi

**Dr. F. Xavier Avilés i
Puigvert**
Tutor del Dept. Bioquímica i
Biologia Molecular

Barcelona, 2007

ConSORCI



IRTA

Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
IBMB-CSIC

Expressió simultània de gens de defensa per a la producció de varietats d'arròs resistents a patògens i insectes plaga

Jordi Quilis Blasi

Barcelona, 2007

***Als que han entès la importància d'aquest esforç,
i especialment als que l'han compartit.***

INTRODUCCIÓ **1**

1	L' IMPORTÀNCIA DE L'ARRÒS	1
2	PLAGUES I PATÒGENS DE L'ARRÒS	2
2.1	Les plagues de l'arròs.	2
2.1.1	<i>Chilo suppressalis</i>	3
2.1.2	<i>Spodoptera littoralis</i>	6
2.2	Patògens de l'arròs	8
2.2.1	<i>Magnaporthe grisea</i>	8
2.2.2	<i>Fusarium verticillioides</i>	11
2.2.3	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	13
2.2.4	<i>RYMV (Rice yellow mottle virus)</i>	14
3	MECANISMES DE DEFENSA DE LES PLANTES	18
3.1	Interacció planta-patogen	18
3.2	La resposta local	20
3.2.1	Espècies reactives d'oxigen (ROS)- cadena de transmissió intracel·lular	20
3.2.2	Proteïnes relacionades amb patogènia (PR, <i>Pathogenesis-Related Proteins</i>)	20
3.3	La Resposta Sistèmica Adquirida (SAR)	28
3.3.1	Senyalització dependent de àcid salicílic (SA)	28
3.3.2	Senyalització sistèmica	31
3.3.3	Transmissió de la senyal per a la resposta SAR	31
3.3.4	Via d'activació de la resposta SAR no dependent de NPR1	36
3.3.5	Cost biològic de la SAR	37
3.4	Regulació i interconnexió de les diferents vies de senyalització	38
3.4.1	Patògens Biotròfics o Necrotròfics	38
3.4.2	La intercomunicació entre les vies de defensa	39
3.5	ISR (Resistència Sistèmica Induïda)	40
3.6	Silenciament gènic com a resposta de defensa front virus	42
4	RESPOSTA DEFENSIVA FRONT INSECTES HERBÍVORS	44
4.1	Compostos defensius i la resistència induïda front herbívors	45
4.2	Els Inhibidors de Proteases	46
4.2.1	Generalitats dels inhibidors de proteases	46
4.2.2	Classificació dels inhibidors de proteases	49
4.2.3	Els inhibidors de proteases i els insectes	50
4.2.4	Adaptació dels insectes als inhibidors de proteases	52
4.2.5	Els inhibidors de proteases i els patògens	53
4.2.6	MPI, l'inhibidor de proteases de blat de moro	55
4.2.7	L'inhibidor de carboxipeptidases PCI	58
4.3	Senyalització en la resistència induïda per ferida o insectes herbívors	60
4.3.1	Senyalització de defensa dependent d'àcid jasmònic (JA)	61
4.3.2	Diferències en la resposta a ferida entre espècies	66
4.3.3	Evasió de la resposta a ferida per part dels insectes	66

4.3.4	Emissió de molècules volàtils induïda per insectes i interaccions tritròfiques	67
5	LES PROTEASES	68
5.1	Classificació de les proteases	68
5.2	Les Proteases Digestives d'insectes	73
5.3	Proteases de Patògens	74
6	BIOTECNOLOGIA I AGRICULTURA	78
6.1	Procés de transformació genètica mediada per <i>Agrobacterium</i>	78
6.2	Cultius transgènics (gens <i>Cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>)	79
6.3	Biotecnologia i arròs	82
7	EXPRESSIÓ SIMULTÀNIA DE GENS DE DEFENSA EN PLANTES TRANSGÈNIQUES	85
7.1	Sistemes per a l'expressió de gens fusió	87
7.1.1	Seqüència processament 2A	89
7.2	Gens reguladors de la resposta de defensa de plantes com a transgens	90

OBJECTIUS **93**

RESULTATS **95**

I.	INHIBIDORS DE PROTEASES COM AGENTS INSECTICIDES I/O ANTIFÚNGICS	95
I.A.	INHIBIDORS DE PROTEASES CONTRA INSECTES	95
I. A. 1	<i>Perfil d'activitats proteolítiques digestives dels lepidòpters: C. suppressalis i S. littoralis</i>	95
I. A. 2	<i>Plantes d'arròs que expressen de manera induïble el gen mpi</i>	99
I. A. 2. 1	Efecte de l'expressió del gen mpi sobre proteases digestives de larves de <i>C. suppressalis</i>	100
I. A. 2. 2	Acumulació de la proteïna MPI en teixits de plantes d'arròs transgèniques	103
I. A. 3	<i>Plantes d'arròs que expressen un gen que codifica una proteïna fusió MPI-PCI: protecció front C. suppressalis</i>	106
I. A. 3. 1	Preparació de les construccions mpi-2A-pci i mpi-C-pci per a la transformació	106
I. A. 3. 2	Obtenció i caracterització molecular de plantes d'arròs transgèniques	110
I. A. 3. 3	Bioassaigs amb plantes que expressen un gen fusió mpi –pci amb larves de <i>C. suppressalis</i> : Efecte sobre pes i creixement de les larves alimentades en les plantes transgèniques	115
I. A. 3. 4	Resistència de les plantes que expressen mpi-pci a la infestació per <i>C. suppressalis</i>	127
I. A. 4	<i>Plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen pci: efecte sobre insectes lepidòpters</i>	129
I. A. 4. 1	Producció i caracterització molecular de les plantes d'arròs PCI	129
I. A. 4. 2	Bioassaigs en plantes d'arròs amb expressió constitutiva del gen pci: Efecte sobre el pes i creixement de larves de <i>C. suppressalis</i> i <i>S. littoralis</i> alimentades en plantes transgèniques	132

<i>I. A. 5 Plantes d'arròs que expressen simultàniament els gens mpi i pci obtingudes mitjançant creuaments</i>	137
<i>I. A. 6 Plantes d'arròs amb expressió constitutiva de gens Cry1Aa i Cry1B: bioassaigs amb C. suppressalis</i>	139
I.B. PCI: UN INHIBIDOR DE PROTEASES AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA	142
I. B. 1 Anàlisi de l'expressió del pci en plantes de patata infectades amb <i>P. infestans</i>	142
I. B. 2 Activitat antifúngica in vitro de la proteïna PCI	144
I. B. 4 Localització del PCI en hifes de <i>M. grisea</i>	146
I. B. 5 Resistència a la infecció fúngica de les plantes d'arròs que expressen constitutivament <i>pci</i>	149
I.B.6 Purificació i caracterització d'una carboxipeptidasa de <i>M. grisea</i> subceptible a inhibició per PCI	154
I. B. 6 Predicció de l'estructura tridimensional de la carboxipeptidasa de <i>M. grisea</i>	162
II. EXPRESSIÓ DEL GEN AtNPR1 D'ARABIDOPSIS EN PLANTES D'ARRÒS	165
<i>II. 1. Obtenció de plantes transgèniques d'arròs AtNPR1</i>	165
II. 1. 1 Preparació de construccions per a la transformació d'arròs	165
II.1.2 Transformació d'arròs	167
II. 1. 3 Nivell d'expressió del gen AtNPR1 en plantes d'arròs	167
<i>II. 2. Resistència de plantes d'arròs AtNPR1 front patòges</i>	168
II.2.1 Resistència de les plantes d'arròs AtNPR1 davant de fongs	168
II.2.2 Resistència de les plantes d'arròs AtNPR1 front <i>E. chrisanthemi</i>	172
II.2.3 Susceptibilitat de les plantes d'arròs AtNPR1 front RYMV	174
<i>II.3 Anàlisi de l'expressió de gens de defensa en les plantes d'arròs AtNPR1</i>	180
<i>II. 4 Formació de lesions espontànies en plantes d'arròs AtNPR1</i>	186
<i>II.5. Efecte de la sobreexpressió del gen AtNPR1 sobre el creixement vegetatiu i la productivitat de plantes d'arròs</i>	190
<i>II.6 Efecte de la sobreexpressió del gen AtNPR1 en plantes d'arròs sobre la tolerància a sequera i salinitat</i>	193

DISCUSIÓ GENERAL **195**

CONCLUSIONS **223**

MATERIAL I MÈTODES **227**

A. MATERIALS

1 MATERIAL BIOLÒGIC	227
2 MATERIAL NUCLEIC	228
3 ANTICOSSOS	228
4 MEDIS DE CULTIU	228

B. MÈTODES

1	MÈTODES RELACIONATS AMB ÀCIDS NUCLÈICS	233
1.1	Preparació de cèl·lules competents d' <i>Escherichia coli</i>	233
1.2	Preparació de cèl·lules competents d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	233
1.3	Transformació de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i>	233
1.4	Extracció d'ADN genòmic	234
1.5	Extracció de RNA total	235
1.6	Obtenció d'ADN plasmídic	235
1.7	Subclonatge de fragments d'ADN en plasmidis	237
1.8	Obtenció de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)	237
1.9	Reacció de PCR	238
1.10	Transferència i hibridació d'àcids nucleics	240
1.11	Seqüenciació d'àcids nucleics	243
2	MÈTODES RELACIONATS AMB PROTEÏNES	244
2.1	Extracció de proteïnes totals	244
2.2	SDS-PAGE	246
2.3	Precipitació de proteïnes	247
2.4	Immunotransferència	247
2.5	Determinació d'activitats proteolítiques	249
2.6	Cromatografia d'afinitat del PCI inmovilitzat	252
2.7	Seqüenciació de proteïnes mitjançant espectrometria de masses	253
3	MÈTODES DE TRANSFORMACIÓ D'ARRÒS	255
3.1	Desinfecció de grans d'arròs:	255
3.2	Inducció de calls embriogènics a partir de l'escutel de l'embrió zigòtic madur	255
3.3	Transformació per <i>Agrobacterium</i>	256
3.4	Selecció de plantes transgèniques homozigòtiques	259
4	OBTENCIÓ DE CREUAMENTS D'ARRÒS	259
5	BIOASSAIGS AMB INSECTES	260
5.1	Obtenció de <i>Chilo suppressalis</i>	260
5.2	Bioassaig amb <i>C. suppressalis</i>	261
5.3	Assaigs amb <i>Spodoptera littoralis</i>	262
6	ASSAIGS D'ACTIVITAT ANTIFÚNGICA	262
6.1	Assaigs de l'activitat antifúngica <i>in vitro</i>	262
6.2	Assaigs de resistència a fongs patògens en arròs	263
6.2.1	Assaig de resistència a <i>M. grisea</i> en planta sencera.	264
6.2.2	Assaig de resistència a <i>Fusarium verticillioides</i>	264
6.2.3	Assaig de resistència a <i>M. grisea</i> en fulla tallada.	264
6.2.4	Tinció amb els colorants "sytox green" i "congo red" de espores de <i>M.grisea</i> germinades i tractades amb la proteïna PCI.	264
6.3	Marcatge de la proteïna PCI amb fluorocroms Alexa-488 i 568, i visualització sobre espores de <i>M.grisea</i>	265
7	ASSAIGS AMB BACTERIS	265
8	ASSAIGS AMB VIRUS	265

8.1	Assaig de resistència de plantes d'arròs al <i>Rice yellow mottle virus</i> (RYMV)	265
8.2	Anàlisi de la càrrega viral:	266
9	INFECCIONS DE PLANTA DE PATATA AMB <i>P. INFESTANS</i>	267
10	ESTRESSOS ABIÒTICS	267
10.1	Tractaments de salinitat i sequera	267
10.1.1	Salinitat	267
10.1.2	Sequera	268
11	TINCIONS HISTOQUÍMIQUES	268
11.1	Determinació de l'ió superòxid O ₂ ⁻ (tinció amb NBT)	268
11.2	Determinació d'autofluorescència en fulles d'arròs	268
11.3	Tinció amb blau de lactofenol (" <i>Triphan blue</i> ")	269
12	ANÀLISIS BIOINFORMÀTICS	269
12.1	Anàlisi de seqüències i filogenies.	269
12.2	Modelatge de l'estructura tridimensional.	269

BIBLIOGRAFIA

271

A	adenina o adenosina
Aa	aminoàcid
AAFP	<i>N-(4-methoxyphenyl-azoformyl)-L-phenylalanine</i>
ABA	àcid abscísic
Ac	anticòs
ADN	àcid desoxiribonucleic
ANA	àcid naftalè acètic
APS	persulfat amònic
APX	ascorbat peroxidasa
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatge
BAPNA	<i>Nα-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide</i>
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
BrEt	bromur d'etidi
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	citosina
CAT	catalasa
CP	proteïna de coberta
CPA, CPB	carboxipeptidasa A, B
C-terminal	carboxiterminal
Da	daltons
DAS	<i>double antibody sandwich</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxirribonucleic
dNTP	desoxirribonucleòtids
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ESM	error standard de la mitja
<i>et al.</i>	<i>et alter</i> , i col·laboradors
FAAK	<i>N-(3-[2-furyl] acryloyl)-Ala-Lys</i>
G	guanina o guanosina
HA	<i>hippuryl-L-arginine (benzoyl-glycyl-arginine)</i>
Higro	higromicina
HPA	<i>hippuryl-phenylalanine (benzoyl-glycyl-phenylalanine)</i>
IRNA	RNA interferència
ISR	resistència sistèmica induïda
JA	àcid jasmònic
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
L1, L2, L3...	estadi de desenvolupament larvari 1, 2... (insectes)
LB	Luria-Bertani
LpNA	<i>L-leucine p-nitroanilide</i>
MeJA	Metiljasmonat
MgCPB	carboxipeptidasa B de <i>Magnaporthe grisea</i>
MPI	<i>Maize Protease Inhibitor</i>
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NO	òxid nítric
Nos	nopalina sintasa
N-terminal	aminoterminal
O ₂	oxigen
ORF	pauta oberta de lectura

ABREVIATURES

p/v	pes/volum
pb	parells de bases
pBSK	<i>pBluescript SK</i>
PBZ	<i>probenazole-inducible protein</i>
PCA, PCB	procarboxipeptidasa A, B
PCPAHa	procarboxipeptidasa A de <i>Helicoverpa armigera</i>
PCPBHz	procarboxipeptidasa B de <i>Helicoverpa zea</i>
PCI	<i>Potato Carboxipeptidase Inhibitor</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
P-Glu-Phe-Leu-pNA	<i>L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide</i>
POX	peroxidasa
PRs	proteïnes de resistència
PTGS	silenciament gènic post-transcripcional
RISC	<i>RNA induced silencing complexes</i>
RNA	àcid ribonucleic
RNAsa	ribonucleasa
ROS	espècies reactives d'oxigen
RYMV	<i>Rice Yellow Mottle Virus</i>
SA	àcid salicilic
SA ₂ PLpNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide</i>
SA ₃ pNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide</i>
SA ₃ PPpNA	<i>N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide</i>
SAR	resposta sistèmica adquirida
SBBI	<i>Soybean Bowman-Birk Inhibitor</i>
SDS	dodecil sulfat sòdic
SKTI	inhibidor de tripsina de soja (Kunitz)
sRNA	<i>small RNAs</i>
siRNA	<i>short interfering RNAs</i>
T	timidina
T0, T1, T2...	generació 0, 1, 2... (plantes)
TA	temperatura ambient
Temed	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
ubi	ubiquitina
UDO	unitats de densitat òptica
VIGS	<i>virus induced gene silencing</i>

A les seqüències aminoacídiques:

F Fenilalanina, Phe	S Serina, Ser	Y Tirosina, Tyr	K Lisina, Lys	W Triptofan, Trp
L Leucina, Leu	P Prolina, Pro	H Histidina, His	D Aspartic, Asp	R Arginina, Arg
I Isoleucina, Ile	T Treonina, Thr	Q Glutamina, Gln	E Glutamic, Glu	G Glicina, Gly
M Metionina, Met	A Alanina, Ala	N Asparragina, Asn	C Cisteïna, Cys	V Valina, Val

1 L'IMPORTÀNCIA DE L'ARRÒS

L'arròs, tot i ser el tercer cereal més cultivat del món, darrera el blat i el blat de moro, és el primer cultiu en importància, degut a que es tracta de la principal font d'aliment per més de la meitat de la població mundial. L'arròs alimenta al voltant de tres mil milions de persones arreu del món, majoritàriament a l'Àsia, on és el principal aliment de primera necessitat, aportant entre un 40 i un 70% de les calories totals consumides. També és utilitzat per l'alimentació animal, i proporciona la major font d'ingressos en el món rural dels països en desenvolupament. Anualment, la superfície destinada al seu cultiu és de 154 milions d'hectàrees, el que suposa aproximadament el 11% de la superfície total cultivada. L'arròs és un dels cultius més diversos, ja que és crescut des de les altituds més al nord de la Xina fins a les més al sud, com Uruguai i Austràlia. Per altra banda, l'arròs pot créixer des d'alçades de 300 m, com al Nepal, fins a 3 m sota el nivell del mar, com en alguns cultius de l'Índia (Khush, 2005). La major part dels conreus d'aquest cereal al món, corresponen a ecosistemes d'irrigació (55%), seguit dels de secà (35-40%) i finalment els d'inundació (5-10%) (Ortells, 2003).

A Europa, l'arròs es cultiva principalment a Itàlia (50%), Espanya (25%), França, Portugal i Grècia. El tipus *Japonica* és el més cultivat, a ell pertanyen les varietats Sènia i Ariete, que són les varietats més cultivades a Espanya-Grècia i Itàlia-França, respectivament. Ambdues són les utilitzades en aquest treball.

L'arròs és una planta monocotiledònia de la família de les Poàcees, del gènere *Oryza*, del qual només dues espècies, *O. glaberrima* i *O. sativa*, són cultivades. Totes les espècies de *Oryza* són diploides amb $2n=24$. *O. sativa*, és autògama i anual, i s'ha dividit en tres subespècies segons el seu fenotip, característiques serològiques i barreres reproductives: *Japonica*, *Indica* i *Javanica* (Kato *et al.*, 1928; Oka, 1958). La planta d'arròs presenta tiges rodones i buides formades per nusos i entrenusos, fulles de làmina plana unides a la tija per la beina i la seva inflorescència és en panícula. L'alçada de la planta oscil·la entre els 0,4 m (varietats enanes) fins a més de 6,0 m (varietats flotants), sent en la majoria de casos d'uns 1,5 m. El gra, està format per diferents capes de teixits situant-se l'embrió a la part inferior, parcialment en contacte amb l'aleurona (capa que envolta també l'endosperm).

A la **Figura 1** es mostra la morfologia de les diferents parts de la planta d'arròs (*O. sativa*).



Figura 1. A) Morfologia de les diferents parts d'una planta d'arròs (www.biolib.de). B) Arrossar del Delta de l'Ebre al juliol (Deltebre, fotografia: Laura Rico). C) Arrossar del Delta de l'Ebre al setembre, abans de la collita (Muntmells).

2 PLAGUES I PATÒGENS DE L'ARRÒS

2.1 Les plagues de l'arròs.

Els insectes són unes de les principals causes de pèrdues en la producció del cultiu de l'arròs. A més, les plagues requereixen mesures de control molt costoses tant a nivell econòmic com ambiental.

L'arròs, és l'hoste de moltes espècies d'insectes, dels quals una trentena tenen gran incidència econòmica. Dintre d'aquests, els més perjudicials són els anomenats barrinadors de tiges.

Els barrinadors, en general, poden arribar a causar pèrdues anuals de milions de tones de collita, i cada any s'hi destinen milers de milions de dòlars per al seu control mitjançant pesticides, amb un elevat cost ambiental afegit (De Maag *et al.*, 1999). Es tracta d'insectes que pertanyen a dos ordres, els dípters i els lepidòpters. En el cas dels dípters, són només dues les espècies descrites com a plagues de l'arròs, *Diopsis apicalis* i *Diopsis macrophtalma*. Es troben en certes regions africanes i no causen danys econòmics importants. Són els lepidòpters, els barrinadors més destructius. Aquests es troben, principalment, en tres gèneres: *Chilo*, *Scirpophaga* i *Sesamia*, englobant aproximadament una quarantena d'espècies. Els més perjudicials pertanyen a la família *Crambidae* (*Pyralidae*) (*Chilo suppressalis* i *Scirpophaga incertulas*), a diferència de la família *Noctuidae* (*Sesamia inferens*) que són polífags i causen pèrdues econòmiques importants només de manera ocasional (Arraudeau, 1998)

2.1.1 *Chilo suppressalis*

Chilo suppressalis (Walker), col·loquialment també anomenat “taladre”, “piral” o “cucat” de l’arròs, és una de les espècies de barrinadors més esteses a tot el món, sent una plaga que causa grans pèrdues en les collites.

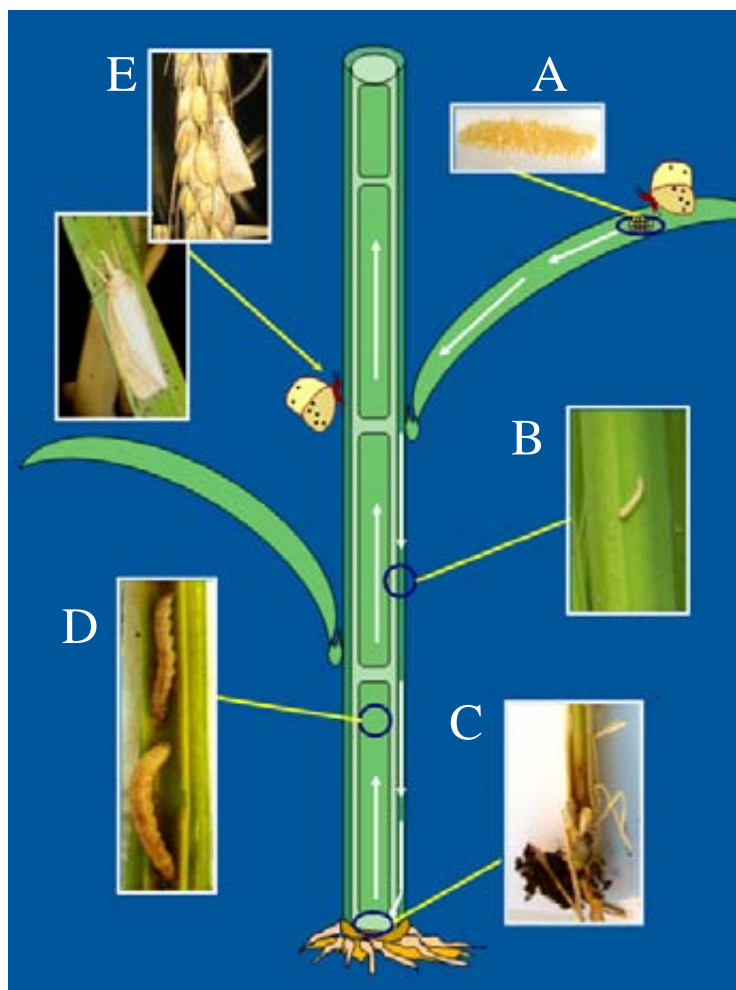
Es tracta d’una espècie originària del sud-est asiàtic, procedent de Japó i la part oriental de la Xina, des d’on es va estendre cap a l’Índia, Sibèria i Hawaii, arribant fins i tot a Europa, principalment Espanya i França. Així, a la Península Ibèrica, aquest lepidòpter ha estat detectat majoritàriament al Delta de l’Ebre i a l’Albufera de València, tot i que actualment té caràcter de plaga a les províncies de Tarragona, Girona, València i Osca, i es presenta de forma ocasional a les províncies de Sevilla i Badajoz. A França es la principal plaga dels arrossars de la Camarga (Delta del riu Roine).

Morfologia: Els adults o papallones de *C. suppressalis* presenten una envergadura alar de 20-28 mm sent les femelles lleugerament més grosses que els mascles. Les ales anteriors són de color beix (més fosques en els mascles) amb presència de punts negres, i les posteriors blanques (grisoses en els mascles). La posta, de forma irregular, consta d’agrupacions aplanades (ooplaques) de 50-80 ous, tot i que poden arribar fins als 200. Cada femella fa una posta de 100 a 500 ous durant tres o cinc dies. Els ous són el·líptics, aplanats i groguencs, d’uns 0,8-0,9 mm de longitud per 0,5-0,6 mm d’amplada. Les larves són de color beix clar amb cinc bandes longitudinals fosques, i la càpsula cefàlica és bruna. Al final del seu desenvolupament poden mesurar fins a 26 mm. La crisàlida, d’aspecte fusiforme, és de color vermellós i mesura uns 15 mm de mitjana.

Cicle biològic: Els adults, d’hàbits crepusculars i nocturns, viuen entre 3 i 6 dies, i esdevenen actius cap a les set o vuit del vespre. Les femelles ponen els ous a l’anvers de les fulles desplegadas, on neixen les larves després d’uns cinc dies. Les larves neonates, es dirigeixen a les beines que rodegen la tija i les perforen. Als dos dies, solen baixar entre les beines per perforar la tija a nivell de la base, tot just per sobre de les arrels, i després ocupen les parts internes de la planta on té lloc tot el desenvolupament larvari i la crisalidació. Aquesta és, sens dubte, la major dificultat que presenta la lluita contra aquesta plaga mitjançant pesticides, ja que aquests no arriben al punt on s’està desenvolupant la larva. Les crisàlides donen lloc als adults en 8-10 dies. Durant el seu desplaçament per la tija, realitzen forats per respirar propers als nusos, els quals podran ser emprats més endavant per l’adult com a sortida **(Figura 2)**.

INTRODUCCIÓ

Figura 2. Cicle biològic de *C. suppressalis*. A) Posta (ooplaques) B) larva neonata que baixa entre les beines fins a la base de la tija. C) Part inferior de la tija, just sobre les arrels, per on penetra la larva. D) Larves circulant i alimentant-se per dins de la tija. Dins de la tija té lloc el desenvolupament larvari i la crisalidació. E) Individu adult de *C. suppressalis*.



Als arrossars mediterranis, concretament al Delta de l'Ebre i a la Camarga francesa, *C. suppressalis* completa fins a 3 generacions al llarg de l'any, tot i que la última, es desenvolupa entre una temporada i la següent. Passa l'hivern en estat larvari, trobant-se majoritàriament en plantes de senill (*Phragmites sp.*, espècie gramínia de condicions semblants a l'arròs), i en rostoll d'arròs mentre n'hi ha. A partir de finals d'abril i fins a mitjans de juny, aquestes larves de la generació hivernant, crisaliden donant lloc als primers adults de la temporada, coincidint amb el inici del desenvolupament de la planta d'arròs. Les seves postes, donen lloc a les larves de la 1^a generació. Aquestes, passen per 6 estadis (L2 a L7) abans de crisalidar i completen el seu desenvolupament en uns 48 dies de mitjana. Així, a partir de principis de juliol emergeixen els primers adults que donaran lloc a la 2^a generació. Aquestes passen per 5 estadis i presenten un desenvolupament més ràpid (28 dies de mitjana), la qual cosa porta a que, a partir de mitjans d'agost, ja comencin a aparèixer els seus adults. Aquesta 2^a generació, coincideix amb l'època de floració i maduració del cultiu de l'arròs, i dona lloc al 3^{er} vol de *C. suppressalis*. A finals d'agost ja hi ha larves de 3^a generació a les plantes d'arròs, les quals, juntament amb les més tardanes de la 2^a

generació, són les que entren en diapausa i hivernen, completant el seu desenvolupament la temporada següent (Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca; DARP, 2006) (**Figura 3**).



Figura 3. Cicle biològic de les poblacions del barrinador de l'arròs, *C. suppressalis*, a la regió Mediterrània (adaptat de Breitler, 1999).

La temperatura és el factor més important pel desenvolupament de *C. suppressalis*. Per sobre dels 35°C, els ous i les crisàlides presenten una taxa de mortalitat molt elevada. A l'Àsia, a diferència d'Europa, *C. suppressalis* no realitza diapausa, i en funció de les temperatures i la disponibilitat de plantes hostes, pot tenir entre una i cinc generacions.

Danys a la planta: Els símptomes que es deriven de l'atac del barrinador de l'arròs, i els danys que provoca, varien segons l'estat de desenvolupament en que es trobi la planta d'arròs en el moment de l'atac, i són la conseqüència directa de l'alimentació de les larves per l'interior de la tija.

Així, si la planta es troba en estat vegetatiu, el símptoma més clar és l'aparició de una o dues fulles centrals completament seques i enroscades sobre si mateixes en sentit longitudinal. Això sol anar acompanyat de l'engrogiment de les zones on el barrinador s'ha estat alimentant. Aquest primer atac, provocat per larves de 1^a generació, es veu compensat per la capacitat d'afillolar que en aquests moments té la planta.

Si la planta està en estat de floració, el símptoma més visible (provocat per larves de 2^a generació) és l'aparició de les espigues d'un to esblanqueït, amb el pecíol ben dret, fet que contrasta fortament amb les plantes sanes, que presenten l'espiga de color verd i amb el pecíol tombat pel pes dels grans ben desenvolupats. Aquest símptoma és característic de l'atac de *C. suppressalis*, i és el dany que pot provocar més pèrdues en les collites d'arròs.

INTRODUCCIÓ

Si l'atac es produeix en l'estadi de maduració (sol ser provocat per les larves de la 2^a i 3^a generació), les pèrdues es deuen a que el debilitament de la tija afavoreix la caiguda de les espigues a l'aigua. Si les espigues ja han madurat, la producció es veu poc afectada (DARP, 2006).

Mesures de Control: Hi ha poca informació de la presència d'enemics naturals de la plaga. La lluita és sobretot de tipus químic amb pesticides (tractaments aeris). Actualment, en algunes zones del Delta de l'Ebre, el tractament només s'efectua on el nivell d'atac ho requereix (segons l'aplicació dels conceptes nivell màxim d'atac econòmicament tolerable i llindar de tractament del DARP). Les larves d'estadis inicials són les més sensibles als productes. Amb el seguiment del vol dels adults amb trampes de feromona sexual, i del coneixement de l'estructura d'edats de la població al llarg de la temporada, es pot precisar el moment adequat del tractament (DARP, 2006).



Al Delta de l'Ebre s'està utilitzant també, des de fa 8 anys, les trampes com alternativa a l'ús massiu de pesticides, dur a terme per l'ADV (Associació per la Defensa dels Vegetals del Delta de l'Ebre). En les explotacions es situen les trampes que contindran les substàncies dissuasives (**Figura 4**). S'utilitzen dos tipus de substàncies: el *Tebufenozide* (substància que mimetitza l'hormona de muda de l'insecte) o les feromones de síntesi (substàncies que generen confusió sexual). Les feromones de síntesi atrauen els mascles, que atrets cauen a dins la trampa. Així doncs, s'evita la fecundació de la femella i, per tant, l'aparició de les larves del barrinador.

Figura 4. Trampa per al control biològic de les poblacions del barrinador de l'arròs *C. suppressalis*, al Delta de l'Ebre (Muntmells).

2.1.2 *Spodoptera littoralis*

Les espècies del gènere *Spodoptera*, com *Spodoptera littoralis* (*Egyptian cotton worm*) (Europa mediterrànea i Àfrica), *S. litura* (Àsia) o *S. frugiperda* i *S. Eridania* (Amèrica), són importants plagues per a molt cultius.

Spodoptera littoralis és una plaga molt destructiva de l'agricultura subtropical i tropical. Els estadis larvals s'alimenten d'un ampli ventall de plantes, incloent cultius comestibles i ornamentals (<http://www.inra.fr/internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/3spolit.htm>).

Morfologia: Els ous són gairebé esfèrics, de color groguenc, en un principi més clars i cap el final del desenvolupament, arriben a ser gairebé negres. Es disposen agrupats, en capes uns sobre els altres, i queden coberts i protegits per abundants escates que arrenquen les mares del seu extrem abdominal.

Les larves poden arribar a mesurar fins a 45 mil·límetres, són de coloració molt obscura i porten al dors, i ben centrada, una banda longitudinal clara flanquejada per altres dos taques negres (**Figura 5**).

De joves són de color beix, color que canvia cap a verd obscur amb el desenvolupament; tenen sobre cada segment un parell de berrugues negres. En repòs, les larves tenen la tendència a embolicar-se en espiral, per això tenen el nom comú de "rosquilla negra".



Figura 5. Morfologia d'una larva del lepidòpter *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) (www.ice.mpg.de).

El color de la pupa és vermellós. Tenen al voltant de 18 mm i en general, les que donaran femelles són més grans que les que donaran mascles.

Els adults són de tamany mitjà, poden arribar a tenir de 3-4 centímetres, de color gris-castany en el seu conjunt, amb una sèrie de dibuixos poc definits, amb el gris, negre i blanc, com a colors dominants. A la regió central del protòrax té dos agrupacions de pèls i, situats una mica més enrere i lateralment, un parell més petits. Al final de l'abdomen també se'n troba un altre, amb els que la femella protegeix la posta, arrancant-se'ls. Les ales anteriors són de color gris obscur amb dibuixos lineals, venes radials, que clarament formen la figura del dígit quatre. Les ales posteriors són de color blanc amb l'extrem extern més obscur (Aizpurua, 1994).

Cicle biològic: Els primers adults apareixen en primavera, són de costums nocturnes, quedant-se amagats a les fulles durant el dia. Les femelles dipositen prop d'un miler d'ous a l'anvers de les fulles, en formacions allargades de 1 a 1,5 cm, amb 200 a 500 ous cadascuna.

Després de 3 - 5 dies, surten les larves; que s'alimenten de les fulles i triguen uns 20 dies en aconseguir el seu màxim desenvolupament, en aquest moment, la seva voracitat és extrema. Els anys en què la plaga és intensa, acaben devorant les fulles dels més variats cultius, amb una activitat devastadora.

Les larves s'amaguen de la llum excessiva durant les hores de més calor del dia, i es queden a la superfície del terreny, entre la fullaraca o els restes vegetals, embolicant-se en espiral. Per la nit, o durant dies amb núvols, puguen a les plantes per alimentar-se, mostrant la seva insaciable voracitat. Quan arriben a la maduresa s'enfonsen a pocs centímetres de profunditat; amb sorra formen una cèl·lula de forma sub-oval, amb el interior ben polit, on es transformaran en crisàlides. La formació de la ninfa dura uns 15 dies, passats els quals surten els adults, donant pas a una nova generació que repetirà el cicle biològic.

El nombre de generacions anuals sembla ser de 3. Les larves d'aquesta última formen el capoll i hivernen en forma de crisàlide, i d'aquí deriven els primers adults de la primavera (Garcia Tejero, 1993).

INTRODUCCIÓ

Danys a la planta: És una plaga molt polífaga. Aquest lepidòpter constitueix una greu plaga d'una gran varietat de cultius, des dels tropicals com el cafè, cacau, plàtans i especialment cotó, fins els industrials, d'horticultura i ornamentals. Pel que fa als d'horticultura, ataca a tots els cultius.

Aquesta espècie ha anat incrementant els seus danys en hivernacles en els últims anys. Això pot ser degut a l'aparició de resistències en les poblacions de la plaga com a conseqüència de la utilització de plaguicides.

Els danys són causats per larves de qualsevol edat (L1-L5). La femella diposita els ous a l'anvers de les fulles més baixes, a prop del terra. Les larves eclosionen i solen atacar les parts altes i més tendres de la planta (menjant la cara interior de les fulles però respectant l'epidermis), quan passen a L4-L5 les larves viuen aïllades en fulles baixes d'altres plantes pròximes. Les larves també poden atacar els fruits, com la síndria, tomàquets o pebrots, fent forats superficials que els deterioren.

Mesures de control: Moltes poblacions de *Spodoptera littoralis* són molt resistents als pesticides i, si la població està ben establerta, el seu control és extremadament difícil.

La col·locació de trampes de feromones (atraient sexual) pot ajudar a la detecció dels primers adults i com a mètode de control. És important vigilar els primers estats de desenvolupament dels cultius, ja que els atacs en ells són molt greus i poden ser irreversibles en afectar a brots i tiges.

2.2 Patògens de l'arròs

2.2.1 Magnaporthe grisea

Magnaporthe grisea (actualment *Magnaporthe oryzae*; anamorf, *Pyricularia oryzae* [sinònim *P. grisea*]), és el fong causant de la piriculariosi o cremat (*rice blast*), que es considera la malaltia fúngica més important de l'arròs cultivat, degut a la seva àmplia distribució (descrita en més de 85 països) i al seu poder destructiu sota condicions favorables. Es tracta d'un dels agents més devastadors que cada any destrueix aproximadament la quantitat d'arròs necessària per alimentar 60 milions de persones, causant pèrdues en la productivitat mundial que poden arribar al 30% (uns 160 milions de tones) (*M. grisea* Database of Broad Institute, www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe; International Rice Blast Genome Consortium, www.riceblast.org). Les pèrdues que pot ocasionar són en funció de la intensitat de l'atac, però cal tenir en compte que es pot arribar a destruir totalment la collita en casos d'epidèmies molt severes.

La piriculariosi està considerada com una malaltia criptogàmica complexa degut a la variabilitat patogènica i a la rapidesa amb la que aquest fong supera la resistència de la planta d'arròs (Sun i

Snyder, 1981; Ou, 1985). A més, *M. grisea* pot infectar més de 50 tipus diferents de plantes herbàcies, on s'inclouen a més de l'arròs, altres cereals com el blat o l'ordi.

A més de la seva gran importància agronòmica, la infecció de l'arròs per *M. grisea* ha esdevingut el model per a l'estudi de la interacció planta-patogen, ja que es disposa de la seqüència del genoma tant de l'arròs (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) com de *M. grisea* (Dean *et al.*, 2005). El genoma de *M. grisea* consta d'unes 40 Mb, amb uns 11.000 gens repartits en 7 cromosomes.

Morfologia: *M. grisea* és un ascomicet filamentós haploide. Presenta conidiòfors, que donaran lloc a conidis madurs o espores asexuades (aproximadament, 5-10 x 15-20 µM), piriformes, normalment biseptats i amb un petit apèndix en el punt d'ancoratge amb el conidiòfor (Howard i Valent, 1996) **(Figura 6).**

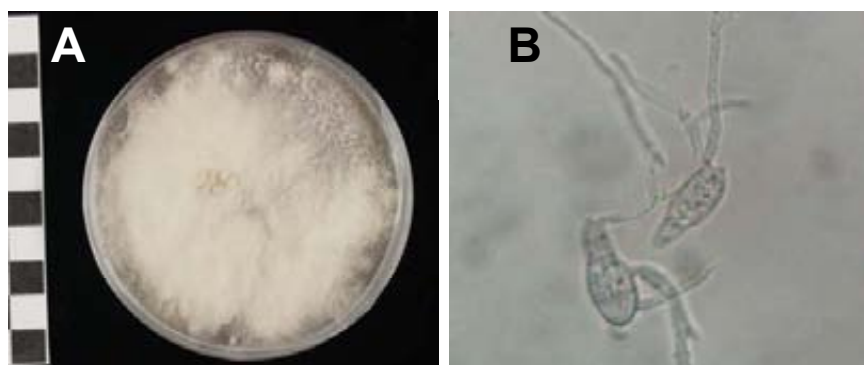


Figura 6. *Magnaporthe grisea*. A) Miceli del fong crescut en PDA (*Potato Dextrose Agar*). B) Espores de *M. grisea*.

Cicle biològic: Les condicions òptimes per iniciar les infeccions, són una humitat relativa superior al 90% durant més de 14 hores, i unes temperatures suaus entre 17 i 23 °C de nit i fins els 28°C de dia. En aquest procés, les espores asexuades formen una estructura altament especialitzada per a la invasió de teixits vegetals. Es tracta d'una estructura inflada i rica en melanina anomenada ***apressorium*** (també present en altres fong i oomicets) **(Figura 7)**. Aquesta estructura, es forma a partir del tub germinatiu que emergeix i s'elonga des de la zona apical o basal (mai central) de l'espore. L'***apressorium***, és una cèl·lula especialitzada per a la infecció, que mitjançant una pressió de turgència molt forta, permet al fong penetrar i travessar la cutícula de la planta. Una vegada dins, les hifes es ramifiquen a través de les cèl·lules epidèrmiques i del mesòfil (Clergeot *et al.*, 2001). Després d'aproximadament set dies, els conidiòfors es diferencien i centenars de nous conidis són produïts per a perpetuar el cicle (Talbot, 1995; Howard i Valent, 1996; Urban *et al.*, 1999).

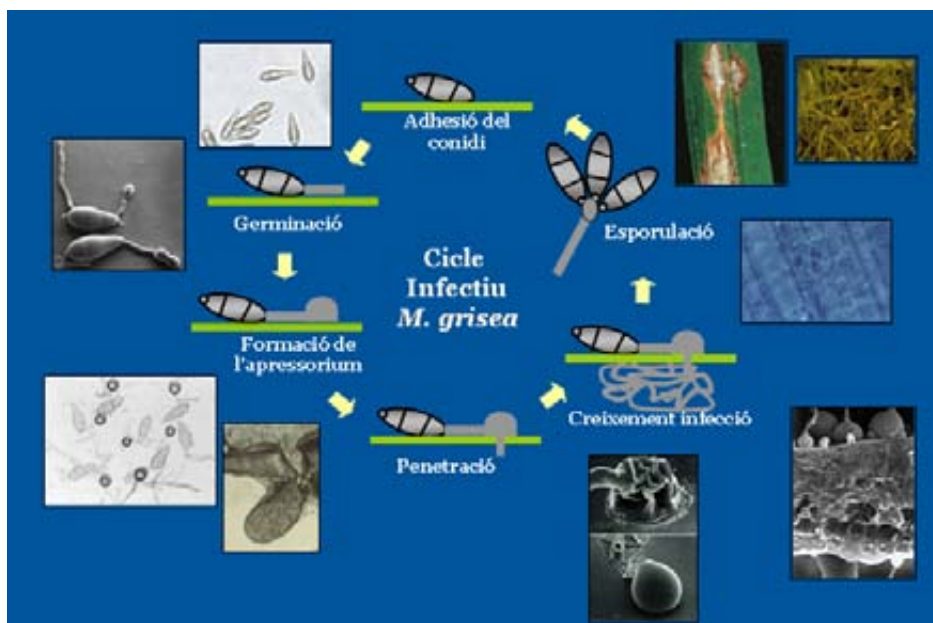


Figura 7. Cicle biològic de *M. grisea*. S'inicia amb la germinació i la formació de l'apressorium, que permet al fong penetrar i travessar la cutícula de la planta. El fong creix i es ramifica en el teixit de la fulla. Després d'uns 7 dies, es dona l'esperulació en la superfície de la fulla, els conidis es diferencien i permeten l'inici d'un nou cicle.

Els cicles d'infecció poden continuar en el conreu mentre es mantinguin les condicions i si hi ha teixit verd. Després de la recol·lecció de l'arròs, el fong roman en el gra i en les restes vegetals, i passa a la seva fase saprofítica durant l'hivern.

Danys a la planta: Els símptomes poden aparèixer en fulles, tiges, coll de la panícula i a la mateixa panícula. El fong produeix taques o lesions de forma allargada a les fulles que es poden observar a partir dels 3 o 5 dies, primerament de color blanquinós i després de color groguenc uniforme. Un cop més



avançada la infecció, les lesions presenten forma romboïdal i els centres més clars, grisosos, i les vores fosques i marrons. Si la infecció avança pot conduir a l'assecament total de les fulles infectades. En la **Figura 8** es mostren les lesions i els símptomes de la infecció en planta d'arròs causats per *M. grisea*.

Figura 8. Símptomes de la infecció per *M. grisea* en fulles d'arròs.

M. grisea també pot produir danys en les tiges i en les diferents parts de la panícula i les llavors. En tiges, la malaltia sol produir símptomes de necrosi que afecten principalment els nusos. En el nus superior o a zones properes, es produeixen decoloracions amb les àrees necròtiques de color marró. Les lesions més importants es produeixen a la base de la panícula, al coll, mitjançant un tipus de necrosi que l'envolta i acaba impedit la circulació de nutrients i la posterior omplerta del gra. En la panícula es poden produir lesions fosques, que poden contribuir al vinclament d'aquesta. Les llavors solen acabar buides i grises, o no reomplint completament (fet que provoca les majors pèrdues), produint el que es coneix com a "moscat", juntament amb altres fongs que provoquen *helminthosporiosi*. El tamany i forma de les lesions depenen de factors com les condicions ambientals, l'edat de la planta, el grau de susceptibilitat de la varietat cultivada, i es coneix que una aportació excessiva de nitrogen (adobs) pot afavorir el desenvolupament de la infecció per *M. grisea* (*RiceBlastDB*, 2001; *APSnet*, 2002; *DARP*, 2006). Recentment també s'ha vist que és també capaç d'infectar arrels (Sesma i Osbourn, 2004).

Mesures de control: En la lluita contra aquesta malaltia existeixen una sèrie de mesures culturals, així com el control químic. En el primer cas, es descriuen una sèrie d'operacions que cal fer en el conreu per tal d'evitar-ne la propagació. Es tracta de la destrucció de les restes vegetals (rostolls), evitar l'ús adobats nitrogenats excessius o retardar la sembra (*DARP*, 2006). Però, tot i aquestes mesures preventives, donada la virulència d'aquest patogen, és habitual requerir també, tractament químic. Es tracta de l'ús de fungicides, habitualment nocius i molt cars, com són el *probenazole* o el *tricyclozole*. Cal dir que, actualment, la lluita contra aquesta malaltia genera el principal mercat de fungicides mundial.

2.2.2 *Fusarium verticillioides*

Una de les primeres malalties descrites científicament a l'arròs, fou l'anomenada "*Bakanae*", reconeguda al Japó el 1828 i, formalment descrita el 1898. Es tracta d'una malaltia àmpliament distribuïda per Àsia, on és responsable de grans pèrdues en el conreu (arribant a superar el 50%). "*Bakanae*" (pronunciat *ba-ka-ni*) és el mot japonès que utilitzaven per descriure una "insensatesa de la planta", en referència al creixement anormal sovint observat en les plantes infectades. De fet, l'estudi d'aquesta patologia i del fong que la produïa va portar al descobriment de l'hormona de creixement gibberel·lina (Webster i Gunnell, 1992).

Morfologia: Malgrat que aquesta malaltia fou descrita per primera vegada al Japó fa més de 100 anys, no està encara del tot clar quines espècies de *Fusarium* estan relacionades amb cadascun dels diferents símptomes associats. Les espores tenen formes el·líptiques, amb 1-3 septes (10-20 x 4-7 µM) (**Figura 9**).

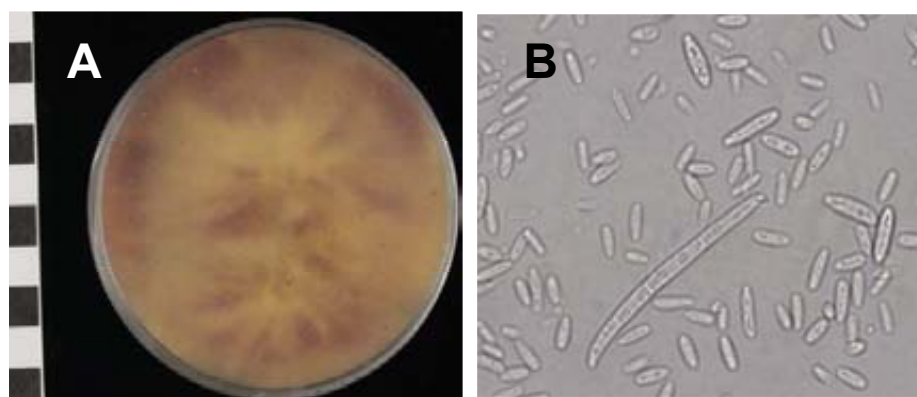


Figura 9. *Fusarium verticillioides*. A) Miceli del fong crescut en PDA (*Potato Dextrose Agar*). B) Espores de *F. verticillioides*.

Els primers estudis al Japó, van identificar el patogen de l'arròs com a *Fusarium moniliforme* de manera àmplia (Ou, 1985). Malgrat això, actualment aquest taxó compren diferents espècies, col·lectivament agrupades sota el nom de *Gibberella fujikuroi* (Telomorf). La formació de l'estadi sexual de *Gibberella* permet distingir entre poblacions d'aparellament (“*mating populations*”) o espècies biològiques (Desjardins *et al.*, 2000). Entre aquestes, són tres les poblacions de *G. fujikuroi* que han estat relacionades amb la “bakanae” de l'arròs. La població d'aparellament C (MP-C) (anamorf, *Fusarium fujikuroi*) fou el primer en ser identificat el 1977 en arrossars de Taiwan (Hsieh *et al.*, 1977). Més recentment, les poblacions A (MP-A) (anamorf, *Fusarium verticillioides* [sinònim, *F. moniliforme*]) i D (MP-D) (anamorf, *Fusarium proliferatum*), han estat aïllades a partir de cultius d'arròs d'Àsia, i en el cas del grup MP-D, també d'Àfrica i Amèrica (Desjardins *et al.*, 2000).

Danys a la planta: Els símptomes clàssics associats a aquesta malaltia són una elongació anormal, fulles i tija més pàl·lides o groguenques, i floració reduïda i avançada en el temps. En plàntula, la lesió es sol donar en l'arrel, podent arribar a col·lapsar i matar-la, de la mateixa manera que si es dona en estadis primerencs de desenvolupament (llavor en germinació), aquest fet és encara més acusat. En estadis més avançats es poden arribar a secar les fulles i produir esterilitat. Durant la maduració, el gra pot omplir-se parcialment o presentar-se buit, les panícules mostrar tons rosats, i les glevs o envoltcs dels grans presentar discos vermellosos producte de l' esporulació dels fongs (<http://www.knowledgebank.irri.org>; Webster i Gunnell, 1992).

Sovint, el creixement dels conidiòfors es pot observar com un creixement amb aspecte polsegós de color blanc, tant a la llavor com a les parts més basals de la planta. En estadi de plàntula no sempre es mostren els símptomes, els quals són més visibles a mesura que avança el seu desenvolupament. En la llavor infectada amb inòculs molt baixos, es pot observar, sota lupa binocular, el fort creixement del

miceli blanquinós sovint cobrint tota la llavor. Més endavant apareix l'aspecte de polsim blanquinós característic de la formació dels microconidis.

El tipus de símptomes observats depèn de la soca i la quantitat d'inòcul inicial. Les gibberel·lines produïdes pel fong són la causa de la elongació, mentre que l'àcid fusàric provoca el debilitament i la clorosi de la planta.

En el cas de ***F. verticillioides*** el símptoma més evident és la podridura de la l'arrel i la part baixa de la tija en la plàntula, i en plantes més desenvolupades els símptomes típics de la malaltia "bakanae".

Cicle biològic: *Bakanae* és principalment una malaltia de la llavor en germinació. La infecció de la llavor es dona per via aèria mitjançant les ascospores, abans de la collita. La sembra de les llavors en terres infectades també dona lloc a la germinació de plantes infectades. Temperatures del terra d'uns 35°C i ambientals entre els 30-35°C, i l'aplicació d'adobs nitrogenats n'afavoreixen la propagació. Els conidis són fàcilment dispersats d'una planta a l'altra per mitjà de l'aigua i el vent.

El fong pot sobreviure mitjançant llavors infectades en condicions adverses. Generalment, aquest inòcul que es manté en llavor, proporciona un focus secundari d'infecció. Sota les condicions favorables, *F. verticillioides*, té la capacitat de produir un gran nombre de conidis que, posteriorment, infectaran plantes sanes properes, sent aquesta la causa principal de les grans pèrdues en els conreus. El principal problema d'aquesta malaltia rau en el fet que, a baixes quantitats d'inòcul, és molt difícil diferenciar les plàntules infectades de les sanes, degut a que no es donen símptomes clars. Quan aquests són més visibles i en estat de plàntula, els símptomes apareixen inicialment com a pèrdua de pes i gruix, i amb una coloració més pàl·lida de les tiges.

Mesures de control: La infecció de les llavors de cereals, per part d'espècies de *Fusarium*, pot causar contaminació amb micotoxines que afecten la salut humana i animal. De fet, la contaminació de grans d'arròs amb fumonisines, ha estat associada amb alguns tipus de càncer a Sud Àfrica (Nelson *et al.*, 1993). Sovint, el principal mètode pel control d'aquesta malaltia és el tractament de les llavors amb fungicides. Malgrat això, ja s'ha descrit la seva resistència en alguns casos.

2.2.3 *Erwinia chrysanthemi*

Morfologia: *Erwinia chrysanthemi* és un bacteri fitopatògen gram-negatiu d'ampli espectre d'hostes, i que és capaç de segregar un arsenal d'enzims que degraden la paret cel·lular (Barras *et al.*, 1994). Les cèl·lules del bacteri són mòbils amb 4-6 flagells.

Danys a la planta: Els primers estadis de la malaltia es caracteritzen per una decoloració marró fosca de les fulles de la beina, i un color groguenc de les fulles que surten d'aquestes beines. L'organisme que

INTRODUCCIÓ

causa la malaltia ataca primerament la base de la tija i envaeix la base de la planta sistèmicament, resultant en la malaltia de la **podridura de la base** (“*foot rot*”). Seguidament, els teixits dels nòduls superiors i les fulles joves doblgades, es podreixen lentament i es col·lapsen. Les infeccions del rizoma són menys extenses, causant una decoloració marró restringida a la capa superficial. La temperatura òptima i de màxim creixement del bacteri són 36°C i 43°C, respectivament.

A l'arròs, els nòduls, tiges i base de la planta, són infectats a través de les fulles de la beina malaltes, i esdevenen d'un color marró obscur. A mida que la malaltia avança, el nombre de brots morts augmenta.

Experimentalment, quan les plantes són tractades amb suspensions del bacteri, les lesions marrons comencen a desenvolupar-se en el lloc de la lígula passats 2-3 dies de la inoculació. La gravetat de la malaltia varia depenent del cultiu i de les condicions de la inoculació. Es tracta també, d'un patogen de blat de moro, ordi, patata, ceba i tomàquet (Goto, 1979).

Els símptomes de les fulles de la beina d'arròs són similars als provocats per *Pseudomonas oryzaicola*, *P. fuscovaginae* i *P. panici*. Per contra, *E. chrysanthemi* infecta la base de la planta d'arròs de forma sistèmica, resultant en un dany sever en el peu de la planta. El síndrome de la podridura de la base de la planta, causada per *E. chrysanthemi* té símptomes similars al cremat de les fulles (“*leaf blight*”) causat per *Xanthomonas oryzae* (Goto, 1979).

2.2.4 RYMV (*Rice yellow mottle virus*)

El virus del motejat groc de l'arròs o RYMV (*Rice yellow mottle virus*) és membre del gènere *Sobemovirus*, trasmès per insectes, i presenta totes les característiques biofísiques així com les propietats biològiques pròpies dels membres d'aquest gènere. Els principals insectes que actuen com a vectors són els crisomèlids, que compleixen un paper essencial en la infecció primària, mentre que la infecció secundària es dona principalment pel contacte planta-planta.

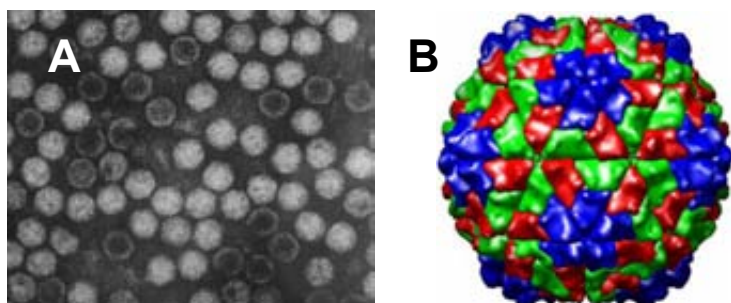


Figura 10: *Rice yellow mottle virus*. Partícula vírica: A) Microscopia electrònica; B) Estructura icosaèdrica de la partícula virica. (Imatge obtinguda de <http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/viruses.html>).

L'impacte econòmic del RYMV és difícil d'avaluar donat la influència dels factors ambientals, la vegetació de la zona i les varietats d'arròs. A l'Àfrica, el volum de pèrdues fluctua entre el 20 i el 100%,

depenent de l'edat de la planta abans de la infecció, la susceptibilitat de la varietat d'arròs i els factors ambientals (Kouassi *et al.*, 2005).

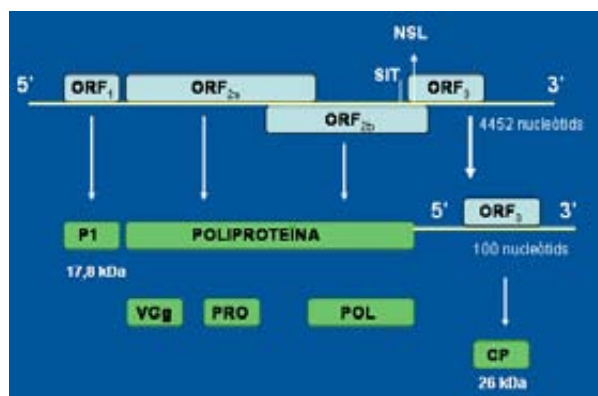
Són diferents els hostes en els que s'ha trobat el RYMV, especialment del gènere *Oryza*, com *O. longistaminata* Chev. & Roech.; *O. barthii* Chev. i *O. galverrima* Steud. Aquestes espècies són susceptibles al virus, a més es creu que aquestes espècies podrien haver actuat fa alguns segles com a reservori per la dispersió del virus des d'Àsia cap a l'arròs africà (*O. sativa*).

La majoria dels seus vectors pertanyen a l'ordre dels coleòpters, especialment a la família Chrysomelidae, com *Sesselia pusilla* (Galerucinae), *Chaetocnema pulla* (Chapuis) (Halticinae), *Trichispa sericea* (Guerin) (Hispiinae) i *Di cladispa* (Chrysispa) *viridicyanea* (Kraatz) (Hispiinae) (Abo *et al.*, 2000, 1998; Bakker, 1971, 1974). La llagosta (*Conocephalus merumontanus*) (Sjost) també està considerada com a possible vector (Abo *et al.*, 2000). El virus pot ser transmès també pels utensilis dels grangers, com les falçs (Abo *et al.*, 1998) o les mateixes mans contaminades (Abo *et al.*, 2000), i mitjançant un estret contacte entre plantes durant la seva recollida. El RYMV pot ser transmès per vaques o altres animals mitjançant el contacte mecànic (Sarra *et al.*, 2004), pel contacte de les fulles provocat pel vent (Sarra *et al.*, 2004) o mitjançant l'aigua d'irrigació (Abo *et al.*, 2000).

El virus ha estat trobat també en arrels de plantes infectades (Kouassi *et al.*, 2005). En llavors ha estat detectat a totes les seves parts (glumel·la, endosperm i embrió) però el RYMV esdevé inefectiu a mesura que avança la formació de la llavor. Així, no s'ha demostrat que el virus pugui transmetre's per llavor (Kouassi *et al.*, 2005).

Organització genòmica: El genoma del RYMV és un RNA(+) de cadena simple (ssRNA+) i lineal, no poliadenilat, amb una massa molecular de 1.4×10^6 Da. La seqüència té 4450 nucleòtids i els dominis codificants (ORF1, ORF2a, ORF2b i ORF3), s'organitzen segons es mostra a la **Figura 11**.

Figura 11. Organització genòmica de RYMV. La ORF1 (nucleòtids [nt] 81 a 554) codifica una proteïna de 157 aa (17.8 kDa) nomenada P1 o proteïna de moviment del virus. La ORF2a (nt 609 a 2426) i ORF2b (nt 2093 a 3607), codifiquen les dos una poliproteïna de 110,7 kDa que conté una hipotètica VPg, una Serina proteasa (PRO), i una RNA-polimerasa dependent de RNA (POL). La part N-terminal de la poliproteïna està codificada per ORF2a i part de la C-terminal per ORF2b. Es suposa que la ORF2b es tradueix com a part de la poliproteïna mitjançant un mecanisme de canvi de pauta de lectura ribosomal també descrit pel virus CfMV (Mäkinen *et al.*, 1995). La ORF3 (nt 3447 a 4166) solapa 160 nucleòtids amb la ORF2b, i codifica una proteïna de coberta (CP) de 239 aa (26 kDa), que té a la part N-terminal una hipotètica senyal de localització nuclear (NLS).



INTRODUCCIÓ

La proteïna P1 (proteïna de moviment codificada per ORF1) es requereix per infectar la planta i per l'expansió del virus (Bonneau *et al.*, 1998). Aquesta proteïna és també responsable del silenciament gènic induït per virus (VIGS, *virus-induced gene silencing*) (Voinnet *et al.*, 1999). El gen *CP* (proteïna de coberta codificada per ORF3) es necessari per la completa infectivitat del virus, ja que participa en la interacció cèl·lula a cèl·lula, en el moviment a llargues distàncies del virus i en la infecció sistèmica de *O. sativa*. A més, la encapsidació del virus és un pas previ necessari pel moviment a llarga distància (Brugidou *et al.*, 1995; Kouassi i Brugidou, comunicació personal).

Les partícules víriques s'han observat en fulles infectades sistèmicament, el virus es dispersa a partir de les cèl·lules dels sistema vascular de les fulles cap a l'epidermis. De totes maneres, aquestes partícules són més abundants en els teixits vasculars, en el floema parenquimàtic, les cèl·lules del xilema i les cèl·lules acompanyants. S'han observat també partícules individuals, formant agregats o en forma de cristalls, en el citoplasma i en vacuoles de les cèl·lules infectades.

Danys a la planta: L'aparença i intensitat dels símptomes poden variar en els diferents genotips d'arròs, però les descrites a continuació són les observades generalment. Aproximadament 1-2 setmanes després de la inoculació, apareixen petits punts rectangulars groguencs en la base de les fulles joves, infectades sistèmicament. Amb el temps, aquests punts s'allarguen en paral·lel a la beina, mentre lleus taques negres es van desenvolupant en el centre aquestes línies. Es dona decoloració groga – taronja de les fulles velles. Les fulles que es formen després estan jaspiades i normalment recargolades (Bakker, 1974). En algunes varietats, les fulles es tornen més estretes i el camp d'arròs infectat esdevé una ombra general de color groc-taronja.

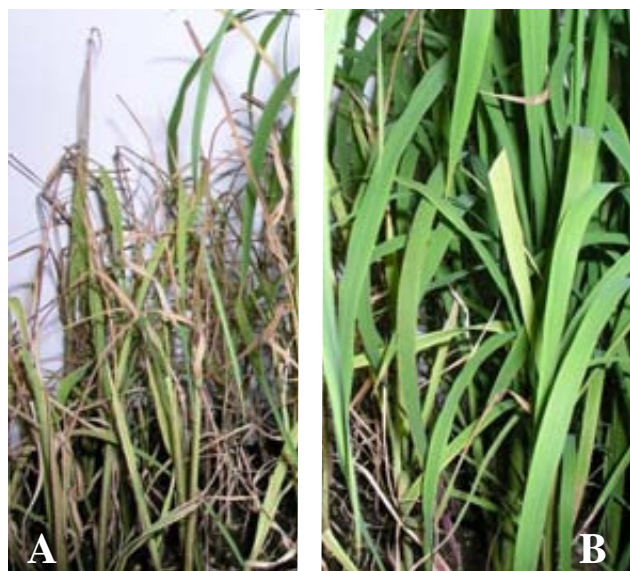


Figura 12. Símptomes de la infecció per RYMV. (Fotografies realitzades a l'IRD, Montpeller. A) IR64, varietat susceptible; B) Gigante, varietat resistent.

La malaltia provoca un creixement reduït i una baixa producció en la planta d'arròs, que està associat amb el recargolament, jaspiat, malformació de les fulles i la incompleta formació de panícules, que té com a resultat l'esterilitat de les plantes, i per tant una disminució significativa en la producció dels camps (Awoderu, 1991; Bakker, 1974). La gravetat de la infecció, i en conseqüència les pèrdues en la producció, depèn de l'edat de les plantes infectades. Si les plantes s'infecten dintre dels 20 dies després de ser plantades, presentaran la majoria dels símptomes descrits anteriorment, deixaran de créixer i eventualment, moriran. Si la infecció es dona entre els dies 20-50 post-plantació, la planta continuarà creixent però s'atrofiarà. Aquestes plantes poden presentar taques allargades grogues a les noves fulles i produiran flors i llavors amb pèrdues variables. Si la infecció es dona 50 dies (o més) després de ser plantades, les plantes creixeran normalment, amb lleus taques grogues, i les flors i les llavors seran normals.

Resistència: Durant anys s'han realitzat cerques de possibles resistències al RYMV en varietats d'arròs de diferents orígens geogràfics, i en les dos espècies cultivades d'arròs, *O.sativa* i *O.glaberrima* (Kouassi *et al.*, 2005). S'han diferenciat tres tipus de respostes al RYMV: (1) Elevada susceptibilitat, en varietats com la **IR64**, BG90-2 i Bouaké189, varietats generalment de la subspècie *indica* de *O. sativa*, adaptades a cultius irrigats, on la malaltia és prevalent. (2) Resistència parcial, en varietats com **Azucena**, Moroberekan, LAC-23, IRAT13 i OS-6. Aquestes, depenent de la severitat, no expressen símptomes o ho fan de manera lleu, però el virus es detectable serològicament. Aquestes varietats parcialment resistents són de la subspècie *japonica* de *O. sativa* i estan adaptades a cultiu de zones templades. Són de gran interès pels agricultors, ja que també presenten una resistència estable a la piriculariosis. (3) Elevada resistència a RYMV, com la varietat **Gigante** de *O. sativa* i el genotip Tog5681 de *O. glaberrima*.

Base genètica de la resistència: En el IRD (Montpeller, França) es porten a terme estudis mitjançant marcadors moleculars i mapatge de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), per tal d'identificar gens de resistència, parcial o total, a RYMV. La resistència parcial a RYMV s'ha vist que està sota un determinisme poligenètic, i s'ha detectat que 7 fragments de cromosomes estan involucrats en la resistència (Albar *et al.*, 1998; Ghesquière *et al.*, 1997). De la mateixa manera, la base genètica de l'elevada resistència de les varietats Gigante i (*O. sativa*) i Tog5681 (*O. galberrima*) ha estat identificada com a monogènica recessiva, estant el mateix locus implicat en les dues varietats (Ndjiondjop *et al.*, 1999; Albar *et al.*, 2006).

3 MECANISMES DE DEFENSA DE LES PLANTES

3.1 *Interacció planta-patogen*

Les plantes estan subjectes a l'atac d'un gran ventall de patògens microbians. Per respondre-hi, presenten nombrosos mecanismes de defensa, molts d'ells induïts pel propi atac dels patògens. Aquests inclouen, entre d'altres, la producció de metabòlits i proteïnes antimicrobianes, així com el reforçament de les parets cel·lulars mitjançant la producció de lignina i callosa.

Els mecanismes moleculars associats a la resposta de defensa en les plantes, són excessivament complexos. En alguns casos, la resposta s'inicia amb el reconeixement entre els productes d'un gen de resistència (**gens R**) de la planta hoste, amb el corresponent producte gènic d'un gen d'avirulència (**gen avr**) en el patògen, segons el model **gen-a-gen** descrit per Flor (1971). Aquest reconeixement provoca una ràpida activació de les respostes de defensa i en conseqüència, un creixement limitat del patogen. Els patògens que són reconeguts d'aquesta manera i que per tant no poden causar malaltia, són coneguts com a **patògens avirulents**, l'hoste s'anomena **resistent** i la interacció es coneix com **incompatible**. Moltes interaccions incompatibles, es manifesten per mitjà de la **resposta hipersensible (HR, hypersensitive response)**. La HR, és una forma de la mort cel·lular programada que es dona en les cèl·lules al voltant del lloc d'infecció pel patogen, limitant d'aquesta manera l'accés a aigua i nutrients per part d'aquest.

En absència bé del gen *R* en la planta, o bé d'un gen *avr* en el patògen, la interacció és de tipus **compatible**, el patogen és **virulent** i l'hoste serà **susceptible**.

A la natura, les interaccions planta-patògen basades en la presència de gens *R/avr* són molt limitades. Els patògens són habitualment molt especialitzats pel que fa la planta hoste, i la interacció a nivell molecular és sovint complexa donada la coevolució de l'hoste i del patogen. La selecció natural ha tingut una decisiva influència tant en la producció dels productes d'avirulència del patogen o molècules "efectores", així com en les proteïnes *R*, de gran importància per la defensa de la planta. Actualment, es coneix que la major part dels gens *R* codifiquen proteïnes que tenen hipotètics dominis N-terminal de senyalització, llocs d'unió a nucleòtids (**NBS, Nucleotide Binding Site**) i una sèrie de repeticions riques en leucines (**LRRs, Leucine Rich Repeats**) en l'extrem C-terminal. Aquestes proteïnes **NBS-LRRs** han estat dividides en dos grups principals: (1) Aquelles que presenten un domini N-terminal amb semblança a les proteïnes Toll i receptors d'interleuquines (**TIR, Toll/interleukin Receptor**), conegudes com **TIR-NBS-LRR** o proteïnes **TNL**; (2) Aquelles que presenten un motiu N-terminal **CC (coiled-coiled)**. Han estat identificades altres classes de gens *R*, a part dels que codifiquen **NBS-LRRs**.

En arròs, els gens *Xa21* i *Xa26* codifiquen uns altres tipus de proteïnes *R*, uns receptors del tipus quinasa (**RLK**, **Receptor Like Kinase**) que contenen tant dominis LRR com dominis quinasa, implicats en resistència (Song *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2004). Una altre classe de gens *R* són els que codifiquen **LRRs** extracel·lulars amb dominis transmembrana (Dixon *et al.*, 1996) o els receptors *RPP27* i *HcrVf2*, trobats en Arabidopsis i poma, respectivament, que codifiquen proteïnes del tipus receptor (**RLPs**, **Receptor-Like Proteins**) (Tor *et al.*, 2004; Belfanti *et al.*, 2004). Tant els RLKs com els RLPs estan molt representats en el genoma de les plantes, tot i que fins ara només havien estat caracteritzats principalment com a proteïnes implicades en desenvolupament.

Per altra banda, la resistència basada en la inducció dels mecanismes de defensa general confereixen un nivell de protecció no específica, front a un ampli espectre de patògens. Aquesta resistència a patògens és coneix com a **resistència basal** o **resistència general induïda** (“*Non-host resistance*”). En la natura, la major part de les interaccions planta-microorganisme que es produeixen no són específiques com succeeix en el cas dels gens *R*.

Molts dels canvis ràpids en l'expressió de gens que es donen durant la resposta *gen-a-gen*, també es donen durant interaccions compatibles, però amb cinètiques més lentes i amplitud reduïda (Lamb *et al.*, 1992; Tao *et al.*, 2003).

A part de reaccionar localment, les plantes poden organitzar una resposta sistèmica que estableix una capacitat defensiva augmentada en teixits distals del lloc d'atac. Aquesta resposta induïda sistèmica, protegeix a la planta front pròxims invasors. S'han caracteritzat en detall varies respostes sistemàtiques de defensa induïdes biològicament. Entre elles s'inclou la **Resposta Sistèmica Adquirida (SAR)**, desencadenada per patògens (Sticher *et al.*, 1997), la **Resistència Sistèmica Induïda (ISR)**, que es activada per la colonització de les arrels per algunes soques de rizobacteris no patògens (Pieterse *et al.*, 2002), i la **Defensa Induïda per Ferida**, que és típicament generada pel teixit danyat, com el causat per l'herviboria dels insectes (Kessler i Baldwin, 2002). Les respostes de defensa induïdes són regulades per una xarxa de vies de senyalització inter-comunicades, on les hormones **àcid salicílic (SA)**, **àcid jasmònic (JA)** i **etilé (ET)** juguen un paper principal (Pieterse i van Loon, 1999; Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2001, 2005), i on també estan implicades altres hormones com els brasinosteroids i l'**àcid abscísic (ABA)** (Audenaert *et al.*, 2002; Nakashita *et al.*, 2003; Ton i Mauch-Mani, 2004).

A continuació s'expliquen els processos generals de senyalització implicats en la resposta de defensa de les plantes a patògens.

3.2 La resposta local

3.2.1 Espècies reactives d'oxigen (ROS) - cadena de transmissió intracel·lular

Per a que es produeixi una resposta de defensa efectiva per part de la planta, aquesta ha de detectar el patògen de manera ràpida i desencadenar una resposta adequada en el menor temps possible. En la resistència general induïda, el reconeixement del patògen per part de la planta, es realitza a través de molècules conegudes com **elicitors** generals, o PAMPS (patrons moleculars associats a patògens). El reconeixement de PAMPS del patògen, és la base de la resposta “immune innata” en plantes i animals (Chisholm *et al.*, 2006). Els PAMPs són reconeguts per receptors de membrana plasmàtica, fet que desencadena l'inici de les vies de transducció de senyal implicades en la resposta de defensa.

Una de les respostes més ràpides que es produeix en la planta és la producció ràpida d'espècies reactives d'oxigen (**ROS, reactive oxygen species**) coneguda com a “explosió oxidativa”. ROS inclou superòxid anió (O_2^-), H_2O_2 i el radical hidroxil ($OH\cdot$). El H_2O_2 , a més de tenir un efecte antimicrobià directe, serveix com a senyal activadora d'altres respostes de defensa. Juntament amb les ROS, l'**òxid nítric (NO)** és també requerit per la mort cel·lular programada (PCD) induïda per patògen en la resposta hipersensible (Delledonre *et al.*, 1998). El NO també induïx l'expressió de gens relacionats amb defensa (Durner *et al.*, 1998); tot i que és produït constitutivament com a un producte del metabolisme cel·lular (del Rio *et al.*, 2004), també es induït en resposta a infecció per patògens (Delledonre *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998).

3.2.2 Proteïnes relacionades amb patogènia (PR, *Pathogenesis-Related Proteins*)

Originalment, les **proteïnes relacionades amb patogènia (PRs, pathogenesis-related proteins)** es classificaven en base a les seves característiques com a proteïnes vegetals induïdes en patogènesi o situacions relacionades. Després, el terme “proteïnes relacionades amb patogènia”, va esdevenir un terme col·lectiu per totes les proteïnes induïdes per microbis. Enzims com la fenilalanina amoniac-liasa (PAL, *phenylalanine ammonia-lyase*) i les peroxidases, que estan presents de forma constitutiva i que a més s'incrementen durant moltes infeccions, són sovint referides com a proteïnes tipus PR (van Loon *et al.*, 1994). Així, hi ha nombroses activitats enzimàtiques que s'incrementen en resposta a l'atac de patògens i que poden tenir un paper en la defensa (Hammond-Kosack i Jones, 1996). Per això, el terme general **proteïnes induïbles relacionades amb defensa (inducible defense-related proteins)** s'utilitza per indicar aquelles proteïnes que tenen una inducció demostrada després de la infecció amb un o més patògens. Aquest terme inclou tant les conegudes famílies PR com les proteïnes no

classificades coneixent el criteri anterior. El terme “relacionades amb defensa” es refereix al fet que aquestes proteïnes s’indueixen en associació a respostes de resistència (Van Loon *et al.*, 2006b).

3.2.2.1 Famílies de proteïnes PRs

Les proteïnes induïbles relacionades amb defensa es van descobrir en tabac hipersensible al virus del mosaic (TMV), i més tard es va veure que es donava en altres espècies vegetals després de la infecció amb oomicets, fongs, bacteris, virus i viroids, així com per nemàtodes i atac per insectes (van Loon, 1999). Les proteïnes PR han sigut àmpliament revisades (Kombrink i Somssich, 1997; Yun *et al.*, 1997; Data *et al.*, 1999; Kitajima i Sato, 1999; Broekaert *et al.*, 2000), i inclouen actualment 17 famílies (**Taula I**). Les diferents famílies estan numerades en el mateix ordre del seu descobriment, i es defineixen en base a les seves propietats bioquímiques i biològiques comunes, així com les relacions serològiques. Per moltes d’aquestes famílies ha estat descrita activitat antimicrobiana. Les **PR-1** són utilitzades normalment com a marcadors d’un estat defensiu incrementat conferit per la SAR induïda per patògens, però la seva activitat biològica resta desconeguda (van Loon i van Strien, 1999). La família **PR-2** (β -1,3-endoglucanases) i les famílies **PR-3**, **PR-4**, **PR-8** i **PR-11** (endoquitinases) actuen contra fongs. Les quitinases catalitzen la hidròlisi de la quitina, un homopolímer lineal de residus β -1,4-N-acetilglucosamines (Collinge *et al.*, 1993). El principal paper de les quitinases en defensa, es va proposar principalment degut a la seva habilitat per hidrolitzar la quitina de la paret dels fongs, inhibint el seu creixement (Jwa *et al.*, 2006; Van Loon, 2006). Les quitinases, així com els inhibidors de proteases (**PR-6**), poden actuar contra nemàtodes i insectes herbívors. Membres de la família **PR-8** tenen també activitat lisozima i poden actuar directament contra bacteris. La família **PR-5** comprèn proteïnes similars a proteïnes taumatina (Koiwa *et al.*, 1994), osmotina (Singh *et al.*, 1987; 1989) i permatina (Vigers *et al.*, 1991). Les **PR-7** són endoproteïnases, i són les PR més estudiades en tomàquet (Jordà i Vera, 2000). Poden ajudar a la dissolució de la paret cel·lular microbiana. Les **PR-9** són un tipus específic de peroxidases que poden actuar en el reforçament de la paret cel·lular catalitzant la lignificació (Passardi *et al.*, 2004) augmentant així la resistència front múltiples patògens. Les **PR-10** mostren homologia amb ribonucleases, i alguns membres mostren una lleu activitat ribonucleàica (Bufe *et al.*, 1996). No hi ha famílies PR que actuïn específicament front virus, i de vegades, s’ha assumit que l’activitat ribonucleasa de les proteïnes tipus PR-10 els hi dóna un paper en la defensa front aquest tipus de patògens (Park *et al.*, 2004). A més, recentment s’ha vist que una proteïna antifúngica tipus PR-4 de blat presenta també activitat ribonucleasa (Caporale *et al.*, 2004). Les defensines (**PR-12**) (Thomma *et al.*, 2002; Lay i Anderson, 2005) i tionines (**PR-13**) (Bohlmann, 1994; Epple *et al.*, 1997) tenen ambdues una àmplia activitat antifúngica i antibacteriana. Algunes proteïnes transportadores de lípids (PR-14) tenen activitat antifúngica i antibacteriana (García-Olmedo *et al.*, 1995). Els membres de les famílies PR-1 i PR-5, han estat associats amb activitat front oomicets. Les famílies **PR-15**, **PR-16** i **PR-17**, es van afegir a la llista en el 2001, durant el 6th *International*

INTRODUCCIÓ

Workshop on PR proteins (Spa, Bèlgica). Les PR-15 i PR-16 són típiques de monocotiledònies i comprenen famílies de proteïnes tipus oxalat oxidases (Bernier i Berna, 2001). Les proteïnes PR-17 s'han trobat en tabac, blat i ordi infectats, i contenen seqüències similars al centre actiu de metal·loproteases de Zinc (Christensen *et al.*, 2002). Una hipotètica nova família (**PR-18**) comprèn carbohidrat oxidases induïbles per fongs i SA (Custers *et al.*, 2004). Altres proteïnes no classificades que s'assemblen a les PR per la seva inducció en resposta a patògens, són una amilasa en tabac (Heitz *et al.*, 1991), la proteïna DRR206 de pèssol (Culley *et al.*, 1995), glicoproteïnes riques en hidroxiprolina de paret cel·lular (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1999), proteïnes riques en glicina (Sachetto-Martins *et al.*, 2000), proteïnes que inhibeixen poligalacturonases (De Lorenzo *et al.*, 2001), lipoxigenases (Feussner i Wasternack, 2002) i productes gènics similars a lipases (Jakab *et al.*, 2003). Grups importants de proteïnes antimicrobianes que estan presents en varis òrgans vegetals però, que no s'han descrit com a induïdes per l'atac de patògens, i que per tant no són considerades PRs, són les proteïnes RIPS (*ribosome-inactivating proteins*), les lectines i varis tipus de pèptids rics en cisteïna.

Taula I. Famílies de proteïnes de defensa PR de plantes. S'indiquen els membres tipus i les característiques de cada família (van Loon, 2006).

Família	Membre/Tipus	Característica
PR-1	PR-1 de tabac	* desconeguda
PR-2	PR-2 de tabac	β -1,3-glucanasa
PR-3	P,Q de tabac	quitinasa de classe I,II,IV,V,VI,VII
PR-4	'R' de tabac	quitinasa de classe I,II
PR-5	S de tabac	<i>thaumatin-like</i>
PR-6	Inhibidor I de tomàquet	inhibidor de proteases
PR-7	P ₆₉ de tomàquet	endoproteïnasa
PR-8	Quitinasa de cogombre	quitinasa de classe III
PR-9	'Peroxidasa productora de lignina' de tabac	peroxidasa
PR-10	'PR-1' de julivert	<i>ribonuclease-like</i>
PR-11	Quitinasa de classe V de tabac	quitinasa de classe I
PR-12	Rs-AFP3 de rave	Defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina
PR-14	LTP4 d'ordi	<i>LTP</i> proteïna de transgerència de lípids
PR-15	OxOa (germin) d'ordi	oxalat oxidasa
PR-16	OxOLP d'ordi	<i>oxalate oxidase-like</i>
PR-17	PRp27 de tabac	* desconeguda

A les fulles, les PRs s'acumulen tant en cèlules epidèrmiques com en mesòfiles, així com en l'eix vascular. Moltes proteïnes relacionades amb defensa són sintetitzades amb un pèptid senyal a l'extrem N-terminal, què determina la seva translocació al reticle endoplasmàtic, seguit de la secreció a l'apoplast. Altres proteïnes tenen extensions addicionals per la deposició específica en la vacuola. Les proteïnes del tipus PR-10 són les úniques que semblen ser citoplasmàtiques.

Les proteïnes tipus PR poden tenir un paper en el desenvolupament, ja que es pensa que les seves activitats enzimàtiques poden generar molècules senyalitzadores que actuen com a elicitors endògens en la morfogènesi. Així, varies PR, com les proteïnes tipus PR-1, PR-2, PR-3 i PR-4 i els inhibidors de proteases (PR-6), s'ha vist que s'indueixen a les zones d'abscisió (Roberts *et al.*, 2000) i poden estar involucrades en la pèrdua de la paret cel·lular o en la defensa en el teixit amenaçat amb la invasió de fongs i bacteris patògens.

En flors, també ha estat descrita l'expressió de certs gens *PR* (Lotan *et al.*, 1989; Neale *et al.*, 1990), així com també en fulles en senescència (Uera *et al.*, 1988)

Molts gens *PR* induïts per patògens en fulles, s'expressen constitutivament en teixits de reserva, com els fruits, llavors i tubercles (Broekaert *et al.*, 1997; Shewry i Lucas, 1997). Aquest és el cas dels inhibidors de proteases i amilases, varis tipus de lectines, defensines, tionines i algunes proteïnes transportadores de lípids (LTPs) (Broekaert *et al.*, 2000). A més de conferir resistència front depredació i malalties (Lozovaya *et al.*, 1998), aquestes proteïnes confereixen una reserva de nitrogen (Peumans *et al.*, 2002) podent contribuir a la supervivència dels òrgans durant condicions ambientals desfavorables.

3.2.2.2 Famílies de proteïnes PRs a l'arròs

Estudis sobre la resposta de defensa/estrès en arròs, han portat a la identificació d'una gran varietat de gens de defensa, proteïnes i metabòlits secundaris antifúngics, induïts en resposta a diversos estressos ambientals, inclòs l'atac per patògens (Jwa *et al.*, 2006). Alguns exemples es descriuen a continuació.

OsPR1: La majoria de gens *PR-1* d'arròs, i aproximadament la meitat dels d'*Arabidopsis*, estan presents en “clusters” de 2 a 4 gens, probablement degut a processos de duplicacions (p.ex. en el cromosoma 7 d'arròs en trobem un que conté 14 gens *PR-1*). Els dos gens *PR-1* més similars entre *Arabidopsis* i arròs, són *At4g25780* i *Os02g54560*, probablement ortòlegs (van Loon *et al.*, 2006). En arròs, la inducció de l'expressió del gen *OsPR1b* que codifica una PR1 bàsica, fou observat per primer cop en fulles infectades amb *Magnaporthe grisea* i en resposta a JA (Reymond i Farmer, 1998; Schweizer *et al.*, 1997). El primer exemple d'una PR1 àcida (OsPR1a) és va trobar en forma d'una proteïna de 17 kDa induïble en fulles de la beina de plàntules d'arròs de 2 setmanes (cv. Nipponbare) tractades amb JA (Rakwal i Komatsu, 2000) o amb coure (Rakwal *et al.*, 2001). Així mateix, apareixen dos proteïnes addicionals, de 19 i 22 kDa, en resposta a la inoculació amb *M.grisea* (Agrawal *et al.*, 2001), suggerint que en arròs hi ha múltiples isoformes de la proteïna tar OsPR1a. Els gens *OsPR1a* i *OsPR1b*, semblen estar regulats diferencialment per diverses senyals com la ferida, les molècules JA, SA, ABA, ET, H₂O₂ i la infecció per *M.grisea* (Agrawal *et al.*, 2001). Aquests estudis suggereixen que la regulació d'aquests gens impliquen un cert nivell de complexitat. Aquestes troballes estan també en

INTRODUCCIÓ

línia amb la idea de que hi ha una xarxa substancial d'interaccions que regulen i coordinen les vies de senyalització durant la resposta de la planta a l'estrès (Feys i Parker, 2000; Schenk *et al.*, 2000).

OsPR2 (endo- β -glucanases): El gen β -1-3-glucanasa *Gns1* d'arròs (Genbank N° acces: X58877) va ser el primer clonat i caracteritzat (Simmons *et al.*, 1992). Es va veure que la seva expressió estava induïda a un nivell molt alt en tiges ferides, o bé tractades amb ET, SA o elicitors fúngics de *Sclerotium oryzae*. A més, la sobreexpressió de *OsGns1* genera resistència front *M.grisea*, acompanyada amb HR i augment en l'expressió de gens *PRs* (Nishizawa *et al.*, 1993).

Quitinases: Les quitinases d'arròs de classe I (*Cht1-3*) s'indueixen a les fulles per ferida, elicitors fúngics, ET i SA (Jwa *et al.*, 2006). El significat funcional dels gens quitinasa prové de plantes d'arròs que sobreexpressen aquests gens i que són resistents a l'atac per fongs (Lin *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1994). Gens que codifiquen quitinases d'arròs, són eficients contra *Rhizoctonia solani* i *Magnaporthe grisea* (van Loon *et al.*, 2006). La quitinasa OsPR3 s'ha fet servir en el control de la malaltia del cremat en les beines (*sheath blight disease*), mitjançant plantes transgèniques d'arròs (Datta *et al.*, 2001).

OsPR5 (proteïnes similars a taumatina): La presència d'una proteïna OsPR5, de baix pes molecular, es va trobar per primer cop en fulles de plantes d'arròs madures tractades amb JA, coure, i radiacions UV d'ones baixes (Rakwal *et al.*, 1999). A més, la sobreexpressió de OsPR5 confereix alta resistència a la malaltia del cremat en les beines d'arròs *sheath blight disease* (Datta *et al.*, 1999) i resistència a la infecció per *M. grisea* (Rakwal i Komatsu, 2000; Rakwal *et al.*, 2001) i *Rhizoctonia solani* en arròs (Grover i Gowthaman, 2003). Mitjançant anàlisi de *Southern* s'ha confirmat que OsPR5 és una família multigènica (Jwa *et al.*, 2006).

Inhibidors de proteases (PR-6): S'han caracteritzat dos inhibidors de cisteïnaproteases (o cistatines) en llavors d'arròs: Oryzacistatina I i II (Abe *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1991). Recentment, s'han descrit dos nous gens que codifiquen inhibidors de proteases, *OsBBPI* i *OsPIN*, i que s'expressen en fulles d'arròs (Agrawal *et al.*, 2002; Rakwal *et al.*, 2001b). *OsBBPI*, que forma part d'una família multigènica del genoma d'arròs, sobreactiva la seva transcripció en fulles de plàntules en resposta a ferida, JA, i estímuls llum/foscors en el temps de manera dosi-depenent. Per altre banda, l'expressió de *OsPIN*, aïllat d'una llibreria de cDNAs expressats diferencialment en fulles d'arròs infectades amb *M.grisea*, s'indueix fortament en interaccions hoste-patògen compatibles, però no incompatibles. Considerant només la seva resposta front patògens, es creu que *OsPIN* pot utilitzar-se com a marcador per l'estudi de les vies de senyalització activades per la interacció arròs-*M.grisea*. Un altre inhibidor de proteases caracteritzat recentment en arròs, és el codificat pel gen *Sci 1* (*Subtilisin-chymotrypsin inhibitor 1*), que sembla estar involucrat en la resposta a infecció per *M. grisea* (resultats no publicats, N° Accés NCBI: AY878693, Zhao i Peng, 2006).

OsPR10: La primera PR10 d'arròs va ser identificada en plantes tractades amb probenazole (PBZ) i per això va ser anomenada com a *PBZI* (Midoh i Iwata, 1996). Més tard es van identificar tres noves proteïnes OsPR10 a partir de plantes estressades, les OsPr10a-c de tamanys de 18-20 kDa (Hajduch *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 1999; Rakwal *et al.*, 2001a; Rakwal *et al.*, 2001b). Altres PR10 d'arròs són les *RPR10a-c* (McGee *et al.*, 2001), on *RPR10a* és idèntica en un 99% a *OsPR10a*. Els gens *RPR10a* i *b* també estan regulats positivament per infecció amb *M.grisea* (McGee *et al.*, 2001). S'ha identificat també una PR10 induïble per JA, anomenada *JIOsPR10*, d'expressió no constitutiva i que respón a ferida, que també està regulada positivament per JA, SA, H₂O₂ i infecció per *M.grisea*, però no per ET i ABA.

Tionina (PR13): La expressió d'una tionina d'avena en plantes d'arròs, genera resistència front infecció de dos fongs del terra que afecten a les llavors (Iwai *et al.*, 2002). S'ha identificat també un gen d'arròs similar a tionina que no s'expressa de manera constitutiva a les fulles o les fulles de la beina, i que és induït per JA i SA (Jwa *et al.*, 2006).

Proteïnes transportadores de lípids (LTPs): L'arròs presenta una "petita família de gens" de LTPs, i com a mínim es coneixen 9 gens que pertanyen a les classes I-V del grup I (Vignols *et al.*, 1994; 1997). Estudis preliminars indiquen que les LTP d'arròs responen a estressos com SA, ABA, sals, mannitol i infecció per *P. syringae*

Factors de transcripció WRKY: Les proteïnes WRKY són una àmplia família de factors de transcripció que participen en les respostes de la planta a estressos biòtics i abiòtics. Fins el moment, s'han predit uns 105 gens *OsWRKY* en el genoma de l'arròs. Basant-se en anàlisis filogenètics, al menys deu d'ells, poden estar involucrats en defensa, i responen a tractament amb SA. Un d'ells, *OsWRKY71*, està regulat positivament per SA, MeJA, ACC (àcid 1-aminociclo-propà-1-carboxílic), així com ferida i infecció per patògens, suggerint que efectivament està involucrat en la resposta a estrès en arròs (Liu *et al.*, 2006). La sobreexpressió d'aquest gen *OsWRKY71* en arròs, proporciona major resistència al patògen virulent *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo), a més de regular l'expressió constitutiva de dos gens marcadors de la via de senyalització de defensa a l'arròs, com són *OsNPR1* (*OsNHI*) i *OsPR1b*. Aquest resultat suggereix que *OsWRKY71* pot funcionar com a regulador transcripcional en la via de senyalització, confirmant un alt grau de similitud amb aquesta resposta defensiva entre arròs i *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2006). De la mateixa manera, plantes transgèniques que sobreexpressen el *OsWRKY03* tenen augmentada l'expressió de *OsNPR1* i altres gens de defensa com *OsPR1b*, *ZB8* i *POX22.3*, confirmant de nou la situació de *OsWRKY03*, com a activador transcripcional en les cascades de senyalització de defensa dependents de SA o JA (Liu *et al.*, 2005). En ambdós casos, assaigs de localització situen a *OsWRKY71* i *OsWRKY03* en el nucli.

Gens de proteïnes relacionades amb estrès oxidatiu

Per tal d'escapar als danys provocats per l'explosió oxidativa que es produeix en la resposta temprana de defensa front patògens, les plantes han desenvolupat sistemes per protegir-se d'aquestes formes tan altament reactives de l'oxigen, com són el radical superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o el radical hidroxil ($OH\cdot$). D'aquesta manera, les plantes regulen els nivells de molècules ROS mitjançant sistemes enzimàtics o no enzimàtics. Els sistemes no enzimàtics es basen en la producció de compostos antioxidants capaços de segrestar molècules ROS (p.ex glutatión, ascorbat, etc.). Les respostes enzimàtiques, inclouen la síntesi d'enzims concrets. Així, la superòxid dismutasa (SOD) catalitza la conversió de O_2^- en O_2 i H_2O_2 (Bowler *et al.*, 1992). La catalasa (CAT) i/o l'ascorbat peroxidasa (APX), transformen el H_2O_2 en H_2O i O_2 (Asada, 1992; Scandalios, 1990). Després, la forma extracel·lular de la peroxidasa de classe III (POX), catalitza l'oxireducció entre H_2O_2 i altres reductants diferents, i la seva activitat s'ha correlacionat també amb la defensa de la planta front patògens (Chittoor *et al.*, 1999). En arròs, l'activitat enzimàtica de la majoria d'aquest enzims s'ha mesurat contra estressos com el fred, la sequera, salinitat i calor (Salekdeh *et al.*, 2002; Saruyama i Tanida, 1995; Tanaka *et al.*, 1999, Uchida *et al.*, 2002; Ushimaru *et al.*, 1997). Tanmateix, estudis recents a nivell transcripcional dels gens que codifiquen aquests enzims, han demostrat l'idoneïtat d'utilitzar gens ROS individuals com a marcadors per estudiar les vies de senyalització de defensa/estrès.

OsCATC: En arròs, es coneixen tres gens CAT (*OsCATA-C*). La caracterització del gen *OsCATC* front molècules senyalitzadores, revelen una activa regulació negativa de la seva expressió, què està influenciada per les senyals lumíniques (Agrawal *et al.*, 2001).

OsPOX: Es coneixen com a mínim 42 ESTs diferents de *POX* en arròs. Inicialment se'n van caracteritzar 5: *POXgP2.3*, *gPOX8.1*, *gPOX22.3*, *POXgX9* i *POX5.1* (Chittoor *et al.*, 1997; 1999). Recentment, el perfil d'expressió de 21 gens *POX*, ha revelat que aquests gens tenen funcions biològiques diverses durant el creixement i en resposta a estressos ambientals (Hiraga *et al.*, 2000).

OsAPX: L'efecte de l'estrès per fred s'ha investigat en cultivars d'arròs resistents i sensibles a canvis en la temperatura, determinant-se que els danys per congelació estan àmpliament lligats a l'activitat de APX (Saruyama *et al.*, 1995). S'ha vist que l'estrès tèrmic per elevades temperatures resulta en un increment transcripcional de APX. Altres estressos com SO_2 i O_3 , també provoquen un marcat increment del nivell citosòlic de APX (Agrawal *et al.*, 2002; Rakwal *et al.*, 2003). A més, l'expressió de *OsAPX1* i *OsAPX2* està també regulada positivament per infecció per *M. grisea* (Agrawal *et al.*, 2003).

OsATX: S'ha clonat un gen *OsATX* a partir d'una llibreria de cDNA de fulles de plàntules d'arròs tractades amb JA (Agrawal *et al.*, 2002). Aquest gen està també potencialment regulat positivament per una gran varietat de molècules com JA, H₂O₂, però no per ET, i infecció per *M. grisea*. Com era d'esperar, ja que la proteïna OsATX presenta un domini d'unió a metalls, aquests gen indueix positivament la seva expressió en presència de coure i metalls pesants.

Gens de la via de metabòlits secundaris, producció de fitoalexines

A més de la producció de PRs durant la resposta de defensa/estrès, la planta acumula de manera natural tota una sèrie de metabòlits secundaris de baix pes molecular.

Els metabòlits secundaris antimicrobians (fitoalexines) contribueixen al sistema d'autodefensa de les plantes, donada la seva elevada activitat antimicrobiana i la seva acumulació ràpida al voltant del lloc d'infecció poc després de l'atac pel patògen (Dixon *et al.*, 1983; Grayer i Kokubun, 2002 ; Hain *et al.*, 1993; Kuc, 1991; Paxton, 1994). La fenilalanina ammonia-liasa (PAL), catalitza el primer pas de la biosíntesi d'un gran número de productes naturals de la planta, incloent monòmers de lignina així com certes classes de fitoalexines (Dixon *et al.*, 2001; Jones, 1984). La chalcone sintasa (CHS) catalitza el primer pas de la síntesi de flavonoids, constituint un important pas de la síntesi de metabòlits secundaris.

OsPAL i OsCHS: S'han aïllat tres gens *OsPAL* en arròs: *GP-1*, *Gp-28* i *ZB8* (Minami *et al.*, 1989; Minami i Tanaka, 1993; Zhu *et al.*, 1995), que s'indueixen en resposta a ferida i a infecció per elicitors fúngics de *M. grisea*. Per altra banda, el gen *OsCHS* presenta una expressió específica depenent de desenvolupament (Jwa *et al.*, 2006).

Fitoalexines: Les fulles de les plantes d'arròs presenten una gran varietat de components antimicrobians, tant constitutius com induïts. Les fitoalexines d'arròs inclouen tant flavonoids com diterpenoids (Grayer i Kokubun, 2001), i es sintetitzen en resposta a gran varietat d'estímuls biòtics i abiòtics (Jwal *et al.*, 2006). Un estudi realitzat en genotips d'arròs amb diferents graus de susceptibilitat a *M. grisea* fent servir com a elicitor llum UV de baixa longitud d'ona, revela majors quantitats de fitoalexines en cultivars resistents que no pas en susceptibles (Dillon *et al.*, 1997).

Taula II. Gens relacionats amb patogènia i altres estressos en arròs (Modificat de Jwa *et al.*, 2006). Abreviacions: ABA, àcid abscísic; ET, Etilè; H₂O₂, peròxid d'hidrogen; IP, inhibidors de proteases ; JA, àcid jasmònic; LTP, proteïna transportadora de lípids O₃, ozò; PBZ, probenazole; SA, àcid salicílic; SO₂, diòxid de sofre, GNS, glucanasa; UV, radiació ultravioleta.

Gen/proteïna	PR	Regulats positiva o negativament (-)
<i>OsPR1a</i>	PR-1	Ferida, JA, SA, <i>Magnaporthe grisea</i> i varies senyals d'estrès ambiental
<i>OsPR1b</i>	PR-1	Ferida, JA, SA, <i>Magnaporthe grisea</i> i varies senyals d'estrès ambiental
<i>OsPR2</i>	PR-2	Ferida, ET, SA i elicitors fúngics
<i>OsGns1</i>	PR-2	JA
<i>Quitinases</i>	PR-3	Ferida, JA, SA, elicitors fúngics, ET i ABA
<i>OsPR5</i>	PR-5	Ferida, JA, SA, ET, coure, UV-C i patògens,
<i>OsOC1/2</i>	PR-6 (Inhibidors de proteases)	Ferida, JA, desenvolupament i patògens
<i>OsBBPI</i>	PR-6 (Inhibidors de proteases)	Ferida, JA, desenvolupament i patògens
<i>OsPOX</i>	PR-9	Ferida, JA, SA, patògens, ABA(-) i ET
<i>OsPR10</i>	PR-10	JA, SA, PBZ, ET, patògens, H ₂ O ₂ , O ₃ i SO ₂
<i>Tionines</i>	PR-13	JA (?)
<i>OsGST1/2</i>	(PR like)	Fred i patògens
<i>LTP</i>	PR-14	SA, ABA, sals, desenvolupament i patògens
<i>OsWRKY71</i>		Ferida, JA, SA i patògens
<i>OsWRKY03</i>		Ferida, JA, SA i patògens
<i>OsCATC</i>		Múltiples estressos (-)
<i>OsAPX</i>		Ferida, JA, SA, calor, sals, O ₃ , SO ₂ i varies senyals d'estrès ambiental
<i>OsPHGPX</i>		Ferida, JA, SA, patògens i varies senyals d'estrès ambiental
<i>OsATX</i>		Ferida, JA, H ₂ O ₂ i coure
<i>OsPAL</i>		Ferida, SA, elicitors fúngics i radiacions
<i>OsCHS</i>		Ferida i radiacions
<i>Fitoalexines</i>		Diferents estressos biòtics i abiòtics

3.3 La Resposta Sistèmica Adquirida (SAR)

3.3.1 Senyalització dependent d'àcid salicílic (SA)

La Resposta Sistèmica Adquirida (SAR) seria l'equivalent a la immunització que es dona en els animals vertebrats, segons la qual una infecció inicial per un patògen, que és superada per la planta, determina una resistència generalitzada en tota la planta. Aquesta resistència "immunitza" la planta contra futures agressions, i a més de forma inespecífica, és a dir, no només front el patògen inicial sinó també davant altres patògens. Aquesta protecció duradora, s'observa tant en els teixits infectats inicialment com en les parts distals de la planta (Ryals *et al.*, 1996). La HR estimulada per l'atac de certs patògens, provoca l'activació de la senyalització dependent de SA. Dos gens, **PADA** (*PHYTOALEXIN DEFICIENT 4*) i **EDS1** (*ENHANCED DISEASE SUBCEPTIBILITY 1*), es requereixen per activar l'acumulació de SA en resposta d'alguns, però no tots, estímuls inductors de SA (Falk *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1998). Aquests gens codifiquen proteïnes similars a triacil-glicerol **lipases** que interaccionen entre elles, tot i que no hi ha

evidències de que es necessiti activitat lipasa per la seva funcionalitat (Falk *et al.*, 1999; Jirage *et al.*, 1999; Feys *et al.*, 2001). PAD4 sembla que activa respostes de defensa a més de la senyalització de SA (Glazebrook *et al.*, 2005; Durrant i Dong, 2004).

El rol del SA en la resposta SAR ha estat àmpliament comentat en moltes revisions (Ryals *et al.*, 1996; Shah i Klessig, 1999; Dempsey *et al.*, 1999; Dong, 2001; Durrant i Dong, 2004), on s'ha descrit que en moltes plantes la SAR ve precedida per un increment en la concentració de SA. Malgrat això, algunes plantes, com és el cas de la patata i l'arròs, tenen alts nivells endògens de SA en condicions de no inducció. De fet, l'aplicació de SA a plantes de patata no protegeix front l'oomicet patogen *P. infestans* (Coquoz *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997). De totes maneres, l'expressió del gen *nahG* que codifica l'enzim salicilat hidroxilasa (que degrada SA), anula la resistència a *P. infestans*, suggererint que després de la interacció amb aquest patogen, en comptes d'augmentar el nivell de SA, les plantes es tornen més sensibles a aquesta hormona (Yu *et al.*, 1997). Així, SA pot considerar-se una molècula essencial per la resposta SAR en plantes, malgrat pot diferir el mecanisme mitjançant el qual actua.

Tot i no estar provat, inicialment va ser assumit que el SA per la resposta SAR es sintetitza per mitjà de la via del fenilpropanoid (Lee *et al.*, 1995). Estudis més recents però, han mostrat que, com les bacteries, les plantes poden sintetitzar SA a partir de corismat mitjançant la via de l'**isocorismat** (Verberne *et al.*, 2000; Mauch *et al.*, 2001). En aquest sentit, a partir de mutants d'*Arabidopsis* incapaçs d'acumular SA, es va caracteritzar entre d'altres, el **SID2/EDS16** (SA INDUCTION-DEFICIENT 2/ENHANCED DISEASE SUBCEPTIBILITY 16) que codifica una **ICS1** (ISOCORISMAT SINTASA 1). Plantes que tenen mutacions en el gen *ICS1* (*sid2* i *eds16*) mostren una acumulació de SA de només un 5-10% respecte el control després de la infecció, i presenten també una reducció tant en la resistència local com sistèmica (Wildermuth *et al.*, 2001). Aquests autors proposen que la via del fenilpropanoid és responsable de la producció de SA, associada a mort cel·lular a nivell local, mentre que la via de l'isocorismat és més important per la síntesi de SA mantinguda durant el desenvolupament de la SAR.

En la **Figura 13**, es mostra un esquema general de la resposta de defensa front patògens, tant local com sistèmica. La identificació de components reguladors "cadena amunt" per la inducció de la síntesi del SA, especialment de la ICS1, és molt important per poder entendre el control de la SAR. Així, l'expressió constitutiva de ICS1 en els mutants *cpr1*, *cpr5* i *cpr6* (*constitutive expresser of PR genes*) augmenta en tres vegades el seu grau de resistència (Wildermuth *et al.*, 2001).

Altres mutants, han permès caracteritzar el gen *SID1/EDS5* que codifica una proteïna amb similitud de seqüència amb la família de proteïnes de transport MATE (*Multidrug and Toxin Extrusion*), el que

INTRODUCCIÓ

suggereix que aquesta proteïna podria estar involucrada en el transport del SA, o d'un precursor fenòlic, fora del plastidi després de la seva síntesi (Métraux, 2002).

SID1/EDS5 es requereix també per la producció de SA en resposta a l'atac per patògens (Nawrath i Métraux, 1999). L'expressió induïda per patògens de *EDS5* requereix de *EDS1* i *PAD4*, col·locant a *EDS5* per sota de *PAD4* i *EDS1* en la via de senyalització de SA (Nawrath *et al.*, 2002).

S'ha demostrat que els anteriorment citats, *EDS1* i *PAD4*, són activats a partir del mateix tipus de gens *R* (TIR-NBS-LRR), i que ambdós interaccionen *in planta*, semblant probable que funcionin en la mateixa via (Feys *et al.*, 2001) (**Figura 13**). Ha estat proposat, que *EDS1* contribueix a l'acumulació inicial de SA i al desenvolupament de la HR, i aleshores interacciona amb *PAD4* per amplificar els nivells de SA. A més, es coneix que tant *EDS1* com *PAD4* funcionen en un bucle amb retroalimentació positiva, amplificant-se mútuament la pròpia expressió i incrementant la producció de SA després de la infecció (Durrant i Dong, 2004).

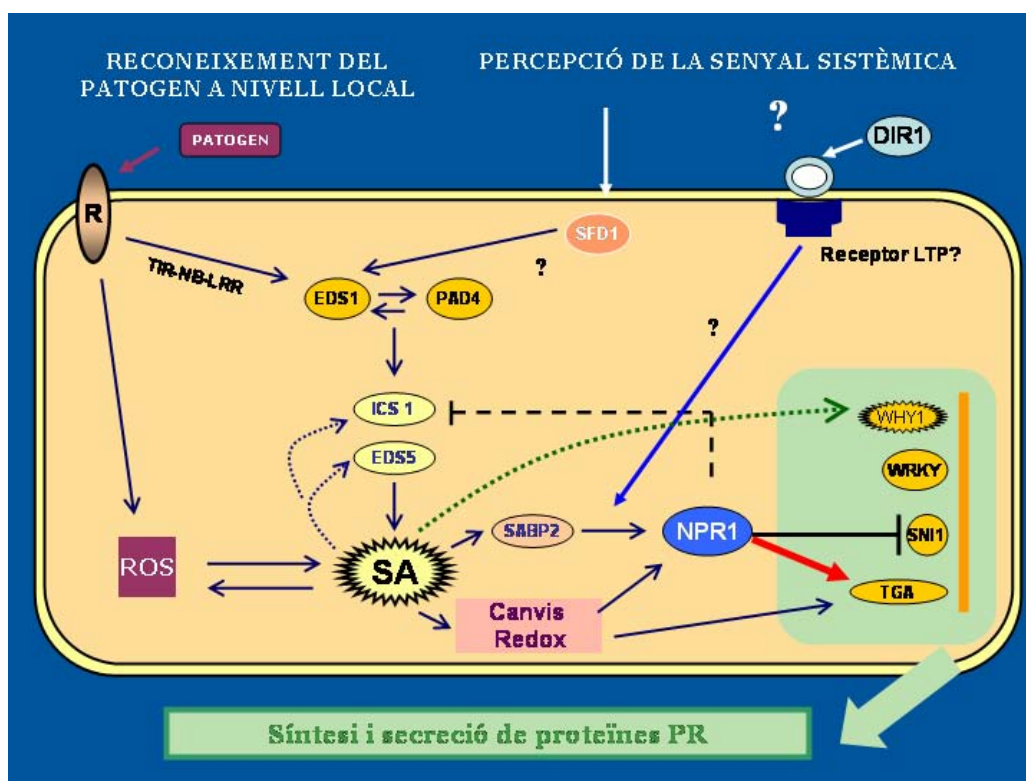


Figura 13. Esquema dels mecanismes generals que es produeixen en la resposta de defensa de la planta. El procés s'inicia quan es dona un reconeixement local del patògen, o elicitador, per receptors específics de la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal. El resultat és l'activació d'una sèrie de senyals que porten a l'expressió de gens implicats en les diferents respostes de defensa.

3.3.2 Senyalització sistèmica

L'inici de la SAR va acompanyat d'un increment, tant local com sistèmic, en els nivells endògens de SA. Tot i que el SA es mou per la planta, no és la senyal mòbil de la SAR (Sticher *et al.*, 1997). Recents estudis, suggereixen que la molècula senyalitzadora de la SAR podria tenir naturalesa lipídica. Així, el mutant d' Arabidopsis anomenat *dir1* (*defective in induced resistance1*), és incapaç de desenvolupar la SAR. **DIR1** és una hipotètica proteïna apoplàstica de transferència de lípids, requerida per la SAR induïda per patògens (Maldonado *et al.*, 2002). Aquest grup suggereix que DIR1 interactua amb molècules derivades de lípids per permetre la senyalització a llarga distància. Curiosament, la proteïna **SABP2** (SA-BINDING PROTEIN2), que funciona com a receptor de SA en tabac infectat pel virus del mosaic (TMV), és una lipasa l'activitat de la qual s'estimula 4 o 5 vegades per unió a SA, podent generar senyals derivades de lípids que funcionen en la SAR (Kumar i Klessig, 2003). A més, la **SFD1** (SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1), necessària per l'activació sistèmica de SAR, està involucrada en la síntesi de glicerolípidis (Nandi *et al.*, 2004). Altres evidències de la naturalesa lipídica de la molècula senyalitzadora, arriben a partir de la caracterització dels mutants anteriorment citats *eds1* i *pad4*, ambdós defectius en proteïnes tipus lipasa i deficients en la resposta a SAR, tant local com sistèmica (Falk *et al.*, 1999; Jirage *et al.*, 1999). Malgrat molts altres gens *R* actuen per vies independents a EDS1, en les plantes *eds1* i *pad4*, inclòs quan es dona HR normal per patògens, la SAR no es veu induïda (Durrant i Dong, 2004). Junts, aquests resultats suggereixen que les senyals derivades de lípids són components importants de la senyalització a llarga distància de la SAR.

Pel que fa el transport d'aquesta molècula senyalitzadora, sembla probable que el floema sigui el principal conducte de la senyal(-s) de SAR, tot i que alguns estudis més precisos mostren que alguna fracció d'aquesta senyal podria també moure's per una via diferent (Kieffer i Slusarenko., 2003).

3.3.3 Transmissió de la senyal per a la resposta SAR

El SA s'acumula en teixits de plantes que perceben senyals de SAR a llarga distància, provocant una regulació positiva d'una gran quantitat de gens de defensa, inclosos aquells que codifiquen proteïnes PR (Sticher *et al.*, 1997; van Loon i van Strien, 1999; van Loon, 2006). A més de l'activació directa de gens *PR* que responen a SA, la SAR també s'associa amb l'habilitat per induir respostes cel·lulars de defensa més ràpidament i en major grau que en plantes no "immunitzades". Aquest procés anomenat "**priming**" (Conrath *et al.*, 2002) porta a l'expressió augmentada de gens de defensa quan es dona una infecció posterior per patògens.

3.3.3.1 *Espècies reactives d'oxigen, ROS (Radical superòxid O₂⁻ i Peròxid d'hidrogen H₂O₂) en la resposta SAR*

Tot i que en estudis primerencs no es va detectar la presència d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en teixits sistèmics durant l'inici de la SAR (Neuenschwander *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1995), ha estat descobert que cèl·lules de fulles no inoculades d'*Arabidopsis* amb un patògen no virulent, concentren H₂O₂ en forma de petites acumulacions (Álvarez *et al.*, 1998). Aquestes petites "microexplosions oxidatives" tenen lloc dos hores més tard de l'acumulació oxidativa principal en el teixit inoculat, i van seguides de la formació de lesions HR microscòpiques. Mitjançant catalasa (per eliminar H₂O₂) o inhibidors de la NADPH oxidasa (complex enzimàtic que catalitza la formació del radical superòxid (O₂⁻), ha estat demostrat que tant la primera com la segona microexplosió oxidativa són necessàries per l'inici de la SAR (Durrant i Dong, 2004).

3.3.3.2 *La proteïna NPR1*

La transducció de la senyal de SA per activar l'expressió dels gens *PR* i iniciar la SAR requereix de la funció de la proteïna **NPR1 (NONEXPRESSOR OF PR GENES 1)**, també anomenada **NIM1 (NON-INDUCIBLE INMUNITY1)**. La NPR1 és una proteïna reguladora identificada en *Arabidopsis* a partir de diferents cribatges genètics en mutants amb la resposta SAR afectada (Cao *et al.*, 1997). Aquests mutants *npr1* identificats eren insensibles a tots els inductors de la SAR, incloent SA (àcid salicílic), els anàlegs de SA com INA (àcid 2,6-dicloroisonicotínic) i BTH (benzotiadiazol S-metil ester), i patògens avirulents (Cao *et al.* 1997; Shah *et al.*, 1997; Glazebrook *et al.*, 1996 ; Delaney *et al.*, 1995). Aquests mutants, també tenen compromesa la resistència basal, mostrant símptomes de la malaltia augmentats en ser infectats amb patògens virulents.

Originàriament, es va pensar que els mutants *npr1* eren únicament deficients en la defensa mediada per SA. Però, en aquests mateixos mutants, l'activació de la ISR també es mostrava disminuïda. Cal destacar que la resposta ISR és independent de SA, demostrant per tant que NPR1 també és necessària per aquesta resposta de defensa (Veure **Apartat 3.5**).

El fet que els mutants *npr1* mostrin alts nivells de SA, suggereix que la NPR1 té un paper important tant en la detoxificació de SA, com en la retroalimentació reguladora de la síntesi de SA (Cao *et al.*, 1997; Kinkema *et al.*, 2000). *NPR1* s'expressa constitutivament per tota la planta a nivells baixos, i els seus nivells de trànscripats augmenten unes 2-3 vegades a partir d'infecció o tractament amb SA (Cao *et al.*, 1997, 1998; Ryals *et al.*, 1997).

L'expressió de la NPR1 és probablement activada per factors de transcripció del tipus WRKY, ja que mutacions en caixes d'unió a aquests factors (W-boxes) en bloquegen la seva expressió (Yu *et al.*, 2001).

Per altra banda, recentment s'ha descrit la funció de una nova proteïna anomenada NIMIN1 (NIM1 INTERACTING) (Chern *et al.*, 2005). Aquesta proteïna i la NPR1 s'han pogut copurificar a partir d'extractes de plantes, donant evidències bioquímiques de la seva interacció. També s'han obtingut evidències funcionals d'aquesta interacció. Així, plantes transgèniques que expressen constitutivament grans quantitats de *NIMIN1*, presenten una menor inducció de l'expressió de gens *PR* mediada per SA, i una resposta SAR afectada. Aquests efectes eren dependents de la habilitat de NIMIN1 per interaccionar amb NPR1. A més, plantes mutants *nimin1*, mostraven hiperactivació de l'expressió de gens *PR* després del tractament amb SA. Aquests resultats suggereixen que NIMIN1 pot regular negativament determinades funcions de NPR1, proporcionant un mecanisme per modular trets específics de la SAR (Chern *et al.*, 2005).

S'ha descrit també, que l'expressió de *NPR1* en diferents espècies (*NPR1*) incrementa la resistència front patògens (Cao *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001), indicant que la seva funció pot estar conservada en aquestes espècies. En *Arabidopsis*, la *NPR1* no comporta una expressió constitutiva de gens *PR*, com sí succeeix amb altres mutants constitutius de defensa. L'augment en la resistència és probablement degut a una resposta més ràpida i forta dels gens *PR*, a partir del contacte amb el patògen (Cao *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001).

La proteïna NPR1 presenta dos motius d'interacció proteïna-proteïna (**Figura 14**), un domini amb repeticions anquirina i un domini **BTB/POZ** (*Broad-complex Tramtrack Bric-a-brac/Poxvirus Zinc finger*), una senyal de localització nuclear (**NLS**) i diferents llocs de fosforilació (Ryals *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1997).



Figura 14. Representació esquemàtica dels diferents dominis presents en la proteïna NPR1 d'*Arabidopsis thaliana*. Es mostra el domini central amb repeticions anquirina, el domini BTB/POZ (*Broad-complex Tramtrack Bric-a-brac/Poxvirus Zinc finger*) i la senyal de localització nuclear (NLS).

Un punt de desconeixement en la via de senyalització de la SAR és el mecanisme pel qual el SA activa la proteïna NPR1.

Diferents estudis han portat a la identificació d'algunes proteïnes d'unió a SA, entre les que destaquen una catalasa, un ascorbat peroxidasa, una anhidrasa carbònica i l'anteriorment citada lipasa SABP2 (Dong, 2004). A partir del silenciament d'aquesta lipasa, la SAR és abolida, suggerint que la SABP2 és

INTRODUCCIÓ

probablement un receptor de SA necessari per aquest tipus de resposta. Les proteïnes d'unió a SA de baixa afinitat són principalment antioxidants, i el SA n'inhibeix les seves activitats, contribuint a l'acumulació de ROS. Per altra banda, roman per resoldre com, a partir d'aquesta primera explosió oxidativa per acumulació de SA, es dona un posterior estat de reducció. És possible que durant la SAR, el SA no només activi aquesta primera explosió oxidativa, sinó que també sigui necessari per establir condicions de reducció, potser per l'activació de gens que codifiquen proteïnes antioxidants. En *Arabidopsis*, després de l'expressió de gens *PR* depenents de NPR1 que es dona a les 12-16h post-inducció d'aquest gen, s'observen canvis d'expressió gènica amb pics aproximadament a les 2-3h després de la inducció per SA. Els primers gens induïts en aquesta onada d'expressió són gens que codifiquen enzims detoxificadors (com la glutatió S-transferasa) i que protegeixen les cèl·lules vegetals contra l'estrès oxidatiu (Dong, 2004).

En *Arabidopsis*, NPR1 actua com a modulador de l'expressió de gens *PR* però no s'uneix al DNA directament (Després *et al.*, 2000).

3.3.3.3 *Funció de factors de transcripció TGA i WRKY*

A partir d'anàlisis de tipus doble híbrid s'ha vist que NPR1 actua a través de membres de la subclasse TGA de la família bZIP (*basic leucine zipper*) de factors de transcripció (TGAs), els quals estan implicats en l'activació de gens *PR* que responen a SA (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Els TGAs s'uneixen a seqüències d'activació-1 (*as-1*) o elements similars que es troben en molts promotors de plantes, durant la resposta de defensa, incloent el promotor del gen *PR-1* d'*Arabidopsis* (Lebel *et al.*, 1998). També s'ha demostrat, que la NPR1 augmenta substancialment la unió de TGA2 a elements de promotors que responen a SA en aquests gens *PR1* d'*Arabidopsis* (Després *et al.*, 2000) suggerint que la unió a DNA de TGAs mediada per NPR1 és important per l'activació de gens *PR*.

Diferents evidències de la unió de la NPR1 i TGAs, mostren que aquest fet es dona *in planta*. S'ha demostrat que existeix interacció *in vivo* entre NPR1 i TGA2, mostrant que aquesta es induïda per SA i es dona predominantment en el nucli (Subramaniam *et al.*, 2001). Experiments tant genètics com d'immunoprecipitació han proporcionat evidències de que la interacció NPR1-TGAs és essencial per l'activació mediada per SA de gens *in vivo* (Fan i Dong, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

Per altra banda, anàlisis de mutants per pèrdua de funció (*knockout*) en *Arabidopsis*, tant mutants simples, dobles i triples dels factors TGA2, TGA5 i TGA6, en diferents combinacions, han establert que aquests TGA tenen un rol parcialment redundat així com un paper essencial en l'activació de l'expressió de gens *PR* i la SAR en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2003). Per altra banda, en alguns casos, com en el de la resistència mediada pel TGA5, s'ha mostrat la seva participació en la regulació d'un

mecanisme de defensa independent a SA. Així, diferents membres de la família multigènica TGA semblen tenir contribucions addicionals específiques en les respostes de defensa (Durrant i Dong, 2004).

Diferents estudis amb 7 TGAs d'Arabidopsis, han mostrat que, per exemple, els factors TGA2, TGA3 i TGA6 són els que presenten una unió més forta a la NPR1 en assaigs de doble híbrid (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Curiosament, els factors TGA1 i TGA4, que en aquests tipus d'estudis no mostraven interacció, sí ho feien *in planta* a partir de fulles tractades amb SA (Després *et al.*, 2003). Aquests darrers autors, demostraren també, que aquesta unió *in vivo* és deguda a l'estat de reducció que presenten aquests factors, que tenen residus cisteïna susceptibles de formar ponts disulfur, prevenint així la seva interacció amb la NPR1. Un cop es tractaven les fulles d'Arabidopsis amb SA, els residus cisteïna eren reduïts i d'aquesta manera es facilitava la interacció amb la NPR1, i la posterior unió del factor TGA1 a elements de promotors que responen a SA (Pietersen, 2004).

A més dels TGAs, els factors de transcripció tipus WRKY han estat estudiats com a possibles co-reguladors de gens *PRs*. Els elements *cis* reconeguts per aquests tipus de reguladors (W-boxes) estan sobrerrepresentats en el reguló *PR1*, i mutacions en les W-boxes porten a la depressió del promotor de la *PR1* (Lebel *et al.*, 1998; Maleck *et al.*, 2000).

3.3.3.4 Canvis en l'estat Redox connecten la senyal de SA amb la funcionalitat NPR1

L'observació que les proteïnes NPR1 de diferents espècies vegetals contenen residus cisteïna conservats que són capaços de formar ponts disulfur intra i inter-moleculars, i que mutacions en un d'aquests residus cisteïna provoquen fenotip *npr1* mutant (Mou *et al.*, 2003), va portar a la hipòtesi que la conformació, i per tant la funció de la proteïna NPR1, pot ser sensible a canvis en l'estat redox de la cèl·lula induïts per SA. També es demostrà, que la inducció de SAR està associada a canvis en l'estat redox, possiblement causats per acumulació d'antioxidants. Així, sota aquestes condicions, es coneix que la NPR1 és reduïda des d'un complex oligomèric inactiu a una forma monomèrica activa, forma que és translocada al nucli de la cèl·lula per a interaccionar amb TGA. Sembla ser que la forma monomèrica es requereix per l'activació de *PR1* (la inhibició de la reducció de NPR1 evita l'expressió de gens *PR1*). Mutacions en dos residus cisteïna crucials de la NPR1 (implicats en la formació de l'oligomer NPR1), provoquen monomerització constitutiva i localització nuclear de NPR1, així com expressió constitutiva de gens *PR1*. D'aquesta manera, canvis en l'estat redox cel·lular induïts en resposta a l'acumulació de SA connecten la senyalització de SA amb l'activitat de NPR1. En la **Figura 15**, es mostren els processos i components de la resposta de defensa regulats per NPR1 dependent dels canvis redox.

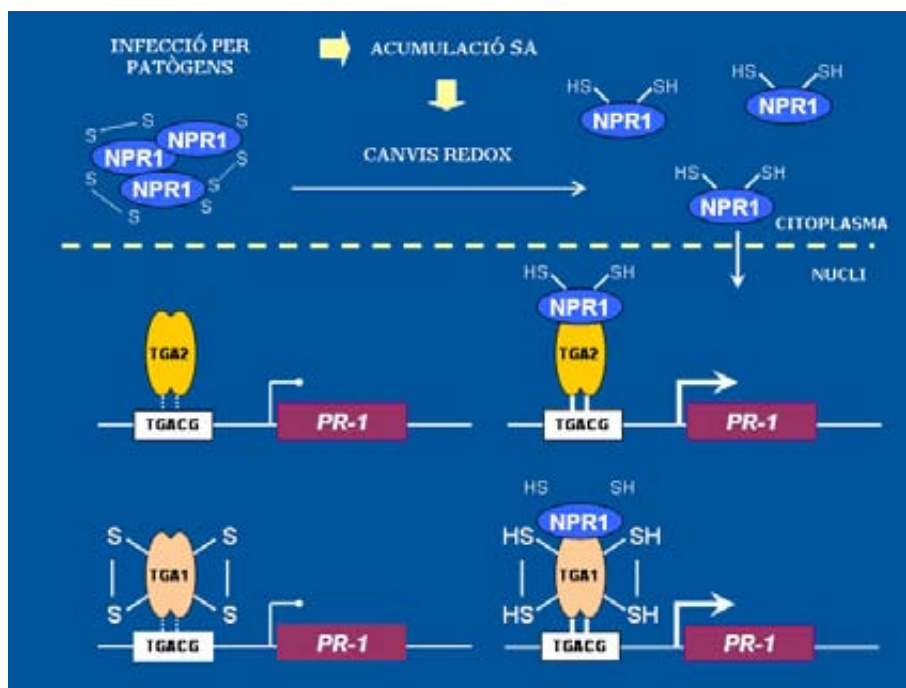


Figura 15. Model del possible rol dels canvis redox mediats per SA, la NPR1 i els factors de transcripció TGAs en l'expressió de gens durant la SAR. En cèl·lules no induïdes, la forma no oxidada de la NPR1 inactiva roman en el citosol. En aquesta situació, la unió dels factors de transcripció TGAs als elements de resposta a salicíclic (TGACG) no és suficient per activar l'expressió de gens PRs. Un cop efectuada la infecció per patògens, s'acumula SA i les cèl·lules vegetals generen un ambient més reduït, possiblement donat per l'acumulació d'antioxidants. Sota aquestes condicions la NPR1 es redueix, passant de la seva forma oligomèrica inactiva al seu estat monomèric actiu, mitjançant la reducció de ponts disulfur intermoleculars. La NPR1 és translocada al nucli on interacciona amb factors TGAs, com el TGA2. Aquest fet, estimula l'activitat d'unió al DNA per part dels factors TGAs a elements *cis* específics, resultant en un activació de l'expressió de gens *PRs*.

S'ha identificat una funció citosòlica addicional de NPR1 en la interconnexió entre les vies de defensa dependents de SA i JA (veure **Apartat 3.4.2**).

3.3.4 Via d'activació de la resposta SAR no dependent de NPR1

Algunes de les respostes de defensa dependents de SA que porten a la inducció de l'expressió dels gens de la SAR, són independents de NPR1, indicant per tant que ha d'haver una altra branca en la via de senyalització induïda per SA (Clarke *et al.*, 2000; Uquillas *et al.*, 2004).

A partir dels mutants d'*Arabidopsis sni1* (*supressor of npr1 inducible*), en els que es restaurava l'expressió de gens *PR* induïda per SA i la resistència a patògens en el fons mutant *npr1*, es va caracteritzar **SNI1**, una proteïna reguladora nuclear que reprimeix l'expressió de PRs i la resposta SAR.

Mitjançant els mutants *snl* anteriorment citats (regulador negatiu de la SAR), estudis en el promotor del *PR-1* mostren elements reguladors negatius en *cis*, amb presència de caixes tipus “W-box”. Estudis en les línies *snl* amb aquestes caixes alterades indiquen que l’inhibició de l’expressió dels gens *PR* per part de SNI1 podria tenir lloc a partir de la interacció amb factors del tipus WRKY (Durrant i Dong, 2004).

Els candidats més probables com a reguladors de l’expressió de gens *PR* independents de NPR1 són la família de factors de transcripció Whirly (Why) (Desveaux *et al.*, 2004). En el cas del factor de transcripció **AtWhy1**, es coneix que la seva expressió és induïda per infecció i tractament amb SA, i que aquesta expressió induïda és ahora independent de NPR1 (Desveaux *et al.*, 2004). AtWhy1 es necessita per la inducció via SA de la expressió del gen *PR1* (Desveaux *et al.*, 2004). Junts, aquests resultats suggereixen que AtWhy1 forma part de la via de senyalització dependent de SA i independent de NPR1, i que les dues branques de la via, la dependent de NPR1 i la independent de NPR1, contribueixen a l’expressió induïda per SA del gen *PR1*.

Un altre possible component regulador de SAR inclou la **DTH9** (DETACHMENT 9), els mutants de la qual presenten susceptibilitat incrementada a patògens virulents, alts nivells de SA i són incapaçs d’activar SAR. Aquesta proteïna estaria situada per sota del SA en una via de senyalització paral·lela a la NPR1 que contribueix també en la SAR. És interessant destacar que, els mutants *dth9* presenten també insensibilitat a tractament amb auxines, indicant que aquestes fitohormones poden jugar un paper en la defensa de la planta (Durrant i Dong, 2004).

3.3.5 Cost biològic de la SAR

Sovint, s’ha suggerit que la resistència a patògens està associada a costos en el desenvolupament de la planta (*fitness*). Així, sembla que les plantes han evolucionat cap a mecanismes induïbles de defensa, ja que tenint-les activades constantment té un preu biològic massa gran (Brown, 2002; Heil i Baldwin, 2002; Heil, 2002, Durrant i Dong, 2004). El fenotip dels mutants amb expressió constitutiva de gens *PR*, acumulació de SA i resistència a patògens, dóna suport a aquesta idea. Aquests mutants sovint presenten un tamany de la planta reduït, pèrdua de dominància apical, fulles corbades, menys fertilitat, etc..., tots ells trets relacionats amb una reducció de la eficiència biològica de la planta (Heil i Baldwin, 2002; Durrant i Dong, 2004).

En aquest sentit, estudis en blat en els que s’indueix la SAR mitjançant tractament amb l’anàleg del SA BTH, mostraven com les plantes crescudes en absència de patògens, presentaven una reducció de la biomassa amb menys panotxes i llavors (Heil *et al.*, 2000). Resultats similars han estat descrits en

INTRODUCCIÓ

Arabidopsis (Cipollini, 2002) i en els mutants d'expressió constitutiva de *PR-1: cpr1, cpr5, cpr6 i cepl* (*constitutive expresser of PR1*) (Durrant i Dong, 2004). Per altra banda, aquells mutants que no poden establir la SAR (com *nahG i nim1*), tenen una millor producció de llavors (Cipollini, 2002).

3.4 Regulació i interconnexió de les diferents vies de senyalització

Les vies de senyalització de defensa estan intercomunicades i han de ser considerades com a diferents sectors d'una gran xarxa de senyalització. Estan arbitràriament classificades en respostes mediades per SA i respostes mediades per ET/JA. Les diferents respostes de defensa poden a més, interaccionar sinèrgica o antagònicament, a partir d'una regulació acurada davant l'exposició al patògen.

Els perfils d'expressió global en plantes d'Arabidopsis d'ecotip salvatge i varis mutants de senyalització SA-, JA- o ET-, infectats amb *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, revelen inter-comunicacions entre les vies de senyalització induïdes per les tres hormones (Glazebrook *et al.*, 2003, 2005). De totes maneres, s'ha generalitzat un model de resposta en funció del tipus de patògen amb el que interacciona la planta, ja siguin patògens del tipus biòtrof o necròtrof.

3.4.1 Patògens Biotròfics o Necrotròfics

Les plantes responen a la interacció amb el patògen de manera diferencial, segons les característiques biològiques d'aquest. Així, és molt important el tipus de desenvolupament que du a terme el patògen quan envaeix la planta. Per aquest motiu, els patògens de plantes són freqüentment dividits en **biotròfics** i **necrotròfics** segons el seu cicle biològic. Els organismes biotròfics s'alimenten de teixits hostes vius, mentre que les necrotròfics maten el teixit hoste i s'alimenten de les restes. Altres patògens però, poden ser biotròfics o necrotròfics depenent de les condicions en que es troben o bé depenent de l'estat del cicle de vida, i són coneguts com a **hemi-biotròfics**. *Magnaporthe grisea* és un exemple de patògen hemi-biotròfic, biòtrof en els primers estadis de la infecció i necrotròfic després.

En el cas dels patògens biotròfics, és fàcil imaginar que la resistència mediada per gens *R* i la senyalització per SA, pot provocar-ne la resistència en la planta hoste. La resposta HR pot limitar a aquests patògens la seva font d'aliment. Mentre que en el cas dels necrotròfics, sembla que la mort cel·lular programada en l'hoste podria inclús facilitar-ne el seu desenvolupament. Aquestes observacions porten a suggerir que, de manera general, els patògens biotròfics són més sensibles a les respostes mediades per SA, mentre que els patògens usualment necrotròfics i els insectes herbívors ho

són amb defenses mediades per JA/ET (Thomma *et al.*, 1998; Ton *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005).

Aquesta idea, tot i que generalment és acceptada, resulta en realitat molt més complexa. Així, podem trobar casos en que, tot i que s'estimuli preferentment una de les vies de senyalització, l'activació de l'altre resulti en un increment en el nivell de resistència.

3.4.2 La intercomunicació entre les vies de defensa

La intercomunicació entre les diferents vies de defensa que la planta pot activar front agressions externes, proporciona un sistema de regulació que permet un control fi de les seves respostes de defensa dependent de l'atacant.

Les vies de defensa dependents de SA, JA i ET es creuen i es regulen mutuament de manera positiva o negativa. En aquest sentit, es coneix que l'activació de la SAR suprimeix la senyalització de JA en plantes, prioritzant així la resistència dependent de SA per sobre la defensa dependent de JA, i s'ha comprovat que el SA és un potent supressor de l'expressió gènica induïble per JA (Pieterse *et al.*, 2001). També s'ha vist que l'efecte antagònic del SA sobre l'expressió de gens que responen a JA, està regulat negativament per NPR1 quan aquesta es troba activada pel SA. La localització nuclear de NPR1 mediada per SA, no és necessària per a bloquejar l'expressió induïda per JA de la defensina PDF1.2 (marcador típic de la senyalització per JA) (Spoel *et al.*, 2003). Així, en contra de la seva funció nuclear en l'activació dependent de SA de gens *PRs*, la NPR1 afecta negativament la resposta a JA a través d'una funció citosòlica (Beckers i Spoel, 2006) (**Figura 16**). Tot i que el seu mode d'acció no està clar, s'especula que interfereix amb el complex ubiquitina-ligasa SCF^{COI1}, que regula l'expressió gènica en resposta a JA mitjançant una ubiquitinització dirigida, i la subseqüent degradació mediada per proteosoma d'un hipotètic regulador negatiu de la senyalització de JA (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002).

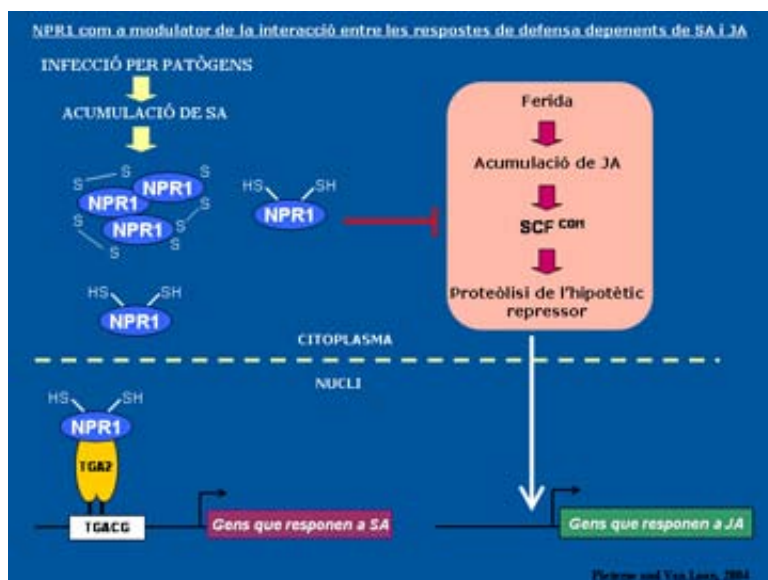


Figura 16. Model proposat per a la NPR1 citosòlica com a proteïna moduladora de les vies de resposta de defensa dependents de SA i JA. La infecció per part d'un patògen provoca una acumulació de SA i la conseqüent activació de la NPR1. La NPR1 activada (forma monomèrica), és translocada al nucli on interacciona amb determinats factors de transcripció del tipus TGA, induïnt en últim terme l'expressió de gens PR. Per altra banda, la ferida causada per insectes

herbívors provoca una acumulació de JA. Un possible repressor de l'expressió de gens de resposta a JA, és degradat mitjançant el complex SCF^{CO11} lligat a ubiquitina, que dirigeix les proteïnes al proteosoma. L'eliminació del possible repressor provoca una activació dels gens de resposta a JA. La inhibició de la senyalització de JA mediada per SA està regulada per la funció de la NPR1 citosòlica, tot i que el seu mecanisme roman encara desconegut.

També, s'han identificat altres elements clau addicionals involucrats en la interconnexió de les vies de senyalització. Per exemple, el factor de transcripció d'Arabidopsis WRKY70, que també es requereix per l'expressió de la PR1 en resposta a infecció. L'expressió de WRKY70 és induïble per SA i dependent de NPR1, però no s'han descrit interaccions directes entre WRKY70 i NPR1. A més, aquest factor de transcripció, actua també com a repressor dels gens induïts per JA, integrant per tant senyals d'aquestes dos vies antagòniques (Li *et al.*, 2004).

Per contra, el JA també pot ser un inhibidor de la senyalització dependent de SA (Kloek *et al.*, 2001). Recentment s'ha vist que la infecció per un patògen bacterià virulent indueix una susceptibilitat sistèmica a un subseqüent atac. Aquest efecte ha estat atribuït a la inhibició de la senyalització per SA, provocada per la coronatina, un anàleg del JA produït pel patògen (Cui *et al.*, 2005).

Cal destacar, però, que els exemples exposats no representen exclusivament la interacció entre les vies de senyalització de SA i JA, ja que la defensa contra els insectes pot involucrar altres molècules senyalitzadores, a més del JA (Felton i Korth, 2000, Raymond *et al.*, 2000; Kessler i Baldwin, 2002). D'acord amb això, el SA o d'altres anàlegs no afecten a la resistència a tots els herbívors en les interaccions planta-insecte estudiades (Thaler *et al.*, 2002).

3.5 ISR (Resistència Sistèmica Induïda)

La Resistència Sistèmica induïda (ISR), es desencadena per bacterïes no-patogèniques que colonitzen les arrels i confereix resistència a les parts aèries de les plantes (Pieterse *et al.*, 1996). El JA i ET són molècules senyalitzadores funcionals en la resposta ISR (Pieterse *et al.*, 1998). Així, la ISR està bloquejada en mutants *jar1* (*jasmonic acid resistant 1*), *coi1* (*coronatine insensitive 1*) i *etr1* (*ethylene resistant 1*).

Es pensa que les vies de senyalització de la SAR i la ISR convergeixen en algun punt per sobre de la NPR1, i que ambdós tipus de resistència induïda resulten en l'activació de diferents sets de gens de defensa (van Wees *et al.*, 1999; Verhagen *et al.*, 2004) (**Figura 17**). Per tant, la NPR1 és també un important regulador de la ISR i ho fa en un punt per sota del JAR1 i ETR1 en aquesta via (Pieterse *et al.*, 1998). Per altra banda, la inducció simultània de la ISR i la SAR resulta en un efecte additiu en el nivell de resistència davant patògens mostrant per tant que la NPR1 és capaç de funcionar simultàniament en ambdues respostes (Durrant i Dong, 2004).

La SAR i la ISR són, però, vies independents encara que tenen requeriments solapats de la NPR1 (van Wees *et al.*, 2000). La ISR s'inicia a les arrels, mentre que la SAR ho fa a les fulles, suggerint que ambdues respostes no han de competir per aquesta proteïna. La SAR i la resistència mediada per JA no són però independents, podent competir per NPR1 a les fulles. Quan s'aplica conjuntament SA i JA a les fulles, la presència de SA inhibeix la síntesi de JA i la seva senyalització.

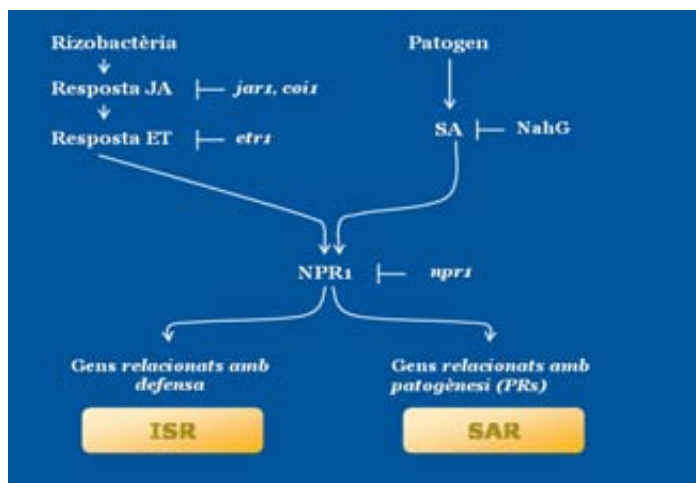


Figura 17. Vies de mutants d'Arabidopsis en relació a les respostes ISR i SAR (van Loon *et al.*, 2006). Mutants de les vies de SA: *NahG* (*salicylate hydroxylase*) i *npr1* (*nonexpressor of pr genes 1*); mutants de les vies de JA: *jar1* (*jasmonic acid resistant 1*) i *coi1* (*coronatine insensitive 1*); mutants de la percepció de ET: *etr1* (*ethylene resistant 1*).

3.6 Silenciament gènic com a resposta de defensa front virus

El silenciament gènic mediat per RNA (**RNA silencing**) es refereix a una sèrie de processos mediat per RNAs, que tenen com a resultat una inhibició de l'expressió gènica altament específica de seqüència. Aquests processos engloben: 1) formació d'una cadena doble de RNA (dsRNA, *double-strand RNA*), 2) processament del dsRNA a fragments de 20-26 nucleòtids, 3) el reconeixement d'una molècula petita de RNA (sRNA, *small RNA*) de la seva seqüència complementària en RNA o DNA (diana), i 4) la unió d'efectors que actuen sobre el RNA o DNA diana. En plantes, s'han descrit fins al moment diferents funcions biològiques dirigides per sRNAs, com són la regulació de l'expressió gènica endògena, el control de transposons, i la defensa front virus (Brodersen i Voinnet, 2006).

Tot i que existeixen diferents mecanismes que poden generar dsRNA, els sRNA i els diferents efectors implicats en aquest procés comparteixen una sèrie d'elements. Així, els sRNA de doble cadena són produïts per enzims del tipus RNAsa III anomenades DICER. Una de les dues cadenes del sRNA s'uneix a complexos efectors anomenats RISCs (*RNA-induced silencing complexes*), que dirigeixen la degradació dels RNAs diana (**Figura 18**).

Els transgens, poden iniciar una via d'activació de la maquinària de silenciament gènic que porta al processament dels propis transcrits. En aquest sentit, el silenciament gènic post-transcripcional (PTGS, *Post Transcriptional Gene Silencing*) va ser descrit per primera vegada en plantes transgèniques de Petúnia, mostrant-se com una pèrdua de l'expressió de transgens. Així, alguns transgens poden produir directament dsRNAs com a conseqüència d'integracions imperfectes, incloent la superposició de seqüències de sentit oposat ("*sense-antisense*"). En últim terme aquests processos han posat la base dels estudis sobre el RNA d'interferència (iRNA, *interfering RNA*) en plantes, incloent una classe de sRNA anomenats petits RNAs d'interferència (siRNA, *short interfering RNA*). Els siRNAs, de 21 nucleòtids de longitud, actuarien dirigint el processament del mRNA, mentre que els siRNAs de 24 pb podrien actuar mitjançant modificacions de la cromatina (Hamilton *et al.*, 2002).

Pel que fa les vies endògenes de silenciament gènic mediat per RNA, com a mecanisme de regulació post-transcripcional, cal destacar la regulació mediada pels micro RNAs (miRNA). Es tracta de RNAs de cadena simple (20-24 nucleòtids), produïts a partir de transcrits endògens no codificants, els quals actuen en *trans* sobre transcrits diana per induir la seva degradació, o bloquejar la seva traducció (Bartel, 2004). Els miRNA són molt importants per a diferents processos biològics del desenvolupament, i possiblement també en l'adaptació de les plantes a diferents condicions ambientals (estímuls biòtics i abiòtics) (Bartel, 2004).

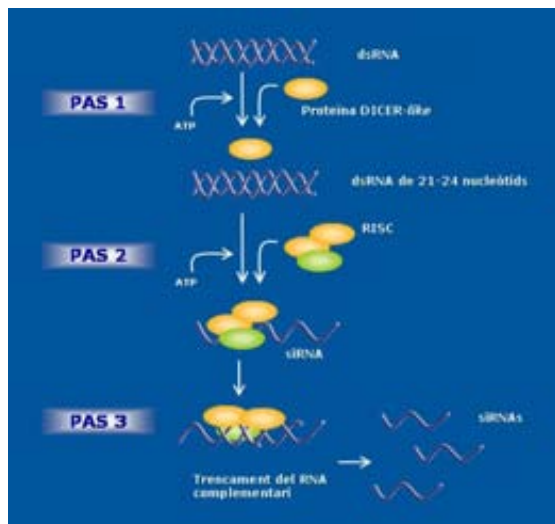


Figura 18. El mecanisme de silenciament en plantes. Precursors llargs de dsRNA són processats mitjançant una endonucleasa DICER (ribonucleasa tipus-III) en dúplexs de 21-24 nucleòtids en un pas ATP-dependent. En un altre pas dependent d'ATP, els siRNA es deslliguen, probablement mitjançant una DEAD-box RNA helicasa, i esdevenen RNAs de cadena simple. Després, aquest complex ribonucleoproteic es reorganitza en un complex de silenciament induït per RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*). El complex RISC s'uneix a RNAs complementàries de doble cadena i els trenca (Meister i Tuschl, 2004).

Durant dècades, s'ha observat l'efecte pel qual, plantes malaltes infectades per un determinat virus, desenvolupen fulles noves sense símptomes. De fet, també s'ha vist que en aquests casos, el mateix virus no és capaç d'infectar les fulles superiors sanes d'aquestes plantes. Aquest fenomen va ser descrit, inicialment, com a "recuperació", sorgint més endavant el silenciament per RNA com el mecanisme responsable de aquets fenòmens (Hamilton i Baulcombe, 1999; Baulcombe, 2004).

Molts virus de plantes (59 dels 80 gèneres) són virus de RNA (Hull, 2002). Aquests virus codifiquen **RNA polimerases dependents de RNA (RdRPs)** que, en els primers passos de la replicació, produeixen una còpia, en sentit oposat, del genoma viral (Hull, 2002). Aquest fet genera cadenes de dsRNA més llargues, que podrien provocar el silenciament per RNA (Waterhouse *et al.*, 1998; Dalmay *et al.*, 2000). Així doncs, el RNA de cadena doble (dsRNA) és l'activador del **silenciament** (Meister i Tuschl, 2004). Un cop formats els siRNAs, es transporten cèl·lula a cèl·lula, probablement a través dels plasmodesmes (Mlotshwa *et al.*, 2002). Els siRNAs són transportats pel floema i poden activar el silenciament per tota la planta (Yoo *et al.*, 2004).

Nous recolzaments sobre la funció del silenciament gènic mediat per RNA com a mecanisme antiviral, provenen de l'evolució de proteïnes virals que suprimeixen el silenciament (supressors del silenciament). Aquestes proteïnes inhibeixen diferents passos en la via del silenciament (Chapman *et al.*, 2004), indicant una possible convergència evolutiva dels supressors. Hi ha supressors que s'uneixen fortament als siRNA de doble cadena, aconseguint així potser segrestar-los del complex de silenciament RISC. Per altra banda, els supressors virals semblen afectar no només a la via dels siRNA sinó també a la de microRNAs (Soosaar *et al.*, 2005).

Sembla també, que les plantes podrien haver desenvolupat un sistema que permet la comunicació entre les vies de silenciament i la resposta mediada per gens *R*, per combatre de manera efectiva la infecció viral. La mateixa proteïna viral pot funcionar com a supressor del silenciament per RNA i com a

INTRODUCCIÓ

determinant *Avr* en la defensa per gens *R* (Qu *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). Hi ha evidències que suggereixen que hi ha només una interacció limitada entre aquestes dues importants vies de defensa.

Cal dir finalment, que els virus de plantes representen un dels problemes principals per l'agricultura i que el seu control biològic roman encara sense resoldre. Les estratègies originalment desenvolupades per a la protecció front a virus en plantes transgèniques s'han basat en la introducció en la planta de seqüències virals (PDR, *Pathogen Derived Resistance*), per exemple, l'expressió de gens que codifiquen proteïnes de la càpside. Així, un coneixement més profund dels processos explicats anteriorment, i el descobriment de noves resistències, tant naturals com obtinudes per enginyeria genètica, podrien ser emprades per la millora de la protecció de cultius front virus.

4 RESPOSTA DEFENSIVA FRONT INSECTES HERBÍVORS

Les plantes i els insectes coexisteixen des de fa 350 milions d'anys (si s'inclouen les formes primerenques de plantes terrestres i insectes) i han desenvolupat una sèrie de relacions que afecten als organismes en tots els nivells, des de la seva base bioquímica fins a la genètica de poblacions. Tot i que, algunes de les relacions entre ells són mútuament beneficioses (com la pol·linització), les interaccions més típiques inclouen la predació dels insectes sobre les plantes i la defensa de les plantes front aquests tipus d'herbívors (Gatehouse, 2002).

En base a la seva llarga relació en el temps, no es d'estranyar, que les estratègies que utilitzen les plantes per resistir o evitar l'atac dels insectes, siguin molt diverses. Algunes espècies acumulen elevats nivells de components amb funcions bioquímiques de defensa front insectes, bé per la seva toxicitat o bé per les seves propietats físiques. Altres plantes minimitzen el dany provocat per l'herbívor, mitjançant un ràpid creixement i desenvolupament, dispersió o elecció d'hàbitat. Fins i tot, dintre d'una mateixa espècie vegetal, diferents genotips adopten estratègies subtilment diferents per coexistir amb els insectes plaga, les quals poden afectar al repartiment de recursos entre creixement i defensa (Jander *et al.*, 2001). A part d'aquesta diversitat, també és cert que existeixen uns mecanismes de defensa induïts i que són comú a les plantes. Aquests mecanismes operen també en espècies com *Arabidopsis*, que té nivells baixos de defensa constitutiva i que actua més evadint als insectes que defensant-se d'ells. Els mecanismes de resposta induïts són efectius front una gran varietat d'insectes herbívors en una determinada espècie vegetal (Thaler *et al.*, 2001). Moltes de les respostes (però no totes) que s'observen en plantes front l'atac per herbívors, es presenten també en resposta a ferida o dany mecànic.

4.1 Compostos defensius i la resistència induïda front herbívors

En general, els mecanismes de defensa front herbívors, poden ser descrits com a pasius o constitutius, en contrast als mecanismes “actius” o induïts on la síntesi dels components defensius es dona en resposta a l'atac de l'insecte (Harborne, 1988). La defensa pot actuar en forma de barrera física (com la lignificació o la producció de resina), amb senyals bioquímiques que perceben els herbívors (com agents dissuasius de la ingesta, de la posta dels ous o atracció de predadors d'aquests) o bé com a toxines. El rang de mecanismes de toxicitat mostrat pels diferents components defensius de les plantes és molt ampli, incloent trencament de membranes, inhibició del metabolisme, o descontrol hormonal dels processos de desenvolupament del herbívor (Harbourne, 1988; Bennett i Wallsgrove, 1994).

Un exemple de compostos “insecticides” que presenten les plantes, són les **lectines**. Es tracta d'una classe de proteïnes que tenen com a mínim un domini no catalític que s'uneix específicament i de manera reversible a mono- o oligosacàrids. Les lectines estan àmpliament distribuïdes en la natura i han estat aïllades de centenars de plantes, virus, bacteries, invertebrats i vertebrats, incloent mamífers. Les lectines de diferents organismes presenten molt poca, o cap, similitud. Les llavors, especialment les de lleguminoses, són una rica font de lectines. Vàries lectines vegetals han mostrat tenir efectes entomotòxics per coleòpters, lepidòpters i homòpters. S'ha demostrat que algunes lectines s'uneixen a la membrana de les cèl·lules epitelials del intestí dels insectes. Un altre possible efecte tòxic es produeix per la unió de les lectines a enzims digestius glicosilats. Tot i així, el mecanisme precís d'acció de les lectines en insectes encara no està clar.

Per una altra part, els mecanismes “actius” o induïts de defensa front insectes herbívors, van ser inicialment concebuts com a proteïnes que poden actuar per si mateixos com a toxines, o bé que interfereixen en el metabolisme del insecte plaga (Ryan, 1978).

Els mecanismes de defensa induïts estan involucrats normalment en la resposta de plantes a espècies d'insectes on la interacció entre l'hoste i l'herbívor és de parcial o total susceptibilitat. El exemple més conegut de resposta induïda per ferida a la planta, és la síntesi **d'inhibidors de proteases** a les fulles de patata (*Solanum tuberosum*) o tomàquet (*Lycopersicon esculentum*), en resposta a l'atac per part d'insectes lepidòpters (Ryan, 1978). La producció d'inhibidors de proteases no és suficient per aconseguir una resistència total a la planta front l'atac, però provoca una reducció en el creixement o desenvolupament del insecte (Howe *et al.*, 1996). La defensa “activa” contra herbívora, i en particular la producció d'inhibidors de proteases, involucra inducció sistèmica. La resposta sistèmica pot provocar la producció dels mateixos components defensius que la resposta local, però difereix en la cinètica de producció, i normalment els mecanismes concrets que regulen la seva expressió poden ser diferents.

INTRODUCCIÓ

Malgrat la distinció entre defensa constitutiva i induïda, quan s'analitzen aquests sistemes a nivell molecular, s'observa que els productes finals d'ambdós mecanismes (els components defensius en si mateixos) tenen elements comuns. Així, els inhibidors de proteases que es sintetitzen com a part de les respostes de defensa induïda s'acumulen també en la defensa constitutiva (García-Olmedo *et al.*, 1987; van Dam *et al.*, 2001). Per altre banda, sembla clar que la producció de components defensius provenint del metabolisme secundari, pot formar part de la resposta induïda. En aquest sentit, s'ha demostrat la inducció de l'expressió de gens que codifiquen enzims involucrats en la biosíntesi de components defensius constitutius que poden estar regulats positivament per insectes herbívors (Litvak i Monson, 1998; Schmez *et al.*, 1999; Bartlet *et al.*, 1999; Halitschke *et al.*, 2000; Ohnmeiss i Baldwin, 2000) i per ferida (Gijzen *et al.*, 1991; Bohlmann *et al.*, 1997, 1998).

L'enzim polifenol oxidasa (PPO) de plantes, ha estat identificat com a component amb activitat insecticida, podent conjuguar compostos fenòlics amb proteïnes de la dieta, disminuint així la seva digestibilitat. No obstant, s'han caracteritzat recentment els mecanismes pels quals les larves de lepidòpters poden superar els efectes dels fenòlics oxidats de la dieta, que consisteixen en el manteniment de condicions reduïdes als seus intestins.

4.2 Els Inhibidors de Proteases

4.2.1 Generalitats dels inhibidors de proteases

Els **inhibidors de proteases** han estat trobats en nombrosos teixits i fluids animals, en molts teixits vegetals (particularment, en llavors de llegums i òrgans d'emmagatzematge) i en microorganismes. La seva existència va ser descrita per primer cop per Fermi i Pernossi (1894) com una activitat "anti-tripsina" en sèrum. De totes maneres, els primers inhibidors de proteases no es van caracteritzar fins el treball pioner de M. Kunitz (Kunitz i Northrop, 1936; Kunitz, 1945; 1946; 1947a; 1947b; resumit en Birk, 2003). Des d'aleshores, els inhibidors de proteases han estat objecte d'investigació en moltes disciplines, tant per l'estudi com a sistemes models per esbrinar la funció de les proteases, com per estudis d'interacció proteïna-proteïna. Per altre banda, més recentment han atret l'atenció de nutricionistes donada la seva presència en vegetals de gran importància en alimentació, com els llegums. A més, s'ha trobat que els inhibidors de proteases poden actuar en la prevenció de la tumorogènesi, contribuint juntament amb el seu valor nutricional, a esdevenir bons candidats per a l'aplicació clínica.

En els últims anys s'ha incrementat l'interès cap als inhibidors de proteases donat el fet que les proteases exerceixen un gran nombre de funcions en l'organisme. Els processos proteolítics estan

involucrats en el processament de proteïnes a partir de precursors i polipèptids, per tal d'esdevenir biològicament i farmacològicament actius (proenzims, hormones). De totes maneres, moltes facetes d'aquestes proteïnes romanen encara desconegudes.

Els inhibidors de proteases de plantes són molt diversos en quant a nombre i especificitat front els diferents enzims proteolítics. Diferents tipus d'inhibidors de proteases poden estar presents en un mateix teixit, com succeeix en soja, grans d'ordi i tubercle de patata.

Els centenars d'inhibidors de proteases de plantes coneguts es distribueixen entre diferents famílies botàniques (Liener i Kakade, 1980). La majoria però, pertanyen a tres famílies: lleguminoses, solanàcies i gramínies (Richardson, 1991). El pes molecular dels inhibidors de proteases és en general baix, entre 3 i 52 KDa. El significat biològic dels inhibidors de proteases ha estat qüestionat durant molt temps. El fet que algunes llavors continguin inhibidors de proteases que inhibeixen proteases digestives de larves d'alguns insectes (reduint l'assimilació d'aminoàcids necessaris pel creixement i desenvolupament de les larves), és un indicador de que la producció d'aquestes proteïnes podria haver evolucionat com a mecanisme de defensa front insectes depredadors. Els inhibidors de proteases vegetals també poden presentar activitat defensiva contra nemàtodes (Williamson i Hussey, 1996).

Malgrat que els inhibidors de proteases s'acumulen de manera constitutiva en llavor, també s'ha vist que les plantes indueixen l'expressió d'aquests gens en resposta a l'atac d'insectes en teixits vegetatius (Koiwa *et al.*, 1997).

Els inhibidors de proteases de plantes es classifiquen segons el tipus de proteases que inhibeixen, el lloc reactiu, i en base a la seva seqüència aminoacídica. Recentment s'ha establert també una classificació seguint criteris d'homologia estructural.

Taula III. Famílies d'inhibidors de proteases descrites en plantes

<i>Família</i>¹	<i>Família</i>²	<i>Codi</i>
Inhibidors de serina proteases	Inhibidors Bowman-Birk	BBI
	Inhibidors tripsina/ α -amilasa de cereals	BRI
	Inhibidors tripsina de soja (Kunitz)	KNI
	Inhibidors tripsina de mostassa	MSI
	Inhibidors de patata de tipus I	PI-1
	Inhibidors de patata de tipus II	PI-2
	Inhibidors de carbassa	SQI
	Serpines	SPI
Inhibidors de cisteïna proteases	Inhibidors de cisteïna proteases	CPI
Inhibidors d'aspàrtic proteases	Inhibidors d'aspàrtic proteases	API
Inhibidors de metal-loproteases	Inhibidors de metal-loproteases	MCPI

¹. Famílies d'Inhibidors de proteases segons el mecanisme catalític i la proteasa inhibida (Ryan, 1990)

². Famílies d'Inhibidors de proteases segons la seva estructura primària (DeLeo *et al.*, 2002)

INTRODUCCIÓ

Existeix una base de dades que agrupa i classifica els inhibidors de proteases en, momentàniament, un total de 56 famílies: MEROPS (Rawlings i Barrett, 2000) (www.merops.sanger.ac.uk) (Descrit més àmpliament a l'**Apartat 5, Proteases**). Així, en aquesta base de dades, es defineix família com a un grup de inhibidors de proteases homòlegs. La homologia es mostra per similitud significativa en la seqüència aminoacídica, de manera que cada família pot contenir un únic inhibidor, si no hi ha cap homòleg conegut. De la mateixa manera, el producte d'un únic gen pot tenir diferents dominis inhibidors assignats a diferents famílies. Cada família d'inhibidors té un identificador format a partir de la lletra "I" i un únic número, podent estar dividida en subfamílies quan hi ha evidències d'una divergència molt antiga (Rawlings *et al.*, 2004).

De tots els inhibidors de proteases, són els de Serina proteases els que han estat més àmpliament estudiats. Es tracta d'inhibidors competitius, capaços de formar complexos molt estables amb els enzims que han d'inhibir ($K_{\text{assoc.}} = 10^8\text{-}10^{13} \text{ M}^{-1}$). Aquest tipus d'inhibidors posseeixen en la seva estructura un bucle que exposa el centre reactiu introduint-se a la cavitat on es troba el centre actiu de la proteasa, recreant el mode d'acció del substrat i bloquejant d'aquesta manera el centre catalític de la serina proteasa a la que inhibeixen (Laskowski i Kato, 1980). Es defineix **centre reactiu** com aquella part de la molècula de l'inhibidor que interactua directament amb el **centre actiu** de l'enzim. És en aquest centre reactiu on es troba el residu P1 de l'inhibidor, que és específicament reconegut pel lloc d'unió de la proteasa diana (Schechter i Berger, 1967). Adjacent al residu P1 trobem el residu P1', i és l'enllaç peptídic que uneix aquests dos aminoàcids (enllaç del centre reactiu) el que és susceptible a ser hidrolitzat durant la formació del complex enzim-inhibidor (Laskowski, 1976).

El residu P1 de l'inhibidor, determina el tipus específic de proteasa que inhibeix, mentre que altres residus propers al centre reactiu també tenen un paper important per determinar la força de la interacció inhibidor-proteasa (DeLeo i Galeani, 2002) (**Figura 19**).

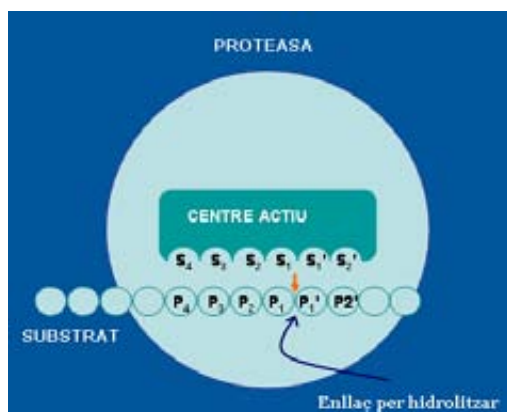


Figura 19. Esquema del centre actiu d'una endoproteasa amb el seu substrat. S'indica la nomenclatura dels aminoàcids localitzats al centre actiu de la proteasa.

4.2.2 Classificació dels inhibidors de proteases

Donada la complexitat de la classificació actualment utilitzada, i per tal de facilitar-ne la explicació, es descriuen a continuació les diferents famílies de inhibidors de proteases segons la classificació de Lawkiwski i Kato, basada en el mecanisme catalític de la proteasa a la que inhibeixen.

Inhibidors de serina proteases

Els inhibidors de serina proteases estan àmpliament dispersos i són els més abundants en plantes, on s'acumulen en els teixits de reserva (tubercle, llavors, ..).

Entre els seus rols fisiològics, es troba la regulació de l'activitat de proteases endògenes durant la dormància de la llavor, la mobilització de proteïnes de reserva i la protecció front proteases de paràsits i insectes. A més, poden actuar també com a proteïnes de reserva.

Els inhibidors de serina proteases, els més abundants són els inhibidors de tripsinas i quimotripsines; molts d'ells, són a més bifuncionals podent inhibir dues d'aquestes activitats. Els inhibidors d'elastasa són, amb diferència, els menys abundants i menys caracteritzats dels Inhibidors de proteases de plantes.

L'inhibidor de blat de moro, MPI, objecte d'estudi d'aquest treball, pertany a aquest grup d'inhibidors de proteases (veure **Apartat 4.2.6**). Gens que codifiquen inhibidors de serina proteases han estat utilitzats àmpliament per la protecció de plantes front insectes lepidòpters.

Inhibidors de cisteïna proteases

Els inhibidors de cisteïna proteases, són el segon grup d'inhibidors més estudiats, actuen inhibint proteases de la superfamília de la papaïna, així com les cathepsines B, H i L d'animals (Koiwa *et al.*, 1997), bloquejant l'accés del substrat al centre catalític de la proteasa, sense que es doni una interacció directe dels residus catalítics (Bode i Huber, 2000). Dins d'aquest grup destaquen els inhibidors identificats en arròs, anomenats **oryzacistatines** (OC-I i OC-II).

Els estudis realitzats en plantes transgèniques per inhibidors de cisteïna proteases s'han centrat principalment en el seu efecte en insectes coleòpters, demostrant que afecten el seu desenvolupament (Orr *et al.*, 1994; Leple *et al.*, 1995; Pannetier *et al.*, 1997).

Inhibidors d'aspàrtic proteases

Els inhibidors d'aspàrtic proteases actuen inhibint activitats del tipus cathepsina D, i han estat descrits en diverses espècies de plantes com, tomàquet, veça, card o patata (Herbers *et al.*, 1994). En tubercles de patata s'ha aïllat un inhibidor d'aspàrtic proteases inusual, per què, a part de la cathepsina D, també és capaç d'inhibir activitats tripsina i quimotripsina (Mares *et al.*, 1989).

Inhibidors de metal·loproteases

En plantes han estat identificats inhibidors de metal·loproteases en patata (**PCI, *Potato Carboxypeptidase Inhibitor***) i en tomàquet (**MCPI, *MetalloCarboxyProtease Inhibitor***) (Rancour i Ryan, 1968; Graham i Ryan, 1981), ambdós inhibidors són proteïnes petites, amb un pes molecular aproximat de 4 kDa. L'inhibidor de patata, PCI, objecte d'estudi d'aquest treball, pertany al grup dels inhibidors de carboxipeptidases (veure ***Apartat 4.2.7***).

4.2.3 Els inhibidors de proteases i els insectes

Són molts els estudis que s'han dut a terme per avaluar la toxicitat dels inhibidors de proteases front les grans plagues agronòmiques (*Heliothis, Spodoptera, Sesamia, Tribolium, ...*). La major part dels inhibidors de proteases amb rellevant capacitat defensiva són inhibidors de serina i cisteïna proteases. Els lepidòpters, himenòpters, ortòpters i dípters presenten principalment serina proteases en els seus sistemes digestius, mentre que els coleòpters i hemípters utilitzen majoritàriament cisteïna proteases (Ryan, 1990; Wolfson & Murdock, 1990; Murdock et al., 1987) (veure ***Apartat 5.2***). Molts membres de l'ordre dels coleòpters, que són plagues importants de cultius d'interès agronòmic, utilitzen majoritàriament proteases del tipus cisteïna (Murdock *et al.*, 1987) (veure ***Apartat 5.2***). A més, aquests insectes són capaços de consumir grans quantitats de teixits vegetals que contenen altes concentracions de inhibidors de serina proteases, sense efectes adversos en la seva digestió. Per altra banda, existeix molt poca informació sobre inhibidors d'aspàrtic o metal·loproteases, i el seu efecte en els insectes.

La presència, en plantes, de inhibidors de proteases amb capacitat per afectar el desenvolupament en certs insectes, i el fet que l'atac per aquests herbívors estimula l'acumulació d'inhibidors en fulles, ha portat alguns grups a realitzar esforços per a la lluita contra les plagues amb la introducció de gens que codifiquen inhibidors de proteases en plantes transgèniques. L'objectiu d'aquests estudis, ha estat el d'aconseguir cultius resistents a plagues emprant els propis mecanismes naturals de protecció de les plantes, evitant l'ús de pesticides i els seus efectes no desitjats tant pel medi ambient com per la salut humana. Així, la utilització de gens derivats de plantes, que codifiquen lectines o inhibidors de proteases, es presenta com una alternativa a una de les estratègies més àmpliament aplicades els darrers anys per a la protecció front insectes plaga, l'ús de les endotoxines Bt de *Bacillus thuringiensis*.

En la **Taula IV** es presenten alguns exemples de plantes transgèniques que expressen gens d'inhibidors de proteases per les que s'ha testat la seva eficàcia front insectes plaga mitjançant bioassaigs .

Taula IV. Plantes transgèniques que expressen inhibidors de proteases com a estratègia de protecció front insectes plaga. Lep, Lepidòpters; Col, Coleòpters; Dip, Dípters; Ap, Afids o pugons; T, Tripsina; Q, Quimotripsina; C, Cisteïna proteasa; CpTI, *Cowpea Trypsin Inhibitor* (Inhibidor de Tripsines de faba); SPI, Inhibidor de Serina Proteases; Sa PIN II, Inhibidor de Patata II; Soybean kunitz Trypsin Inhibitor (Inhibidor de Tripsines de Soja); SBKTI, *Soybean Bowman-Birk Kunitz Trypsin Inhibitor* (soja); BTI, *Barley Trypsin Inhibitor* (ordi); OC, Oryzacistatina.

Inhibidor de proteases	Plantes transformades	Insecte	Efecte	Referència
CpTI (T)	Tabac	<i>Heliothis virescens</i> (Lep)	+	Hilder (1987)
		<i>Helicoverpa zea</i> (Lep)	+ (camp)	Hoffmann (1992)
	Patata	<i>Spodoptera litura</i> (Lep)		Sane (1997)
		<i>Lacanobia oleraceae</i> (Lep)	+	Gatehouse (1996)
	Maduixa	<i>Otiorynchus sulcatus</i> (Col)	+ (camp)	Graham (1997)
	Col	<i>Pieris rapae</i> (Lep)	+	Hao (1997); Fang (1997)
		<i>Helicoverpa armigera</i> (Lep)	+	Hao (1997)
	Moniato	<i>Euscepes postfaciatus</i> (Col)	+	Golmirzaie (1997)
	Arròs	<i>Chilo suppressalis</i> (Lep)	+ (camp)	Xu (1996)
		<i>S. infestans</i> (Lep)	+ (camp)	Xu (1996)
	Cotó	<i>Sesamia inferens</i> (Lep)		Gatehouse (1996)
	Blat	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lep)		Li (1998)
	Pigeon pea	<i>Sitotroga cerealla</i> (Lep)		Alpteter (1999)
		<i>Helicoverpa armigera</i> (Lep)		Lawrence (2001)
CpTI+ lectina	Moniato	<i>Cyclas formicarius</i> (Col)		Newel (1995)
SPI (T)	Tabac	<i>Spodoptera litura</i> (Lep)	+	Yeh (1997)
Inh. Patata I (Q)	Tabac	<i>Spodoptera litura</i> (Lep)	-	McManus (1994)
		<i>T. orichlea</i> (Lep)	-	McManus (1994)
		<i>C. eriosoma</i> (Lep)	+	McManus (1994)
Inh. Patata II (T/Q)	Tabac	<i>Manduca sexta</i> (Lep)	+	Johnson (1989)
		<i>Spodoptera exigua</i> (Lep)	-	Jongsma (1995)
	Arròs	<i>Sesamia inferens</i> (Lep)	+ (camp)	Duan (1996)
		<i>P. versicolor</i> (Col)	+	Klopfenstein (1997)
	Tomàquet	<i>Heliothis obsoleta</i> (Lep)		Abdeen (2005)
		<i>Liriomyza trifolii</i> (Dip)		Abdeen (2005)
Brassica	Diamond moth (polilla)		Winterer (2001)	
Sa PIN IIa	Enciam	<i>M. sexta</i> (Lep)		Xu (2004)
Inh. Tomàquet I (Q)	Tabac	<i>Manduca sexta</i> (Lep)	+	Johnson (1989); Narváez-Vasquez (1992)
		<i>Manduca sexta</i> (Lep)		Narváez-Vasquez (1992)
		<i>Manduca sexta</i> (Lep)		Narváez-Vasquez (1992)
Inh. Tomàquet II (Q)	Tabac	<i>Manduca sexta</i> (Lep)	+	Johnson (1989)
SBKTI (T)	Tabac	<i>H. virescens</i> (Lep)	+	Gatehouse (1993)
		<i>Helicoverpa armigera</i> (Lep)	-	Nandi (1999); Wu (1997)
		<i>Spodoptera litura</i> (Lep)	+	McManus (1999)
	Canya de sucre	<i>Dyatraea saccharalis</i> (Lep)	+	Falco (2003)
	Arròs	<i>Nilaparvata lugens</i> (Ho)	+	Lee (1999)
		<i>Heliothis armigera</i> (Lep)	+	Wang (1999)
	Patata	<i>Lacanobia oleracea</i> (Lep)	-	Gatehouse (1999)
		<i>Lymantria dispar</i> (Lep)	-	Confalonieri (1998)
	Populus nigra	<i>Clostera anastomosis</i> (Lep)	-	Confalonieri (1998)
	Ordi BTI (T)	Tabac	<i>Agrotis ipsilon</i> (Lep)	
<i>Spodoptera littoralis</i> (Lep)				
<i>Spodoptera exigua</i> (Lep)				Lara (2000)
Arròs		<i>S. oryzae</i> (Col)	+	Alfonso-Rubí (2003)
MPI (E/Q)	Arròs	<i>Chilo suppressalis</i> (Lep)	+	Vila <i>et al.</i> , 2005
Nicotiana glauca Pls (T/Q)	Tabac	<i>H. punctigera</i> (Lep)		Heath (1997)
	Pèsol	<i>Plutella xylostella</i> (Lep)		Charity (1999)
Arròs OC-I i OC-II (C)	Àlber (<i>Populus alba</i>)	<i>Chrtisomela tremulae</i> (Col)	+	Leple (1995)
		<i>Ceutorinchu assimilis</i> (Col)		Girard (1998)
	Colza	<i>Anthonomus grandis</i> (Col)		Pannetier (1997)
		<i>Diabrotica</i> (Col)		Orr (1994)
	Patata	<i>Myzus persicae</i> (Ap)		Gatehouse (1996)
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Col)	-	Cloutier (2000); Lecardonnel (1999)
	Oil seed rape	<i>Myzus persicae</i> (Ap)		Rahbé (2003)
		<i>Ceutorinchu assimilis</i> (Col)	-	Jouanin (1998)
CCI (C)	Arròs	<i>Sitophilus zeamays</i>		Ire (1995)
ATCI (C)	Àlber (<i>Populus alba</i>)	<i>Chrysomela populi</i> (Col)		Delledone (2001)
MTI II (T)	Tabac	<i>Spodoptera littoralis</i> (Lep)	+/-	De Leo i Gallerani (2002)
		<i>Lutella xylostella</i> (Lep)		De Leo (2001)
	Arabidopsis	<i>Mamestra brassicae</i> (Lep)		De Leo (2001)
		<i>Spodoptera littoralis</i> (Lep)		De Leo (2001)
Oil seed Rape				
PCI (M)	Tomàquet	<i>Heliothis obsoleta</i> (Lep)		Abdeen (2005)
		<i>Liriomyza trifolii</i> (Dip)		Abdeen (2005)
α amilasa I	Pèsol	<i>Bruchus pisorum</i> (Col)		Morton (2000)

4.2.4 Adaptació dels insectes als inhibidors de proteases

En base als seus hàbits alimentaris els insectes poden classificar-se en **herbívoros generalistes** (capaços de sobreviure en un ventall molt ampli d'espècies hostes), i **herbívoros especialistes** (únicament poden sobreviure d'un rang limitat d'hostes o, en casos extrems, d'una única espècie hoste). Un herbívor especialista pot adoptar mecanismes detoxificadors constitutius per protegir-se dels compostos defensius de la planta, el que suposa un considerable cost metabòlic. Els herbívoros especialistes, també presenten regulacions positives dels mecanismes detoxificadors "constitutius". Els herbívoros generalistes, han desenvolupat la seva habilitat per ser herbívors efectius d'un gran ventall d'espècies de plantes adaptant-s'hi mitjançant respostes induïdes (Bernays i Chapman, 2000).

L'estudi de les proteases presents en l'intestí d'espècies d'insectes plaga, ha revelat que aquests insectes poden adaptar-se als inhibidors de proteases produïts per les plantes que ataquen, de tal manera que aquests, no afecten el desenvolupament de les larves (Bown *et al.*, 1997 i Harsulkar *et al.*, 1999). El mecanisme pel qual les larves poden eludir els efectes dels inhibidors de proteases ha estat en alguns casos caracteritzat. Principalment es creu que la resposta a la presència dels inhibidors consisteix en la producció de noves proteases insensibles a aquests inhibidors (Broadway, 1995; Jongasma, *et al.*, 1995; Mazumdar-Leighton i Broadway, 2001; Volpicella *et al.*, 2003) o bé mitjançant la degradació de l'inhibidor per proteases de l'insecte (Michaud *et al.*, 1995; Giri *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 1998a), sistemes que permeten a la larva el seu desenvolupament normal. Cal destacar que, l'especificitat de l'inhibidor de proteases per una proteasa no es deu només als aminoàcids que ocupen els respectius centres reactiu i actiu, sinó que el reconeixement inhibidor-proteasa, es basa també en els diferents aminoàcids que es troben situats al voltant del centre actiu, que determinaran la força de la unió (Laskowski, 1985). Així, la presència d'un ampli nombre de subtipus de proteases en l'insecte podria explicar la ràpida adaptació d'alguns insectes a la ingesta d'inhibidors de proteases concrets, sobretot en el cas dels polífags que han evolucionat per evitar l'efecte de gran varietat d'inhibidors de proteases de plantes als que s'han vist confrontats.

Tant els lepidòpters com els coleòpters herbívors, són capaços d'adaptar-se als inhibidors de proteases de la dieta (Jongasma i Bolter, 1997) mitjançant la producció de proteases insensibles a l'inhibidor. Per exemple, s'ha descrit que les larves del lepidòpter i herbívor generalista *Helicoverpa armigera*, poden adaptar-se als inhibidors presents en les seves plantes hostes, però aquest fet es veu severament reduït quan es tracta de inhibidors de plantes no hostes (Harsulkar *et al.*, 1999).

Cal tenir en compte però, que el balanç en l'ecosistema natural és una situació diferent a la que hi ha en l'agricultura, on les plagues descontrolades d'insectes poden generar grans danys i pèrdues en els cultius. La gran densitat de possibles plantes hostes en l'agricultura intensiva suposa que l'adaptació dels insectes a les respostes de defensa del cultiu, tot i ser parcial, pot desencadenar en un increment

molt ràpid de la població plaga. Algunes plagues dels cultius són herbívors especialistes, originàriament dels progenitors salvatges de les espècies conreades, i per tant tenen adaptacions constitutives a les defenses dels cultius, tot i que generalment, les plagues d'insectes més greus són herbívors generalistes (Gatehouse, 2002).

L'obtenció de plantes transgèniques amb inhibidors de proteases és de gran interès perquè aquests formen part del sistema natural de defensa de la planta front insectes, i són fruit de la co-evolució sorgida com a conseqüència de les interaccions planta-insecte. En molts casos s'estaria reintroduint funcions que les varietats cultivades han perdut durant el seu procés de selecció des de les varietats salvatges. Tot i això, per poder dissenyar estratègies efectives per a la protecció front insectes-plaga de plantes transgèniques, és de vital importància estudiar i conèixer les característiques del sistema digestiu de l'insecte problema, així com l'especificitat de cada inhibidor sobre les proteases de l'insecte a combatre, com la combinació de dos o més inhibidors de proteases expressats en una mateixa planta.

4.2.5 Els inhibidors de proteases i els patògens

S'ha descrit la capacitat d'alguns inhibidors de proteases concrets per inhibir el creixement *in vitro* d'alguns fongs. Per exemple, són molt escassos els treballs publicats en aquest sentit. En el cas de Joshi i col·laboradors (1998) però, es demostra que l'inhibidor de cisteïna proteases de mill (*Panicum miliaceum*), proteïna de 24 kDa amb alt contingut de serines i glicines, és capaç d'inhibir el creixement del miceli i la germinació del fong *Trichoderma reesei* i altres fongs fitopàgens importants com *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* i *Fusarium* (Joshi *et al.*, 1998).

Terras i col·laboradors (1993), van descriure també un efecte sinèrgic de l'activitat antifúngica de tionines de blat i ordi per la presència tant de l'inhibidor de tripsina d'ordi i dues isoformes de l'inhibidor del tipus Bowman-Birk d'aquesta mateixa espècie. Aquests efectes es restringien a fongs filamentosos i alguns bacteris gram-positius.

Un dels treballs que va demostrar per primera vegada l'activitat antifúngica d'inhibidors de proteases vegetals, fou l'estudi d'uns inhibidors de col verda (*Brassica oleracea*) que presenten una activitat inhibidòria de tripsines i quimiopripsines. Es tracta de 4 proteïnes (12-25 kDa) molt estables en un rang ampli de temperatures (0-100°C) i pH (4.5-7.5), i que no tenen activitat quitinolítica o glucanasa. Es va avaluar l'efecte *in vitro* d'una barreja d'aquestes 4 proteïnes sobre el creixement de tres fongs fitopatogènics com són *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* i *Alternaria brassicola*, aquest darrer l'únic patògen dels tres que és específic de col verda. S'observà una inhibició de la germinació d'espores i l'elongació del tub germinal en els fongs *B.cinerea* i *F.solani*, principalment modificacions morfològiques com ramificacions curtes o recargolaments de les hifes. També presentaven secrecions

INTRODUCCIÓ

que semblen no procedir de la paret cel·lular, sinó que són d'origen citoplasmàtic, indicant que els inhibidors de proteases poden modificar les membranes o les parts cel·lulars de la hifa. Els inhibidors de proteases de col verda no mostraren, en canvi, cap efecte sobre el patògen *A. brassicola*, suggerint que hi ha una especificitat en les interaccions entre els inhibidors de proteases de plantes i els fongs (Lorito *et al.*, 1994). Per altra banda, s'ha descrit també l'efecte dels inhibidors de serina proteases en el procés de biosíntesi de quitina fúngica a través de la inhibició del processament del precursor de l'enzim quitina sintasa del fong (Adams *et al.*, 1993; Machida i Saito, 1993).

En un altre treball, es demostrà l'efecte antifúngic de la cistatina de castanyer capaç d'inhibir els fongs fitopatògens *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola* i *Septoria nodorum*, però no el fong sapròfit *Trichoderma viride* (Pernas *et al.*, 1999). Aquests resultats suggereixen que la cistatina de castanyer podria contribuir a la defensa de les plantes enfront fongs fitopatògens.

Per altra banda, entre els inhibidors de proteases de plantes descrits a la literatura, existeixen exemples d'inhibidors específics front proteases microbianes concretes, especialment de tripsines i quimotripsines. Tot i que en alguns casos també presenten activitat inhibidora total o parcial contra proteases animals, en d'altres han perdut activitat contra aquestes proteases (Valueva i Mosolov, 2004). Un exemple és el d'un inhibidor de mongeta, que es mostra actiu contra activitats del tipus tripsina/quimotripsina del fitopatògen *C. lindemithianum*, sense ser-ho contra aquests mateixos tipus d'enzims d'origen animal. En aquest cas a més, es coneix que altres inhibidors de mongeta que sí inhibeixen les proteases animals no són per contra, eficaces front les de *C. lindemithianum* (Valueva i Mosolov, 2004).

Aparentment, els inhibidors de proteases també poden jugar un paper important en les interaccions planta-virus. L'explicació es deu a que molts virus fitopatògens requereixen de cisteïna proteases per a dur a terme el seu cicle vital. En aquest sentit, la sobreexpressió de l'inhibidor de proteases oryzacistatin I en tabac, incrementa la seva resistència davant el virus del grabat (TEV) i el virus Y de patata (PVY), ambdós virus de la família dels potivirus (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999).

Tal i com succeeix amb els gens *PRs*, s'ha descrit la inducció de la expressió de gens d'inhibidors de proteases en resposta a infecció per patògens, per exemple inhibidors de serina proteases (tripsina i quimotripsina) de planta de patata i tomàquet, la expressió de la qual s'indueix per *P. infestans*. La expressió d'aquests tipus d'inhibidors també s'indueix en meló per infecció amb *Colletotrichum lagenarium*, mentre que l'inhibidor cistatin de castanyer ho fa per infecció de *B. cinerea* (Valueva i Mosolov, 2004).

Les **napines**, són proteïnes d'emmagatzemat riques en glutamines que també poden actuar com inhibidors de proteases i actuar produint canvis en la membrana del fong ja siguin soles o

sinèrgicament amb d'altres proteïnes antifúngiques que alteren les membranes d'aquests patògens (Svendsen, 1989; Terras, 1993; Neumann, 1996a,b; resumit a Wijaya, 2000).

En el nostre laboratori, l'expressió del gen que codifica l'inhibidor de blat de moro MPI, es troba induïda en teixits infectats per *Fusarium verticillioides* (sinònim *F. moniliforme*).

4.2.6 MPI, l'inhibidor de proteases de blat de moro

En el nostre laboratori s'ha aïllat, identificat i caracteritzat un gen que codifica per un inhibidor de proteases de blat de moro (*Zea mays*): el gen ***mpi*** (***Maize proteinase Inhibitor***) (Cordero, *et al.*, 1994). La seva seqüència aminoacídica deduïda presenta una gran homologia amb els membres de la família de l'inhibidor I de patata (Cordero *et al.*, 1994), formada per inhibidors de serina proteases, contra activitats del tipus quimotripsina. El residu P1 localitzat en el centre reactiu d'aquesta família d'inhibidors sol ser de metionina o leucina (residus Met/Leu₄₇-Asp₄₈) (Norton, 1991). Contràriament, la seqüència aminoacídica deduïda del MPI, mostra la presència del residu Ala (P1) en la posició corresponent del centre reactiu de la proteïna MPI. En la **Figura 20** es mostra la seqüència aminoacídica de MPI en comparació amb les d'altres inhibidors de la família de l'Inhibidor I de patata.



Figura 20. Alineament de la seqüència aminoacídica del gen *mpi* junt amb altres inhibidors de la família de l'inhibidor I de patata. CI-1B i CI-2A, inhibidors de tripsina d'ordi; PI-I, inhibidor de patata I; TI-I, inhibidor de tomàquet I; ERI, *ethylene responsive protease inhibitor* de tomàquet. L'asterisc indica la posició del centre reactiu (residu P₁). En gris s'indiquen els aminoàcids similars (70%) i en negre els idèntics.

Els inhibidors MPI i CI-2 d'ordi presenten una identitat aminoacídica del 70%. Aquest fet, permet predir que el MPI podria adoptar una estructura tridimensional similar a l'estructura de l'inhibidor d'ordi. A la **Figura 21** es mostra l'estructura tridimensional de l'inhibidor CI-2 d'ordi.



Figura 21. Estructura tridimensional de l'inhibidor de quimotripsina d'ordi CI-2 (Codi PDB: 2CI2). Estructura en forma de falca, amb el centre actiu al seu extrem més estret. El cor hidrofòbic està format per l'empaquetament de 2 fulles- β oposades a una hèlix- α .

De la mateixa manera, en el nostre laboratori s'ha expressat el gen de *mpi* en *Escherichia coli* per a produir una proteïna fusió a GST (glutathion-S-transferasa). La proteïna MPI recombinant (MPIr), un cop purificada és funcional i amb ella s'ha pogut dur a terme diferents assaigs d'inhibició de proteases *in vitro*. Així mateix, la proteïna MPI purificada a partir de la proteïna fusió GST-MPI s'ha utilitzat per la producció d'anticossos policlonals anti-MPI en conills (Tamayo *et al.*, 2000; Vila, 2003).

Els estudis d'inhibició *in vitro* duts a terme en el nostre laboratori, han permès determinar les propietats inhibidores del MPI sobre proteases de mamífers i insectes. El MPI presenta certa activitat inhibidora de quimotripsines de mamífer, però una forta activitat front elastases de mamífer. Aquesta activitat inhibidora d'elastases és coherent amb el fet que, el centre reactiu del MPI presenta una alanina. Altres inhibidors de proteases de plantes amb activitat elastasa, com el VSI (*Vicia subtilisin inhibitor*) (Svendsen, 1984) o C-II (*Soybean inhibitor C-II*) (Odani i Ikenaka, 1977) també presenten una alanina en P1. En el cas del CMTI III (*squash seeds trypsin inhibitor*), la substitució del P1 per una alanina augmenta l'activitat contra elastases (Rolka *et al.*, 1991).

Es determinà que el 40% de l'activitat proteolítica total de *Spodoptera littoralis* és inhibida per MPI. Assaigs realitzats amb els substrats específics per proteases de tipus quimotripsina (SA₂PPpNA i SA₂PLpNA) i elastasa (SA₃pNA), demostren que l'inhibidor MPI és efectiu per inhibir activitats quimotripsines i elastases digestives de larves d'aquest lepidòpter (Tamayo *et al.*, 2000). Resultats similars han estat observats en estudis d'inhibició de proteases digestives dels lepidòpters *C. suppressalis* i *Cacyreus marshalli* per MPI (Vila, 2003).

El gen mpi

L'expressió del gen *mpi* és induïda en plantes de blat de moro per ferida mecànica, i la seva inducció es dona tant a nivell local, és a dir, en fulles que han sigut ferides, com a nivell sistèmic, a fulles on no s'ha produït ferida (Cordero *et al.*, 1994). Tractaments amb àcid abscísic (ABA) i MetilJasmonat (MeJa) indiquen que aquestes fitohormones indueixen l'acumulació de trànscrips de *mpi*, essent més forta en el cas del MeJa (Cordero *et al.*, 1994). Aquests resultats suggereixen que la inducció de l'expressió del gen *mpi* de blat de moro es dona per mecanismes similars als anteriorment descrits, els quals medien la resposta a ferida en plantes dicotiledònies (Pautot *et al.*, 1991; Peña-Cortes *et al.*, 1989; Agrawal *et al.*, 2004; Schillmiller i Howe, 2005). En assaigs d'alimentació amb larves del lepidòpter *S. littoralis*, el MPI

s'acumula en els teixits on s'alimenta la larva, i en un nivell més alt que en les fulles ferides mecànicament (Tamayo *et al.*, 2000).

En el nostre laboratori s'aïllà i caracteritzà primerament, un fragment de 689 pb anomenat *C1* (fragment -689/+197) de la regió promotora del gen *mpi* (Cordero *et al.*, 1994), on s'identificà una caixa TATA (TATAAATA) i el punt d'inici de la transcripció (23 pb cadena avall de la caixa TATA). També, s'identificà un intró de 108 nucleòtids en la regió 5' no traduïda del gen (Vila, 2003).

Es coneix que existeixen seqüències concretes en els promotors d'alguns gens induïbles per ferida, que actuarien com elements *cis* associats a la resposta a ferida o, més concretament, a resposta a JA o MeJA (Farmer i Ryan, 1992; Boter *et al.*, 2004). S'ha descrit que moltes d'aquestes seqüències consens apareixen per duplicat o formant multimers (de forma directa o inversa), i que per a un correcte posicionament dels factors de transcripció requereixen certa proximitat en la seqüència del promotor (Rouster *et al.*, 1997; Eulgem *et al.*, 2000).

A la **Figura 22**, es mostren alguns dels motius identificats en el promotor del gen *mpi*, seqüències principalment implicades en resposta a JA (Vila, 2003). Entre aquests elements destaquen el motiu GAGTA de resposta a JA descrit en tomàquet i patata (Siebertz *et al.*, 1989; Ishikawa *et al.*, 1994; Ruíz-Rivero i Prats, 1998), les seqüències inverses CGTCA de resposta a MeJA descrites en el gen de la lipoxigenasa 1 (Rouster *et al.*, 1997), i caixes del tipus W-Box que permeten la unió de factors de transcripció del tipus WRKY (Eulgem *et al.*, 2000). També han estat identificats elements GT-1, trobats en regions promotores d'altres gens de defensa (Buchel *et al.*, 1996).

```

-1872 CTCAAACCTC ATGTTTTACC CTTTTACTCA AAGTTGCACT TTGTACCCTC
CATTTCAACT CTTTGGGACT TAGTGCCTTT AAATGCCTT CAAGTGAACC
-1772 TATGATTATA CFCATATCAA ACTAGTTAGT CAACGTTGGT GCGTTGAACA
CTTAATCACC AAAACAGGTA GAAATGTATA TCTTGCGCAT TTCCCTTTCA
-1672 GAACATTTTG AAAACGCTGC CAATACTGCT TCTTATTCCA TTAACCCCAA
CTGGTATGTC AACAGTGCCA CCAATGACCT TCTTACTAGC GATCTTGTATC
-1572 ACCTAAGTGT CCACGAAGCG TACACCGGC AAGGACTCCA TTTAGGTAC
CAGTTGACAA GGTCTGCCAA TTTCTTATAC TGGTCATTCTG TTGCTTCTCTG
-1472 GCTTGACTCG TCCTCTTTAC CTACTCAATA TTTTACATGT GCCTTGGTAT
ATGCTGCCT ATATACATGTC TGACTCGTTT GCTTATTGG GCTAGGGGCA
-1372 CCATAATTTT ATACCTTTTA ACATATTGAT CAAGCAGCCA TGACCGAAGA
AAGATGCAAT CACCAAAATAG CCCTTTATGA ATTAGAGTTC TAAATGGACT
-1272 ATTTTGTTTG AAAAAGTTTG GAGAACTTGC AATGGGCTAG AGTTCATTAGT
TTCGGGAACA GGGTGAAGTTG TGAATCTAT GGCTTCTCTG GAAAGACAGC
-1172 TAGTAGAACA AAGTGCCTTT GGGTTCATGA GCTCCACCAA AAGGAGGGGG
CATGTGTTGA ACAACAAATT TGGCACTGG ATAGTCGGAT GGTCCGGCCT
-1072 TGTGGCCCGA ACGGTCTATG CCCTGGACGA TTCGCAGGAGTATAGTTCCGAA
GGTACGCCAT TAGATTAGTT CAGGCTGGAG TCCTTATCCC ATGCGTGGTT
-972 ATCCTAACAA ACTCGGACGG AACTATTGGA TCTCGCCTAG GAATGGGTCC
AAACCCCTT ATATACATGA TAGGTACGAC CAAATGAGAA TACAAGATCA
-872 AATCGAAACC AATTTATTAC ATTTATTATC TTCAATGCCCT AGGAGTAGAT
GTAGTGIAGC TCTAGTTGTA GTTTCCCAA CTCAACCTTG ACCTCTTAG
-772 CTCTACGTCA TCTAGAGGTG CTTTAGGTGG CTTGTTGATA TCAAAACAAC
CCTATGATCT CTTCTCCCGC ACGGGTCTCT GAGAGACGAT ATTTAGGTTT
-672 TACAGAACA ACTCTACGGC ATCGTGGATG CTTCCACCAA AAGGAGGGGG
CGGTCCACGC GCCTGCAGAG AAGAGCATAG TTATTGCTC CATGGTGACC
-572 TACACGGCAA CGGTCCAGT ACCTATCAG AACCCTTCCG CACCTTGCAG
AGAGTCTCC AACGGTCTCGA TACTCATGA GCGGAATCTA GTGATTATTG
-472 GTGTTTAGCG CAAAAACGGC GCCAACAGTA GGGTTTACCT GCGAAGTAAG
ATGGAGGGTC ATAGAGTTTA AGATATAGAA ATTGACAGAT TCTCCTATT
-372 GTTGATAAC TCGGCGGATT TTGTTGATG TGATTTAGAC CATTTTCAACA
CACTATCAGA TGCCGATCCT AGCTAATGGC CAGAATCTGA GAACAACAAC
-272 CCCCAGAACG TACAGCGGTG GCGGAGGTGG TTAGGTCACT GTTCACCGAG
TTTTGATAAG TTTCTGTCCG CGTCACGCC ACTACGCGG CTGGAAAATG
-172 CTGACTATT TGGTGCAAG CATGGGATAA CCATGGATT TTTTCTCTGC
AGTGTGCTA TCTGTTCTTT GTTTCGTAGT GGCTGTTTAT CCTCGTGTGC
-72 CTCGGGTGCG TATATACACA CACGTCCTGC CTGCACGCAA CGCAGCTTA
TAAATACCTC ATCACCGGTG CACTCGCTTA ATATATATCC AACAAACCAGC
+ 29 AGTGAACAAC GCAAGATTTA CCTGCCCGTG AGTGTGCCTT TCAATAATAT
AATGCTTTAT TTTATTATTA TGTTTTTGCA GTGATAGTAG TCTGTAAATA
+129 ATCTCTCCTT TCAATATATA TAATTCACAT GCCAGATCGA TCAATATCGTC
AACTGGTCCG GCAGTTCGG ACACCATCAG CTCCACGGAG TGCGGCGGGC

```

Figura 22. Seqüència del promotor del gen *mpi* (promotor i regió 5' no traduïda). S'indiquen els motius potenciamlntac implicats en resposta a JA (ferida). En text vermell es mostren els motius repetits directes (GAGTA, fons groc) o inversos (TACTC, fons blanc); en text verd els motius inversos CGTCA. S'indiquen amb fons verd les caixes W-Box (CTTGACT) i , en text blau els elements GT-1 (GGAAAA) . En lila es mostra la caixa TATA, i en text negre i fons groc la diana de restricció *NruI*. L'ATG s'indica amb fons vermell. Les xifres indiquen la distància a l'inici de transcripció (en minúscula). Adaptat de Vila (2003).

INTRODUCCIÓ

Treballs del nostre grup es centraren en l'estudi del promotor+intró (*CI*) de *mpi*, permetent determinar que era funcional en plantes transgèniques d'arròs. Es va comprovar que el fragment *CI* del promotor *mpi* permetia assolir uns nivells induïbles suficients d'expressió amb el gen insecticida *Cry1B*, per obtenir el 100% de mortalitat en larves de *C. suppressalis*, després de 8 dies d'alimentació en aquestes plantes transgèniques (Breitler *et al.*, 2001).

L'aïllament i caracterització de promotors induïbles, i la seva utilització en transgènia, permetrien doncs una expressió induïble dels gens insecticides, evitant així el desgast en el metabolisme de la planta, que es dona en expressions constitutives.

Resultats també obtinguts en el nostre grup, han demostrat que tant l'expressió constitutiva de *mpi* (a partir del promotor de l'ubiquitina de blat de moro) com l'expressió induïble per ferida (a partir del seu propi promotor) augmenta les propietats de resistència de la planta d'arròs front *Chilo suppressalis*. Aquestes plantes transgèniques han sigut avaluades en termes de l'efecte que provoquen sobre el creixement de les larves. S'observa una important resposta dosi-depenent en la reducció de pes de les larves de *C. suppressalis* alimentades en plantes transgèniques en comparació amb les control (fins a un 32% de reducció de pes amb el promotor induïble C1) (Vila, 2003; Vila *et al.*, 2005). La introducció del gen *mpi* en plantes d'arròs s'ha de considerar com una estratègia prometedora en la protecció d'aquesta planta front el barrinador de l'arròs.

4.2.7 L'inhibidor de carboxipeptidases PCI

El nombre d'inhibidors de metal·locarboxipeptidases identificats és força baix, sobretot si el comparem amb el nombre d'inhibidors que s'han trobat per endoproteases. Ryan i col·laboradors (1968), van presentar el primer treball on es descriu una activitat inhibidora específica de metal·loproteases donada per un polipèptid de tubercle de patata (Ryan, 1968; Rancour i Ryan 1968). S'han identificat inhibidors de metal·loproteases en solenàcies (patata i tomàquet), nemàtodes (*Ascaris suum* i *Hirudo medicinalis* (sangonera) i alguns teixits de mamífers. De tots aquests inhibidors, **l'inhibidor de carboxipeptidases de patata (PCI, *Potato Carboxypeptidase Inhibitor*)** i el de sangonera LCI (*Leech Carboxypeptidase Inhibitor*), són els més ben descrits (Villanueva *et al.*, 1998; Reverter *et al.*, 1998).

S'ha clonat i caracteritzat el gen que codifica l'inhibidor PCI de patata (Villanueva *et al.*, 1998), el qual presenta un 85% d'homologia amb l'inhibidor de carboxipeptidases de tomàquet. S'ha demostrat que el gen *pci* és transcripcionalment activat per ferida tant a nivell local com sistèmic, i que la seva expressió pot ser induïda per ABA i àcid jasmònic.

També s'ha estudiat la seva localització subcel·lular mitjançant microscopia electrònica, i s'ha demostrat que el PCI és una proteïna vacuolar, observant-se particularment, en aquest orgànuls en cèl·lules parenquimàtiques associades estretament amb cèl·lules epidèrmiques (Villanueva *et al.*, 1998).

El cDNA d'aquest inhibidor, aïllat d'una llibreria de mRNAs de fulles de patata tractades amb ABA, codifica un polipèptid precursor compost per un pèptid senyal en el seu extrem N-terminal de 29 residus, una pro-regió N-terminal de 27 residus, seguit d'una extensió de 7 residus en el seu extrem C-terminal (Villanueva *et al.*, 1998).

El PCI és una proteïna petita, amb un pes molecular d'aproximadament 4 KDa, estabilitzada per tres ponts disulfur (Cisteïnes 8-24, 12-27 i 18-34; Haas i Ryan, 1981), i es mostra altament estable tant per desnaturalització per calor com a la degradació per endopeptidases (Villanueva *et al.*, 1998). Funcionalment, és capaç d'inhibir forta i competitivament les activitats carboxipeptidasa A i B pancreàtiques i d'altres fluids o òrgans animals (Haas i Ryan, 1981).

L'estructura tridimensional del PCI es coneix tant lliure i en solució, determinada per RMN (González *et al.*, 2003) com en complex amb carboxipeptidases determinada per cristal·lografia de raigs X, tal i com es mostra en **Figura 23** (Rees i Lipscomb, 1982; Reverter *et al.*, 2000).

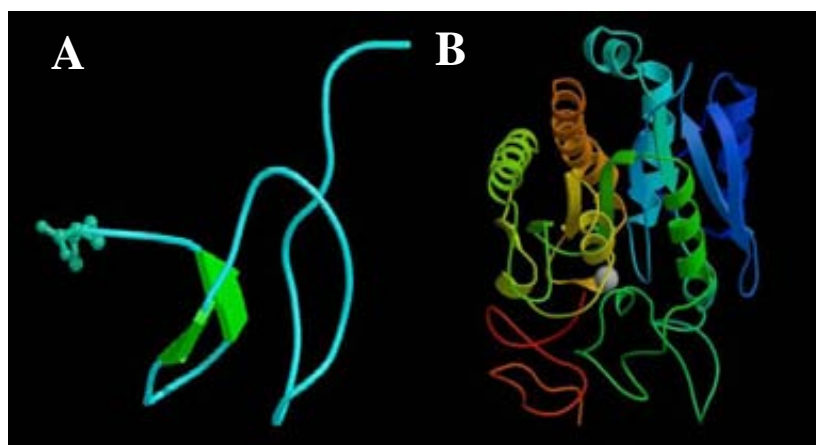


Figura 23. Representació tridimensional de A) inhibidor carboxipeptidasa de patata (PCI). S'india el lloc reactiu (Val38) en l'extrem C-terminal. B) Complex entre la carboxipeptidasa A bovina i el PCI. Es mostra l'ió zinc en gris i el PCI en vermell (Codi PDB: 4CPA).

A través de l'estructura tridimensional dels complexos s'han pogut caracteritzar les regions de l'inhibidor implicades en la seva activitat. Així, els cinc residus de l'extrem C-terminal del PCI, juguen un paper molt important en l'inhibició i es defineixen com el lloc d'interacció primària. Aquesta cua interacciona directament amb els residus del centre actiu bloquejant l'enzim carboxipeptidasa (CP). El C-terminal (Val38-Gly39) és hidrolitzat en el complexe PCI-Carboxipeptidasa, quedant atrapat el residu C-terminal Gly39 en la cavitat de l'enzim (Rees i Lipscomb, 1982). A més, una segona regió del PCI es defineix com el lloc d'unió secundari. Aquesta està formada pels residus que es troben al voltant del

INTRODUCCIÓ

triptòfan 28: His15, Trp22, Phe23, Asn29 i Ser30 (Rees i Lipscomb, 1982). Degut a tot això, la interacció entre PCI i les carboxipeptidases és molt forta, i la constant d'inhibició calculada en el rang de nanomolar per als enzims de mamífer (Vendrell *et al.*, 2000) i en el rang de picomolar pels insectes (Bayes *et al.*, 2003).

Una forma parcial del precursor, o PCI-II (39 aa), que conté la proteïna madura (rePCI) més una forma recombinant amb una extensió C-terminal de 10 aa (rePCI+10), han estat expressades en *E.coli* i caracteritzades (Molina *et al.*, 1992). Aquestes dues formes mostren un plegament normal amb una correcta formació dels ponts disulfur.

L'estructura tridimensional del PCI, presenta un bucle estabilitzat per ponts disulfur (anomenat *T-knot*). Aquesta, és una característica estructural d'altres inhibidors de proteases de plantes, així com també de factors de creixement animals. Particularment, el PCI presenta homologia estructural amb el factor de creixement epidèrmic de mamífers (EGF, *Epidermal Growth Factor*), competint per la unió amb receptors d'aquests factors (EGFR), i convertint-se per tant amb un potencial agent antitumoral (Blanco-Aparicio *et al.*, 1998).

4.3 Senyalització en la resistència induïda per ferida o insectes herbívors

La complexitat de la resposta de les plantes front ferida o atac per insectes herbívors, queda palesa en nombrosos estudis basats en micromatrius, arribant a detectar-se en alguns casos fins a 700 mRNAs la expressió dels quals es veu alterada en la planta. Malgrat tot, aquests canvis d'expressió no estan associats exclusivament amb predació per insectes, ja que molts d'ells ho estan també a les vies de resposta front patògens (Schenk *et al.*, 2000). És clar que gran part de la complexitat d'aquestes respostes és el resultat de canvis en l'expressió de gens que no codifiquen productes involucrats directament en resistència a insectes. Per exemple, gens fotosintètics, no involucrats en defensa, són reprimits en tabac en resposta a l'atac per insectes (Hermsmeier *et al.*, 2001; Gatehouse, 2002). Malgrat s'han generat extenses llistes de gens involucrats directament en la defensa de la planta i resposta a ferida (Wallin, 2000), molts d'aquests gens romanen sense una funció coneguda, i només una petita part semblen codificar productes que són potencialment tòxics pels insectes (com els inhibidors de proteases) o tenen la capacitat de produir toxines (com els enzims involucrats en el metabolisme secundari).

Una visió global dels anàlisi per transcriptòmica, permet classificar els gens associats a la resposta de la planta en tres grups principals: 1) **Gens de defensa** (incloent, tant proteïnes defensives com els

inhibidors de proteases, o gens codificats per enzims de la biosíntesi de compostos secundaris); 2) **Gens de la via de senyalització** (incloent aquells involucrats en la producció de compostos volàtils, que actuen com a senyalitzadors), i 3) **Gens involucrats en el redireccionament del metabolisme** per la producció de compostos defensius, com són les proteases implicades en la regulació proteica (Ryan, 2000).

Malgrat que la resposta global induïda de resistència front insectes en plantes és complexa, s'han realitzat aproximacions que han establert una descripció lineal dels esdeveniments en la resposta front herbívors, utilitzant com a model en plantes solenàcees (tomàquet i patata) (Ryan, 2000; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). En aquestes espècies, els principals productes de la resposta induïda són els **inhibidors de proteases** i la **polifenol oxidasa (PPO)**, ambdós involucrats en interferir la digestió de l'insecte, i així l'absorció de nutrients.

El procés s'inicia per la ferida que produeix l'insecte en alimentar-se de la planta, que desencadenarà tot un seguit de senyals, tant locals com sistèmiques. En tomàquet, el primer esdeveniment en la via de senyalització que portarà a la síntesi de proteïnes defensives, és el trencament proteolític d'un polipèptid precursor, la **prosistemina** (de 200 aminoàcids), que dóna lloc a una molècula senyalitzadora de 18 aminoàcids, la **sistemina**. La sistemina és una molècula senyalitzadora en la resposta de la planta a ferida (Mackgurl *et al.*, 1992) i atac per insectes (Orozco-Cárdenas *et al.*, 1993).

Existeixen alguns estudis que evidencien una possible via de senyalització independent a la sistemina, en tomàquet i altres espècies, que determina l'expressió de gens de defensa en teixits no ferits (O'Donnell *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 2001). Malgrat això, la senyalització mitjançant la sistemina manté una posició central en la resposta a ferida en Solanàcees, i li ha estat demostrat un paper principal en la resistència a insectes mossegadors (Gatehouse, 2002).

4.3.1 Senyalització de defensa depenent d'àcid jasmònic (JA)

L'atac per insectes herbívors, elicit la producció d'un gran ventall d'àcids grassos oxigenats (**oxilipines**), que actuen com a potents reguladors de la resposta de defensa, especialment els **jasmonats**. En comparació amb la ferida mecànica, l'atac per insectes herbívors provoca també altres events de senyalització diferents, tot i mantenint el JA el seu rol central (Reymond *et al.*, 2000). A més de tenir un paper fonamental en la defensa de la planta, el JA està involucrat en una gran quantitat de processos del desenvolupament, com la maduració del pol·len, el de les flors i els fruits, la fotosíntesi, la senescència o creixement de l'arrel (Creelman i Mulpuri, 2002; Turner *et al.*, 2002).

INTRODUCCIÓ

A partir d'estudis de genètica directa, en els que s'han emprat mutants defectius en l'expressió de inhibidors de proteases, es pot concloure que, primerament el JA juga un rol essencial en la resposta induïda per ferida, i en segon terme, que la ferida i la sistemina activen l'expressió dels inhibidors de proteases a partir d'una via de senyalització que requereix JA (Lightner *et al.*, 1993; Howe i Ryan, 1999; Li *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Estudis més recents, mitjançant micromatrius de DNA, confirmen el rol central del JA dirigint l'expressió d'un gran nombre de gens davant ferida mecànica i/o herbívoria (Delessert *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 2004; Halischke *et al.*, 2004; Schillmiller i Howe, 2005).

La resposta a ferida mediada pel JA està regulada pel reconeixement d'elicitors específics (Kessler i Baldwin, 2002) (Beckers i Spoel, 2006). En termes generals, a nivell cel·lular, aquest reconeixement porta a una sèrie d'esdeveniments, que impliquen l'activació d'una fosfolipasa de membrana, que a través de la via dels **octadecanoids** porta a la formació de l'àcid jasmònic.

S'han identificat mutants defectius en la senyalització posterior a la síntesi del JA, com els mutants ***coil*** (***coronatine insensitive 1***). *COI1* codifica una proteïna de 66 kDa que conté a l'extrem N-terminal un motiu F-box i 16 repeticions riques en Leucina (Xie *et al.*, 1998). Les proteïnes F-box funcionen com a receptors que recluten específicament a proteïnes reguladores com a substrats. Aquestes, entren a la via de degradació de proteïnes mediada per la ubiquitina-proteosoma. Ja que COI1 és un regulador positiu de la senyalització de JA, es pensa que actua com a activador selectiu de gens que responen a JA mitjançant el reclutament de proteïnes repressores per la seva degradació. El reclutament dels repressors s'efectua mediat pel complex proteic anomenat SCF (que consisteixen en les proteïnes SKP1, Cullin i una F-box, que dóna l'especificitat de substrat) (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Beckers i Spoel, 2006).

En la **Figura 24** es mostra el model proposat que integra els diferents processos implicats en la resposta induïda per ferida o atac per insectes herbívors, en base als resultats obtinguts en Solanàcees.

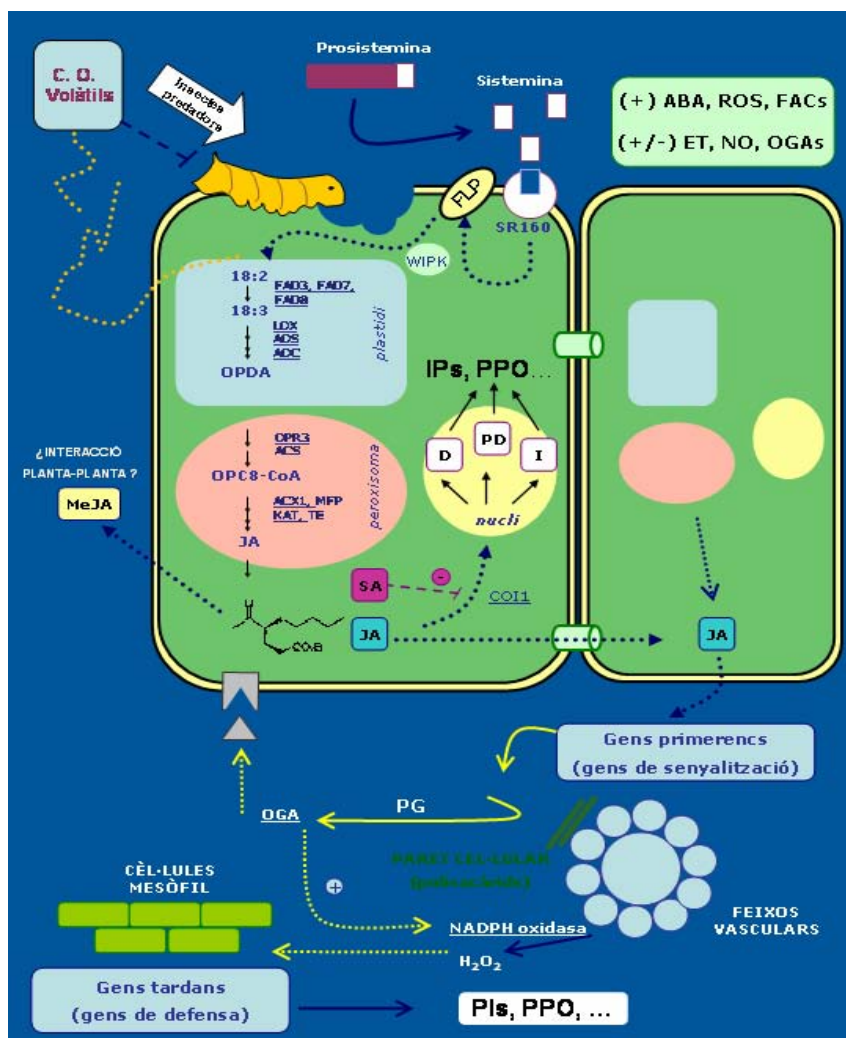


Figura 24. Model generalitzat de la resposta induïda per ferida: La sistemina, un cop alliberada del seu precursor, interacciona amb el receptor SR160 de tipus kinasa amb repeticions riques amb leucina (LRR) (Meindl *et al.*, 1998; Sheer i Ryan, 1999, 2002). Aquesta unió provoca una sèrie de processos a l'interior de la cèl·lula, que resulten, en primer lloc, amb l'activació de la **FOSFOLIPASA 2 (PLP-2)**, mitjançant la via de les MAP-kinases, on podria participar la **WIPK** (Seo *et al.*, 1999; Kodama *et al.*, 2000). Seguidament s'allibera l'**àcid linoleic (18:2)** a partir de lípids de membrana. Altres efectes com l'alliberament de Ca^{2+} vacuolar, la síntesi de calmodulina i l'obertura de canals iònics de membrana (conduït a la seva despolarització) també participen en la resposta a ferida (Gatehouse, 2002) tot i que no apareixen en el model inicial de Ryan 2000. L'àcid linoleic actua com a precursor per a la síntesi d'**àcid jasmònic (JA)** per mitjà de la via dels **OCTADECANÒIDS** (Weber, 2002). La biosíntesi d'àcid jasmònic involucra els enzims plastídics: **desaturasa d'àcids grassos (FAD)**, **lipoxigenasa (LOX)** (Heitz *et al.*, 1997), **alen-òxid sintasa (AOS)** (Wang *et al.*, 1999), **alen-òxid ciclasa (AOC)** (Ziegler *et al.*, 2000); així com els enzims del peroxisoma: **12-oxo-PDA reductasa (OPR)**, **acetil-CoA sintetasa (ACS)**, **acil-CoA oxidasa (ACX)**. El darrer pas de la formació del JA consisteix en **3- β -oxidacions (3- β)**. El JA produït als peroxisomes pot ser metabolitzat a diversos derivats, dels que en destaquen el MeJA (mitjançant la JA carboxil metil-transferasa, **JMT**) i el JA-Ile (mitjançant la **JA carboxil metil-transferasa, JAR1**). Moltes, però no totes les respostes mediades per JA requereixen **COI1**, que presumiblement dirigeix reguladors de la via de senyalització cap a una proteòlisi ubiquitina-independència. L'expressió de gens diana (expressada amb fletxes) pot ser tant **dependent (D)**, **independent (I)** o **parcialment dependent (PD)** de la via JA-COI1. Tota aquesta via està regulada per senyals que són produïdes durant la interacció planta-herbívor, incloent **oligogalacturonids (OGAs)**, **etilè (ET)**, **àcid abscísic (ABA)**, **espècies reactives d'oxigen (ROS)** i **òxid nítric (NO)**. Aquestes senyals poden exercir un efecte bé positiu (+) o bé negatiu (-) en la via de senyalització, i en alguns casos efectes oposats (+/-), segons les espècies estudiades. (Revisions a Gatehouse, 2002; Agrawal *et al.*, 2004; Schilmiller i Howe, 2005).

INTRODUCCIÓ

El JA és també precursor d'una molècula senyalitzadora volàtil, el **metil jasmonat (MeJA)**, format per l'esterificació catalitzada per l'enzim JA carboxil metil-transferasa (**JMT**), el qual és també regulat positivament per ferida i JA (Seo *et al.*, 2001). Per altra banda, existeixen evidències que mostren que el tractament de plantes amb MeJA incrementa la resistència front insectes plaga (Avdiushko *et al.*, 1997). El MeJA ha rebut gran atenció com la molècula responsable d'una comunicació planta-planta. Així, MeJA en l'aire, és capaç d'induir la síntesi de inhibidors de proteases en fulles de plantes veïnes (Farmer i Ryan, 1990), podent-se convertir per tant en una senyal per activar la resposta defensiva en plantes veïnes no danyades (Gatehouse, 2002). Per tant, és igualment possible que aquesta fitohormona funcioni de la mateixa manera entre diferents parts de la mateixa planta (Seo *et al.*, 2001; Gatehouse, 2002).

Una altra molècula volàtil senyalitzadora és l'**etilè**, que també es produeix després de ferida i per la sistemina (Felix i Boller, 1995), i que ha estat proposada com a senyal necessària per mediar la resposta a ferida (O'Donnell *et al.*, 1996), tot i que altres estudis suggereixen que la seva producció es regulada per JA i no a la inversa (Arimura *et al.*, 2002). De totes maneres, recents estudis han caracteritzat un factor anomenat Factor 1 de resposta a etilè (**ERF1, ETHYLENE RESPONSE FACTOR1**) que sembla que integraria les senyals que provenen de les vies de senyalització del JA i etilè, i activaria gens de defensa que responen a ambdues fitohormones (Lorenzo *et al.*, 2003). El ERF1 és un factor de transcripció que és ràpidament activat en resposta tant a etilè com a JA. A més la combinació d'aquestes hormones porta a un augment de l'expressió d'aquest gen. Aquests autors proposen que ERF1 és un factor clau regulador en la interacció d'ambdues hormones per el control de l'expressió de gens relacionats amb defensa.

Un altre punt important en la via de senyalització que porta a l'activació de l'expressió de gens insecticides, és la producció de polímers oligomèrics d'àcid galacturònic (**àcid oligogalacturònic, OGA**) com a resultat de la hidròlisi de poligalacturònids del component "pèctic" de les parets cel·lulars de la planta. Enzims com la poligalacturonasa o la pectic liasa, són encarregats d'aquest procés. De totes maneres, l'àcid galacturònic no és l'únic oligosacàrid que indueix aquest tipus de resposta defensiva, ja que també se n'ha descrit aquesta activitat en el cas d'oligòmers amb unions β -1-4 glucosamina (Quitosan)(Shibuya i Minami, 2001). Així, sembla que existeix una resposta diferent que la causada per oligosacàrids derivats de quitines (β -1-4-N-acetilglucosamina) que són elicitors de la resposta defensiva front fongs patògens (Gatehouse, 2002). També s'ha descrit que la senyal mediada per OGA provoca despolarització de membrana (Thain *et al.*, 1995), mobilització de calci a nivell intracel·lular i acumulació d'activitat calmodulina (Leon *et al.*, 1998).

El **peròxid d'hidrogen (H₂O₂)** és produït en els teixits de la planta durant ferida (Olson i Varner, 1993), i aquesta resposta es dona tant a nivell local com sistèmic (Orozco-Cardenas i Ryan, 1999).

“L’explosió oxidativa” (amb la producció de H_2O_2) pot ser induïda per OGA i sistemina (Gatehouse, 2002). D’aquesta manera, la resposta de defensa a ferida i la generació de H_2O_2 estan units per una sèrie d’esdeveniments relacionats mitjançant la via de senyalització de JA i OGA. L’ H_2O_2 pot ser produït per diferents rutes en els teixits vegetals, però en el cas de l’explosió oxidativa es dona com a resultat de l’activitat d’un complex d’unió a membrana NADPH (Doke *et al.*, 1996). L’activació d’aquest enzim mitjançant la senyal mediada per OGA porta al model de defensa en resposta a herbivoria/ferida que es mostra a la **Figura 24** (Orozco-Cardenas, 2001; Gatehouse, 2002). Per altra banda, experiments amb tomàquet, han demostrat que l’ H_2O_2 pot ser la última molècula senyalitzadora que porta a l’expressió de gens que codifiquen proteïnes defensives, com els inhibidors de proteases i la polifenol oxidasa (Orozco-Cardenas, 2001). Mitjançant un inhibidor de la producció de H_2O_2 , van comprovar com es bloqueja la inducció de l’expressió dels gens que codifiquen proteïnes defensives, però no aquells que codifiquen proteïnes implicades en senyalització (prosystemina, biosíntesi JA, poligalacturonasa). L’últim pas en el procés de senyalització es dona quan l’ H_2O_2 produït prop dels feixos vascular, es difon cap a les cèl·lules del mesòfil on activen l’expressió dels gens que codifiquen proteïnes defensives. De totes maneres, el mecanisme concret, mitjançant el qual es dona aquest fet, roman encara indeterminat. S’ha associat l’ H_2O_2 a l’activació de proteïnes tipus quinasa, tot i que encara no està clar la seva implicació en la a ferida.

Aquesta és únicament una aproximació a aquest complex procés, que involucra múltiples vies de senyalització paral·leles que contribueixen totes a la resposta general.

Excepte en les espècies on el procés seqüencial s’ha desenvolupat, en tomàquet, la naturalesa de la senyal sistèmica està encara sota estudi, suggerint que hi ha més d’un factor involucrat (Li *et al.*, 2002), tot i que recentment s’ha proposat el paper del JA amb un conjugat, com a possible molècula senyalitzadora a nivell sistèmic (Schillmiller, 2005).

Altres molècules senyalitzadores també actuen com a moduladors en la resposta a ferida. Així, l’**àcid absísic (ABA)** s’ha suggerit com a necessari perquè es doni aquesta resposta (Pena-Cortes *et al.*, 1995, 1996). L’ABA provoca una regulació positiva en la biosíntesi del JA, però s’ha suggerit que regula positivament també la biosíntesi de proteïnes defensives per una via independent de JA (Damman *et al.*, 1997). L’ABA només indueix lleument la síntesi dels productes finals, i sembla que és necessària per les plantes per respondre de forma massiva a la ferida (Ryan, 2000). Unes altres hormones vegetals, les **auxines**, són moduladores negatives d’aquesta resposta. L’àcid salicílic (SA) actua com a modulador negatiu de la resposta a ferida (Doares *et al.*, 1995; Bostock *et al.*, 2001), tot i que no hi ha una separació simple entre l’expressió gènica induïda per patògens i pel dany provocat pels insectes (Fidantsef *et al.*, 1999) (veure **Apartat 3.4**).

4.3.2 Diferències en la resposta a ferida entre espècies

Malgrat que la via de senyalització comentada fins ara és en general la més ben caracteritzada. Cal tenir en compte, que tot i ser un model general, es poden presentar certes diferències segons l'espècie. En aquest sentit, per exemple, la resposta a ferida en *Arabidopsis* es basa en vies de senyalització mediades tant per JA i com per OGAs, on s'ha vist que aquestes vies actuen antagònicament. En aquest cas, el gen activat per una via és reprimat per l'altre, resultant en una resposta local mediada per OGAs diferent a la resposta sistèmica mediada per JA (Leon *et al.*, 2001). També sembla clar, que la resposta a ferida en tomàquet (i altres Solanàceae) és significativament diferent de la resposta en *Arabidopsis*. Per exemple, l'etilè és modulador positiu de la resposta a ferida en tomàquet però regulador negatiu de la resposta local en *Arabidopsis* (Stotz *et al.*, 2000). Aquestes diferències en la resposta posen en evidència l'elevada especificitat existent en les interaccions de les plantes amb els seus herbívors, i adverteixen sobre els riscos de les extrapolacions en altres plantes de les dades obtingudes en les plantes models. És important diferenciar quins dels aspectes de la interacció planta-insecte poden ser considerats com a "principis generals" respecte aquelles més específiques de cada espècie (Gatehouse, 2002). La composició dels components defensius, la senyalització i els mecanismes sintètics que porten a la seva producció, s'espera que variïn entre les diferents espècies vegetals.

4.3.3 Evasió de la resposta a ferida per part dels insectes

Tot i aquests aspectes generals, cal dir que no es poden separar els mecanismes de resistència induïts per ferida i els que es donen resposta a patògens, com a parts del sistema global de defensa de la planta, on molts gens són regulats positivament en comú a les dues respostes, tot i que el resultat dels dos processos sigui diferent. En general però, l'aplicació de SA no condueix a una regulació positiva de la síntesi de productes de la resposta a ferida, i no té efectes en la resistència front insectes mossegadors, com les larves de lepidòpters (Bi *et al.*, 1997; Inbar *et al.*, 2001). De la mateixa manera, l'alimentació per insectes no provoca normalment resposta hipersensible que porti a la mort cel·lular localitzada. Donat l'efecte negatiu que té el SA en la producció de JA (veure **Apartat 3.4**), en general s'observa que les plantes són més susceptibles a l'atac per insectes mossegadors (Felton *et al.*, 1999). Activar la SAR pot tenir el seu sentit per a la planta si es tracta d'insectes que poden actuar com a vectors de patògens.

Des del punt de vista genètic, la resistència a insectes és sovint multigènica, i està associada a QTL (*quantitative trait loci*) (Stotz *et al.*, 1999; Yencho *et al.*, 2000). Tot i que són pocs, han estat identificats alguns gens *R* que confereixen resistència a homòpters (àfids i mosques blanques) i nematodes (Milligan *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1998; Walling, 1999; Yencho *et al.*, 2000). Molts homòpters fitòfags s'alimenten del teixit vascular de la planta inserint l'estilet dintre de les cèl·lules

conductives. El fet d'inserir l'estilet entre les cèl·lules en lloc de dins d'elles, minimitza el dany cel·lular i per tant evita la inducció de la resposta a ferida. Aquests exemples estan associats amb plagues d'insectes amb uns hàbits d'alimentació que aconsegueixen minimitzar el dany tissular a la planta, sent així capaços d'evitar moltes de les respostes a ferida.

4.3.4 Emissió de molècules volàtils induïda per insectes i interaccions tritròfiques

L'emissió de molècules volàtils per part de les plantes ha estat un component important de la interacció entre plantes i insectes durant anys, tant en l'atracció per polinitzadors com en la dissuasió per herbívors. Molts d'aquests components volàtils estan preformats, i actuen com a elements dissuasoris en la defensa constitutiva. Però, la resposta induïda per ferida inclou també la formació i emissió d'elements volàtils. Moltes d'aquestes partícules són comunes a diferents espècies de plantes, inclosos els aldehid C6, alcohols i èsters, coneguts com "volàtils de fulles verdes", els terpenoids C10 i C15, i indols (Pare i Tumlinson, 1999), mentre que d'altres són productes específics del metabolisme secundari d'espècies particulars de plantes. La síntesi i l'alliberació de compostos volàtils com a part de la resposta induïda per ferida es dona, tant a nivell local com sistèmic, i és activat per JA. La barreja específica de volàtils induïda per JA és generalment diferent de la induïda per insectes. Els "volàtils de fulles verdes" per si mateixos són també capaços d'induir l'expressió de gens relacionats amb defensa. Com a defensa directa, els components volàtils específics poden tenir efectes repel·lents o tòxics, evitant la posta dels insectes en aquestes plantes (Walling, 2000; Gatehouse, 2002). Així, existeixen algunes evidències que indicarien que aquests compostos volàtils també podrien evitar la posta d'alguns insectes lepidòpters herbívors (De Moraes *et al.*, 2001; Kessler i Baldwin, 2001); tot i que no està clar si és per l'efecte tòxic dels components o bé per què els propis insectes eviten deixar les postes en plantes que han sigut ja depredades.

Altres estudis han identificat un altre rol d'aquestes molècules que consisteix en l'atracció de paràsits de larves de lepidòpters. Aquests paràsits poden causar la paràlisi en la larva, disminuint així el dany a la planta i prevenint l'augment de la població de l'insecte plaga (van Loon *et al.*, 2000; Gatehouse, 2002). La interacció entre les plantes, els insectes herbívors i els enemics naturals dels insectes herbívors és una **interacció tritròfica**, on els components senyalitzadors de les plantes afecten directament a un organisme al tercer nivell tròfic.

Tot i que la ferida mecànica per si mateixa pot provocar l'emissió de components volàtils, la barreja de volàtils produïda és diferent de l'obtinguda en resposta a insectes, donada la presència de components

INTRODUCCIÓ

bioactius en la saliva dels insectes (Weissbeckers *et al.*, 1999; Shiojiri *et al.*, 2000). La identificació d'un compost, la **volicitina**, en les secrecions bucals d'alguns insectes, ha estat àmpliament relacionada amb l'atracció per part de la planta d'enemics naturals de la plaga (Hoballah i Turlings, 2001; Kessler i Baldwin, 2001) . La combinació entre ferida mecànica i l'aplicació de volicitina provoca una producció de volàtils similars als provocats en resposta a insectes. Probablement, la volicitina té un rol metabòlic en el insecte, i la planta ha adaptat aquest compost pel seu propi benefici (Gatehouse, 2002).

Així com les secrecions bucals, altres compostos poden tenir importància en una resposta de defensa indirecta per part de la planta, com per exemple, secrecions de les postes en combinació amb ferida, que han mostrat un rol similar a la volicitina atraient paràsits de les postes mitjançant l'emissió de volàtils (Gatehouse, 2002).

5 LES PROTEASES

Les **proteases** són enzims que catalitzen la hidròlisi d'enllaços peptídics de proteïnes i polipèptids. El conjunt de les proteases engloba un gran nombre d'enzims amb funcions molt diverses i que afecten a diferents aspectes del metabolisme, variant des de la funció més específica, com el processament de pro-hormones, fins a la funció més general com és la degradació de les proteïnes provinents de la ingesta. Les proteases tenen un gran interès en medicina i biotecnologia i constitueixen dianes molt atractives per al disseny de fàrmacs.

Existeixen diversos termes redundants per referir-se als enzims proteolítics: **proteasa**, **peptidasa** i **proteïnasa**. Tot i que la Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>) recomana l'ús del terme peptidasa, els termes proteasa i proteïnasa són els més emprats.

5.1 Classificació de les proteases

Les proteases identificades fins ara en diferents organismes, es poden classificar segons diferents criteris com són el seu mecanisme catalític, especificitat de substrat, estructura molecular i homologia, etc... En termes generals, les proteases es poden dividir en endo o exopeptidases. Una **endopeptidasa** (o **proteïnasa**) hidrolitza enllaços peptídics interns d'una cadena polipeptídica, tendint a actuar lluny dels extrems N o C terminals. Oposadament, una **exopeptidasa** requereix un grup amino o carboxil lliure, o ambdós, hidrolitzant l'enllaç no més enllà de tres residus des de l'extrem N o C terminal. Les

exopeptidases, alhora, es poden classificar en amino- o carboxipeptidases segons si el residu hidrolitzat està en un o altre extrem.

Una de les classificacions de les proteases més usada és la descrita per Rawlings i Barrett (1993), basada en el mecanisme catalític de les proteases. Aquests autors van crear la base de dades de proteases **MEROPS** (www.merops.sanger.ac.uk) (Rawlings i Barrett, 2000), on cada grup de proteases està dividit en famílies seguint criteris d'homologia estructural. Les famílies de proteases han estat generades per comparació de les seqüències aminoacídiques dels seus membres, de manera que tots els seus integrants mostren una relació amb, al menys, un altre membre de la família. A més, cal que la relació existeixi a la part de la molècula anomenada "unitat peptidàsica", que és la principal responsable de l'activitat catalítica, fet que és necessari donat que algunes proteases són proteïnes quimèriques. La nomenclatura seguida en aquesta classificació segueix el sistema introduït per Rawlings i Barrett (1993) en la que cada família és anomenada per la lletra que descriu el seu tipus catalític (residu del centre actiu) seguit d'un número assignat arbitràriament. Així, els set grups de proteases que s'han definit són: **serina** (S), **cisteïna** (C), **treonina** (T), **aspàrtic** (A), **glutàmic** (G), **metal·lo** (M) proteases i proteases de mecanisme catalític desconegut (U, "unknown") (**Taula 5**).

S'utilitza el terme "clan" per descriure agrupacions de famílies, en les quals totes les proteïnes han divergit a partir d'un mateix origen (tot i que la seva homologia no es pugui provar per comparació de la seva estructura primària)(Rawlings i Barrett, 1993). El tipus d'evidència més fort per donar suport a aquests conjunts de famílies és la similitud en la seva estructura tridimensional quan aquesta està disponible, però l'alineament dels residus catalítics en la cadena polipeptídica i la similitud de seqüència al voltant dels aminoàcids catalítics també es té en compte. El nom de cada clan està format per la lletra representativa del tipus catalític (com a les famílies) seguit per una segona lletra assignada arbitràriament. En el cas d'alguns clans, que contenen famílies de més d'un tipus de proteasa, la primera lletra emprada és la P.

Actualment, existeixen aproximadament unes 200 famílies i uns 40 clans de proteases descrits a la base de dades de MEROPS (veure **Taula V**).

INTRODUCCIÓ

Taula V. Classificació de les proteases (Merops, 2006). S'indica la família de proteasa segons la classificació de la base de dades MEROPS, el nombre de representants descrits fins el moment, alguns dels membres representatius i les seves principals característiques.

PROTEASES	Nº	(Família): membres representatius	Característiques
Serina (S)	41	(S1): Quimotripsina, tripsina, elastasa, acrosina, trombina (S10): Serina carboxipeptidases	El mecanisme catalític, així com l'estructura tridimensional del centre actiu, és molt semblant en totes les serina proteases estudiades.
Cisteïna (C)	61	(C1): Papaïna (C2): Calpaïnes (C14): Caspases	S'anomenen també sulfhidril o tiol proteases. La majoria corresponen a proteases de virus. El mecanisme catalític d'aquest grup s'ha caracteritzat en la família (C1) i s'ha observat que hi són involucrats un residu de cisteïna i un d'histidina.
Treonina (T)	4	(T1): subunitat catalítica del proteasoma de <i>Thermoplasma acidophilum</i>	Descrites per Seemuller <i>et al.</i> , 1995, aquests enzims es caracteritzen per presentar una treonina en posició N terminal que té la funció de nucleòfil del centre actiu.
Aspàrtic (A)	14	(A1): pepsina A humana, quimosina, renina (A2): retropepsines del virus de la SIDA	Aquests enzims també són coneguts com a proteases àcides o carboxil proteases. Són endoproteases que es caracteritzen per la presència d'un residu aspàrtic en el centre actiu, cosa que fa que el seu pH òptim sigui àcid.
Metal·lo (M)	53	Endopeptidases: (M4): termolisina (M12): astacina Exopeptidases: (M14): carboxipeptidasa A1 (M1): aminopeptidasa N	Són un conjunt molt variat d'enzims (tant endo com exopeptidases) que es caracteritzen per presentar un ió metàl·lic en el centre actiu, que normalment és zinc
Glutàmic (G)	1	G1: scytalidoglutamic peptidasa de <i>Scytalidium lignicolum</i>	Actualment es reconeix aquest sisè grup catalític a partir del treball que en caracteritza l'únic membre descrit (Fujinaga <i>et al.</i> , 2004)
Desconegut (U)	9	secretases	Dins d'aquest grup trobem les secretases, que són tres enzims responsables del processament de la proteïna precursora dels pèptids amiloïdes que es dipositen extracel·lularment en el cervell, causant la malaltia de l'Alzheimer (Dominguez <i>et al.</i> , 2001),

D'entre totes les proteases, són les **serina** i les **metal·loproteases** les que presenten un especial interès en aquest treball, ja que els inhibidors vegetals objectes d'estudi MPI i PCI, presenten com a dianes aquests tipus de proteases (Veure **Apartat 4.2.6 i 4.2.7**).

SERINA PROTEASES

El grup de les **serina proteases (S)**, engloba un conjunt d'enzims que es caracteritzen per presentar una serina reactiva en el seu centre actiu. La família de la **S1 (MEROPS)**, té la **quimotripsina** com a representant, és molt nombrosa i presenta endoproteases com la tripsina i la elastasa. Una altra família a destacar són les **serina carboxipeptidases (S10)**, amb la carboxipeptidasa Y (CPY) com a enzim

representatiu. En aquest grup trobem carboxipeptidases presents en fongs, gramínies i dicotiledònies (de Laurence i Koundal, 2002).

Proteases com la tripsina, quimotripsina i elastasa, són uns dels principals enzims responsables per l'inici de la digestió intestinal en molts organismes. *In vivo*, aquests enzims trenquen principalment cadenes polipeptídiques llargues, de manera que els productes peptídics resultants són accessibles per l'acció de les exopeptidases, que les hidrolitzen fins a aminoàcids a partir dels seus extrems. Aquests tres tipus de serina proteases, es diferencien bàsicament, en la seva especificitat. Així, les tripsines trenquen l'enllaç peptídic de residus de cadena bàsica (Lys, Arg) en el seu extrem terminal; les quimotripsines hidrolitzen preferentment residus de cadena hidrofòbica (Phe, Tyr, Leu); i les elastases residus de cadena neutra i petita (Ala i Gly) (Ryan, 1990).

METAL-LOCARBOXIPEPTIDASES

Les diferents famílies de metal·loproteases es divideixen en quatre grups, dos dels quals contenen el motiu **HEXXH**. Per cristal·lografia de raigs X, ha estat demostrat que aquest motiu forma part del lloc d'unió de l'ió metàl·lic, que generalment és zinc (Rawlings i Barrett, 1995). Els quatre grups que s'han definit són: **1) HEXXH + E**, en què els lligands de l'ió zinc són una molècula d'aigua, les dos histidines i un residu d'àcid glutàmic (majoritàriament endopeptidases); **2) HEXXH + H/D**, en aquest cas el tercer residu és una histidina o un aspàrtic (endopeptidases); **3) grup heterogeni amb motiu diferent a HEXXH**, la majoria presenten histidines com a lligand del ió metàl·lic. Dins d'aquest grup trobem les **metal·locarboxipeptidases** de la família **M14**, amb motiu d'unió a zinc del tipus **HXEH + H**, que són les dianes de l'inhibidor **PCI**, estudiat en aquest treball. **4) famílies amb lligand del metall desconegut.**

La família de metal·locarboxipeptidases M14, conté la **carboxipeptidasa A1 (CPA1)** com a enzim representatiu. Aquesta família es divideix en dues subfamílies: la subfamília de la CPA1 i la subfamília de la **carboxipeptidasa E (CPE)**. Mentre tots els membres de la subfamília de la CPA1 presenten segments d'activació de grandàries similars, en la subfamília de la CPE aquests propèptids són absents o bé tenen una mida petita (5-17 residus) i una funció desconeguda (Bayes, 2005).

Les metal·locarboxipeptidases també es poden classificar d'acord amb la funció fisiològica que realitzen. Així, distingim entre les carboxipeptidases involucrades en la degradació de les proteïnes durant la digestió (com la CPA1, la CPA2 i la CPB), i les carboxipeptidases reguladores (més desconegudes en quan a estructura i funció), que participen en processos biològics més específics, tal com el processament de pèptids bioactius.

Estructura de les metal·locarboxipeptidases de la subfamília A/B

La carboxipeptidasa A bovina és un dels enzims més ben caracteritzat estructuralment d'aquesta família i n'és el model principal. S'ha determinat l'estructura cristal·logràfica de l'enzim aïllat i en complexos amb inhibidors (Quiocho i Lipscomb, 1971; Rees *et al.*, 1983; Christianson i Lipscomb, 1989) (codis PDB: 3CPA, 4CPA, 5CPA)

També s'ha resolt l'estructura del domini globular del segment d'activació, en dissolució mitjançant RMN, de la forma B porcina (Vendrell *et al.*, 1990a; 1990b; 1991 a; 2003).

El segment d'activació inhibeix la carboxipeptidasa quan s'hi troba unit, tot i que per substrats petits s'ha descrit un cert grau d'activitat en algunes procarboxipeptidases del tipus A (Serra, 1992). Existeixen una sèrie de contactes específics entre el segment d'activació i l'enzim que bloquegen la unió amb substrats peptídics. De tots els residus del segment d'activació, la tríada **Asp36-Phe37-Trp38** està molt conservada i es creu que és essencial per a la interacció.

Totes les carboxipeptidases presenten un motiu d'unió al zinc del tipus **HXXE + H**, on els quatre lligands del zinc són una histidina, un **glutamat** situat tres residus més enllà, una altra histidina localitzada entre 108 i 135 residus cap al C-terminal de la primera histidina i una molècula d'aigua. El **Glu270** i l' **Arg127** (numeració estàndard de la CPA1 bovina) també col·laboren en el mecanisme catalític d'aquests enzims.

Tots aquests residus estan conservats en les carboxipeptidases digestives i molts també ho estan en les carboxipeptidases reguladores. Les diferències més importants es troben en els aminoàcids que defineixen l'especificitat de substrat o en els que es troben en regions superficials. Es creu que l'especificitat de substrat està definida principalment per un únic residu, que es troba en la posició **255** de la seqüència primària (Bown i Gatehouse, 2004), tot i que probablement hi hagi d'altres residus que juguin un cert paper en l'especificitat de substrat però no s'han pogut identificar. Així, en les carboxipeptidases A el residu en posició 255 és alifàtic o aromàtic, mentre que en les carboxipeptidases B està carregat negativament (Asp).

Activació de les carboxipeptidases

Moltes proteases són sintetitzades com a precursors inactius anomenats proenzims o zimògens per tal de modular la seva activitat, de manera que són activades només en el lloc i el moment adequat. Els zimògens són activats per un procés de proteòlisi limitada que implica la hidròlisi específica d'un o més enllaços per part d'una proteasa. Els segments responsables de la inactivació de les metal·lopeptidases es troben en la posició N-terminal, i són de longituds variables. Els dominis d'activació d'aquestes

proteases poden arribar a ser força llargs (uns 95 residus), el que significa una quarta part de tota la molècula.

5.2 Les Proteases Digestives d'insectes

Els insectes presenten un aparell digestiu amb una estructura general formada per tres parts diferenciades, intestí anterior (“*foregut*”), intestí mitjà (“*midgut*”) i intestí posterior (“*hindgut*”). És a l'intestí mitjà, també anomenat estómac o ventricle, on són secretats tots els enzims digestius o proteases. Entre aquestes proteases digestives es poden trobar tant endopeptidases (del tipus serina-, cisteïna-, aspàrtic- i metal·loproteases) així com exopeptidases (carboxipeptidases i aminopeptidases) (Wolfson & Murdock, 1990; Christeller *et al.*, 1992; Terra & Ferreira, 1994; Barret *et al.*, 1986).

Donat que el nitrogen és un dels elements limitants per a les larves de lepidòpters i la major font d'aquest element per a aquests insectes són les proteïnes que obtenen de la seva dieta, les proteases tenen una importància cabdal en la seva nutrició. En general, entre els diferents ordres d'insectes, podem trobar perfils de proteases digestives característics, on existeix un tipus d'activitat proteàsica predominant amb una contribució menor dels altres tipus d'activitats peptidàsiques. Els lepidòpters, himenòpters, ortòpters i dípters presenten principalment serina proteases en els seus sistemes digestius, mentre que els coleòpters i hemípters utilitzen majoritàriament cisteïna proteases (Ryan, 1990; Wolfson & Murdock, 1990; Murdock *et al.*, 1987) (**Figura 25**). Aquests perfils d'activitats però, depenent també d'altres factors com poden ser la dieta i/o l'estadi larvari en el que es troba l'insecte (Broadway, 1995; De Leo & Gallerani, 2002).

El pH del interior del sistema digestiu és un dels punts importants de la fisiologia de les larves dels insectes i en el cas dels lepidòpters es caracteritza per tenir valors marcadament bàsics. La major part de les famílies de lepidòpters descrites tenen un pH entre 9 i 11 a l'intestí mitjà (Terra i Ferreira, 1994). Aquest pH tan bàsic podria facilitar la digestió de les cel·luloses. Per altra banda, s'han identificat proteases del tipus serina (principalment tripsines i quimotripsines) en el tracte digestiu d'insectes de moltes famílies diferents, essent molt abundants en els lepidòpters. Lògicament, aquests enzims estan adaptats a aquests pH alcalins, de tal manera que els seus pH òptims poden ser diferents dels que s'han determinat en enzims homòlegs de mamífers. En general, en lepidòpters, les serina proteases representen aproximadament el 70% de les activitats proteolítiques, mentre que el 30% de l'activitat digestiva restant correspondria a activitats del tipus cisteïna-, aspàrtic- i metal·loproteasa, així com a exopeptidases. També s'han identificat exopeptidases en lepidòpters, tant aminopeptidases, com carboxipeptidases o dipeptidases (enzims que hidrolitzen els dos últims aminoàcids d'una cadena polipeptídica) (Terra i Ferreira, 1994). Concretament, s'han identificat i caracteritzat carboxipeptidases de varis insectes lepidòpters, com la HaCPA de *Helicoverpa armigera* i HzCPB de *H. zea*, insectes

INTRODUCCIÓ

plaga del cotó (Bown *et al.*, 1998; Bayes *et al.*, 2003; 2005), *Mamestra brassicae* (Hegedus *et al.*, 2003) o *Trichoplusia ni* (Wang *et al.*, 2004). També s'han identificat carboxipeptidases en dípters hematòfags: *Simulium vittatum* (Ramos *et al.*, 1993), *Anopheles gambiae*, mosquit de la malària africana, (Edwards *et al.*, 1997) i *Aedes aegypti*, mosquit de la febre groga, (Edwards *et al.*, 2000).

Per altra banda, a la literatura, trobem que estudis realitzats en intestins de diferents espècies de coleòpters mostren que les cisteïna proteases representen la major aportació en el perfil de proteases digestives, on generalment, el pH de l'intestí és àcid (pH 5-7). Aquest tipus de peptidases representen aproximadament el 70-80% de les activitats digestives totals en aquests insectes (Murdock *et al.*, 1987).

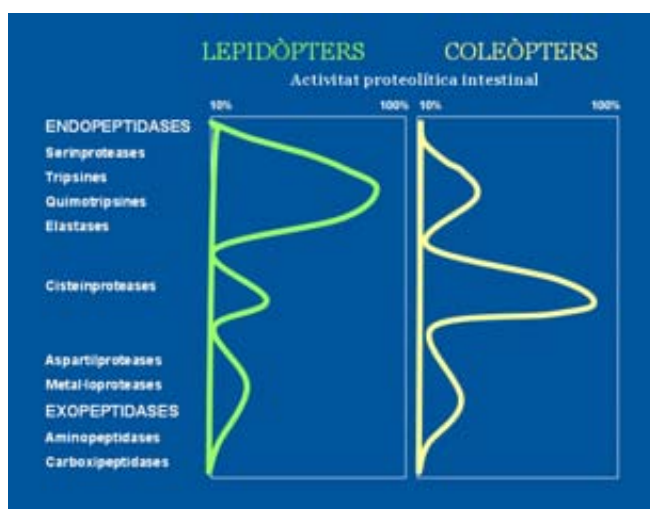


Figura 25. Proteases digestives d'insectes lepidòpters i coleòpters. S'indica el percentatge aproximat de la contribució dels diferents tipus de proteases, a l'activitat proteolítica total de l'intestí mitjà de l'insecte.

Per altra banda, els intestins dels insectes polífags presenten un espectre de proteases més ampli que els sistemes digestius d'insectes especialistes. Malgrat que s'han detectat activitats dels diferents tipus de proteases en els intestins de gran varietat d'insectes, són poques les proteïnes caracteritzades des del punt de vista de la seva estructura o de les seves propietats enzimològiques.

5.3 Proteases de Patògens

Molts microorganismes fitopatògens produeixen proteases extracel·lulars actives que junt amb altres enzims (com les poligalactorunases, pectoliasas, i xilanases) juguen un paper important en la patogenicitat. En els últims anys, tal com es mostra a la **Taula VI**, s'han aïllat i caracteritzat nombroses proteases extracel·lulars produïdes per microorganismes fitopatògens. Entre aquestes, destaquen les serina proteases, tot i que també hi ha enzims d'altres classes de mecanisme. Les serina proteases de fitopatògens descrites, consisteixen principalment en enzims amb activitat tipus tripsina i subtilisina.

En aquests microorganismes fitopatògens, també hi trobem aspartic proteases, cisteïna proteases i metalloproteases de la família dependent de zinc (**Taula VI**).

Taula VI. Proteases identificades en patògens.

Microorganisme fitopatògen	Tipus de proteasa	Referència
<i>Cochliobus carbonum</i>	Tripsina / Subtilisina	Murphy i Watlton, 1996
<i>Verticillium dahliae</i>	Tripsina	Bidochka 1999, Dobinson <i>et al.</i> , 1997
<i>Stagonospora (Septoria) nodorum</i>	Tripsina	Carlile <i>et al.</i> , 2000
<i>Phytophthora infestans</i>	Tripsina / Subtilisina	Gvozdeva <i>et al.</i> , 2004
<i>Acremonium typhium</i>	Subtilisina	Reddy <i>et al.</i> , 1996
<i>Magnaporthe poae</i>	Subtilisina	Sreedhar 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	Subtilisina	Dunaevsky <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium oxysporum</i>	Subtilisina	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001
<i>Botrytis cinerea</i>	Aspàrtic proteasa	Movahedy <i>et al.</i> , 1990
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Aspàrtic proteasa	Choi <i>et al.</i> , 1993
<i>Glomerella parasitica</i>	Aspàrtic proteasa	Clark 1 <i>et al.</i> , 1997
<i>Ustilago maydis</i>	Aspàrtic / Metal·loproteasa	Mercado-Flores <i>et al.</i> , 2003
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	Cisteïna proteasa	Ball <i>et al.</i> , 1991
<i>Erwina (gènere)</i>	Metal·loproteasa	Ghigo 1992, Heilbronn 1995, Zhang <i>et al.</i> , 1999

Tot i l'elevat número de treballs que descriuen la presència d'activitats proteolítiques en microorganismes fitopatògens, en escassos exemples s'ha pogut demostrar el seu rol en el procés de patogenicitat. En el cas de *P. brassicae* (patogen foliar de la família de la mostassa, Cruciferae), mutants no patògens són incapaços de produir una proteasa del tipus cisteïna, i la recuperació de la patogenicitat va acompanyada de la capacitat per produir aquesta proteasa pel fong (Ball, 1991). Per altra banda, en la progressió de la malaltia que produeix el fong *B. cinerea*, hi juga un paper important una aspàrtic proteasa. La secreció d'aquesta proteasa s'observa ja en estadis primerencs d'infecció (abans de l'acció dels enzims pectolítics) i va acompanyada de la mort de les cèl·lules vegetals. A més, el desenvolupament de la malaltia es veu significativament retardada si es tracten les espores amb l'inhibidor de cisteïna proteases pepstatina (Movahedy i Heale, 1990). En un altre estudi, s'ha demostrat que extractes de paret i nòduls del oomicet *P. infestans* causen necrosis del teixit quan són injectats en fulles de patata, observant-se correlació entre els nivells d'activitat proteolítica i l'acció necròtica (Paris *et al.*, 1999). Contràriament a aquests exemples però, en la majoria dels treballs publicats, no s'ha trobat dependència entre l'activitat proteolítica i la patogenicitat del microorganisme, ja sigui en mutants defectius (Murphy i Watlton, 1996) o per inactivació directe de la proteasa (Di Pietro *et al.*, 2001). En aquests casos, el rol de les proteases extracel·lulars podria estar limitat a l'obtenció dels aminoàcids essencials pel creixement i desenvolupament del microorganisme fitopatògen.

INTRODUCCIÓ

En els casos en els que s'ha descrit una relació directa entre les proteases i la patogenicitat (principalment a nivell extracel·lular), aquestes presentaven un ampli ventall de funcions, entre les que hi trobem la **participació en la colonització del microorganisme** en la planta, la **inactivació o degradació de proteïnes defensives** de la planta hoste, o la **transformació de proteïnes pròpies del patogen** (Valueva i Mosolov, 2004).

Malgrat el fet que les parets cel·lulars vegetals estan constituïdes principalment per polisacàrids, també contenen proteïnes i fins i tot alguns enzims. Entre els casos particulars estudiats fins el moment, trobem per exemple la metal·loproteasa de *X. campestris*, que és capaç de degradar glicoproteïnes de la matriu extracel·lular de nap (Dow *et al.*, 1998). Aquest tipus de proteïnes, que es caracteritzen per un elevat contingut de residus de prolina i hidroxiprolina, són components estructurals de la paret de la cèl·lula vegetal, i juguen un paper important en la defensa "passiva" de les plantes contra els possibles patògens (Valueva i Mosolov, 2004). Altres casos similars, són per exemple les serina proteases SNP1 de *S. nodorum* que degraden proteïnes riques també en hidroxiprolines de la paret cel·lular de blat (Carlile *et al.*, 2000), o metal·loproteases de *E. carotovora* que degraden extensines de paret (proteïnes també riques en hidroxiprolines) (Dey *et al.*, 1997).

Per altra banda, es coneix que alguns enzims importants per el creixement fúngic, com és el cas de la quitina sintasa, són produïts com a proteïnes precursors, les quals són processades a la seva forma madura mitjançant activitat del tipus tripsina (Machida i Saito, 1993). Altres proteases, han estat descrites per estar involucrades en la degradació de proteïnes defensives de plantes, com quitinases i β -1-3 glucanases (Alexander *et al.*, 1994), o lectines de patata (Heilbronn *et al.*, 1995).

Altres funcions observades en proteases de fitopatògens, són per exemple, la metal·loproteasa extracel·lular del bacteri *Erwina chrysanthemi*, que processa la forma inactiva d'una pectat liasa per donar la seva forma madura, imprescindible per la maceració del teixit durant la infecció (Shevchik *et al.*, 1998). Per altra banda, també s'ha demostrat que pèptids alliberats a partir de l'acció de proteases procedents de la infecció per microorganismes patògens poden actuar com a elicitors, activant processos de defensa en la planta (Ryan, 2001).

Un cas interessant i recentment descrit, és el de les bactèries fitopatogèniques, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum* i *Erwinia amylovora*. Aquests microorganismes fitopatògens, utilitzen el **sistema de secreció tipus III** (TTSS, *type III secretion system*) durant la infecció per injectar les proteïnes efectores bacterianes dintre de la cèl·lula hoste (Cornellis i Gijsegem, 2000). S'anomenen efectores per què provoquen símptomes de malaltia en hostes susceptibles i respostes de defensa en hostes resistents. S'han descrit recentment, efectors com **XopD**, **AurXv4**, **AvrPphB** i **AvrRpt2** que tenen funció **cisteïna proteasa**, revelant que la proteòlisi de substrats de l'hoste és una estratègia important que fan servir els patògens per alterar la fisiologia de la planta

(Hoston i Mudgett, 2004). Aquests efectors imiten l'activitat de les proteïnes **ULPs** (també anomenats **proteases SUMO**, *small ubiquitin-like modifier*) en els hostes eucariotes (Li i Hochstrasser, 1999) (**Figura 26**). La SUMO s'uneix posttraduccionalment a proteïnes mitjançant un sistema de conjugació que és mecànicament anàleg al sistema de la ubiquitina (Melchior, 2000; Kurepa *et al.*, 2003). Les modificacions causades per SUMO ("sumolització") controlen diferents processos cel·lulars (Melchior, 2000; Verger *et al.*, 2000), incloent el transport nuclear, certes activitats enzimàtiques, activacions i repressions transcripcionals i la progressió del cicle cel·lular. En plantes, la "sumolització" també està lligada a l'atac per patògens (Hanania *et al.*, 1999), els estressos abiòtics (Kurepa *et al.*, 2003), la senyalització hormonal (Lois *et al.*, 2003) i el temps de floració (Murtas *et al.*, 2003). Per tant, un patògen que utilitza efectors que imiten l'activitat de ULPs pot afectar potencialment a múltiples processos cel·lulars, donant-li una avantatge selectiva per sobre de l'hoste (**Figura 26A**) (Hoston i Mudgett, 2004).

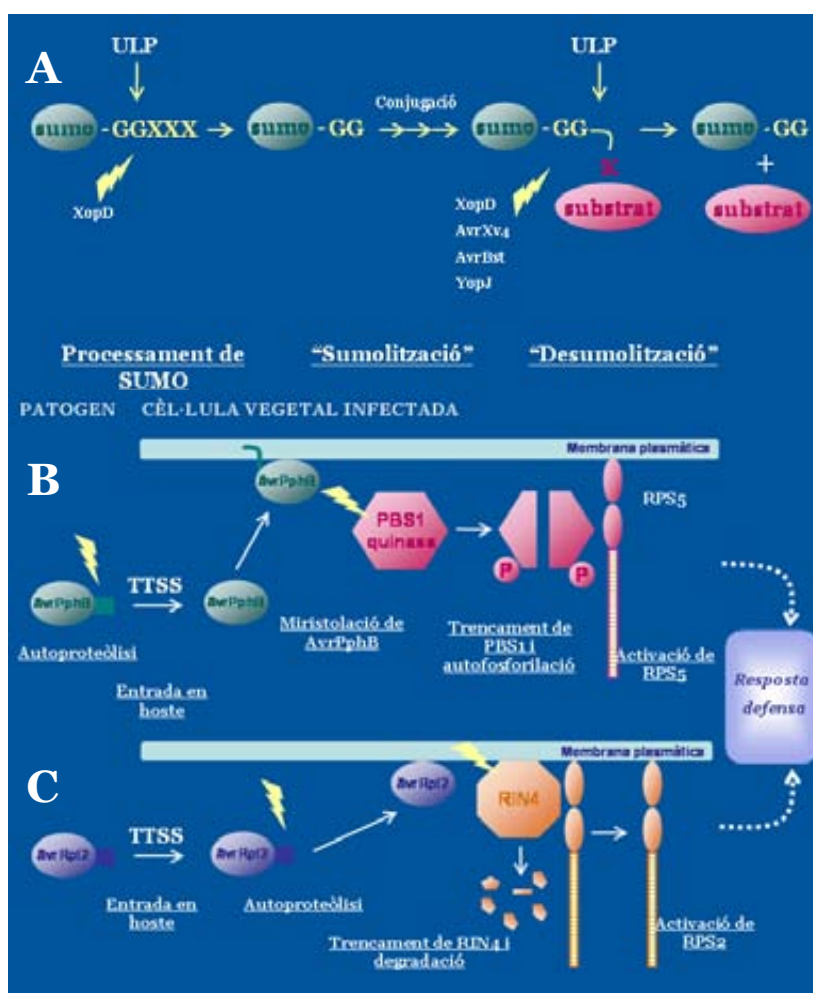


Figura 26. Model Accio Cisteïna Proteases Bacteries Fitopatògenes (Adaptat de Hoston i Mudgett, 2004). **A)** Representació esquemàtica de la via mediada per SUMO en eucariotes. SUMO, és post-traduccionalment unit a proteïnes per un mecanisme similar a la ubiquitinització. Aquesta modificació ("sumolització") és un procés reversible controlat per ULPs. Com a proteïnes, les ULPs trenquen els precursors de SUMO inactius modificant-los per donar la seva forma activa (exposant el residu Glicina [G] de l'extrem C-terminal). D'aquesta

manera es genera un enllaç isopeptídic entre el SUMO i la proteïna substrat. Així mateix, les UPLs poden trencar i alliberar la SUMO del seu conjugat (desumolitzar) com a mecanisme de regulació cel·lular. Els efectors de *Xanthomonas* (XopD, AvrVv4 i AvrBsT) i *Yersinia* (YopJ), poden mimetitzar, mitjançant la seva activitat cisteïna proteasa, la funció enzimàtica de ULP, modificant el mecanisme de regulació basat en SUMO. B) Model de l'acció de la proteasa AvrPphB en plantes resistents RPS5 d' *Arabidopsis* infectades amb *P. syringae*. El trencament de la proteïna quinasa PBS1 mitjançant l'acció cisteïna proteasa de AvrPphB (autoprocessada en la seva forma activa) porta a l'activació d'aquesta, que actua induint RPS5 i a la posterior expressió de gens de defensa. La fletxa groga indica l'activitat cisteïna proteasa. C) Model de l'acció de la proteasa AvrRpt2 en plantes resistents RPS2 d' *Arabidopsis* infectades amb *P. syringae*. AvrRpt2, s'activa mitjançant autoprocessament dintre de la cèl·lula vegetal infectada. Un cop activada i associada a membrana, processa la proteïna RIN4, que deixa de reprimir RSP2 i per tant provoca l'expressió dels gens de defensa.

6 BIOTECNOLOGIA I AGRICULTURA

6.1 Procés de transformació genètica mediada per Agrobacterium

Agrobacterium transforma genèticament la seva planta hoste transferint un petit segment de DNA (T-DNA, DNA transferit) del seu plasmidi Ti (inductor de tumors), que s'integra al genoma nuclear de la cèl·lula vegetal (Gelvin, 1998). A la natura, el T-DNA porta un conjunt d'oncogens (Gaudin *et al.*, 1994) i gens del catabolisme de les opines. L'expressió dels oncogens a les cèl·lules vegetals permet el creixement neoplàstic del teixit transformat, i la producció d'opines, derivats aminoacídics, serveix com a font de nitrogen pel bacteri. Les soques d'*Agrobacterium* recombinants, on el T-DNA original ha sigut reemplaçat amb els gens d'interès, són els vehicles més eficients utilitzats actualment per introduir gens foranis dintre de les plantes, i per tant per a la producció de plantes transgèniques (Draper *et al.*, 1988).

La maquinària molecular necessària per la producció de T-DNA i el seu transport dintre de la cèl·lula hoste, comprèn proteïnes codificades per una sèrie de gens cromosòmics bacterians (*chv*) i gens de virulència (*vir*) del plasmidi Ti. A més, s'ha vist que varies proteïnes de l'hoste participen en el procés de transformació genètica mediada per *Agrobacterium* (Tzfira i Citovsky, 2002; Gelvin, 2003), principalment durant els darrers passos del procés (per exemple, transport intracel·lular del T-DNA, entrada al nucli i integració). En la **Figura 27** s'esquematitzen els diferents passos del procés. La regió *vir*, localitzada en el plasmidi Ti d'*Agrobacterium*, codifica la majoria de les proteïnes de virulència (Vir) que utilitza el bacteri per produir el seu T-DNA i introduir-ho dintre de la cèl·lula vegetal. En soques salvatges d'*Agrobacterium*, la regió T-DNA, definida per dos repeticions directes de 25 pb anomenades **RB** (*right border*) i **LB** (*left border*) situades als extrems, en el plasmidi Ti. En les soques

d'*Agrobacterium* desarmades, la regió T-DNA s'ha eliminat del plasmidi Ti, i normalment una regió T-DNA recombinant queda en un plasmidi binari petit i autònom que funcionaria en *trans* de la regió *vir* (Draper *et al.*, 1988). Aquest sistema permet la integració del T-DNA el genoma de la planta hoste

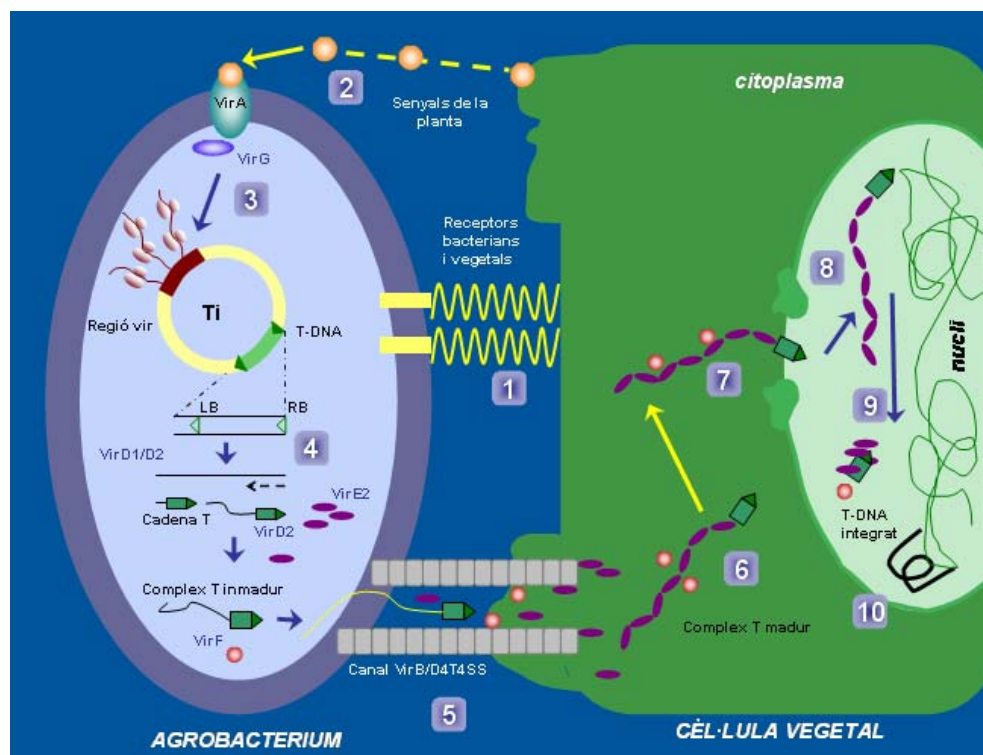


Figura 27. Model de la transformació genètica mediada per *Agrobacterium*. (Adaptat de Tzfira i Citovsky, 2006) La transformació compren 10 passos principals i s'inicia amb un reconeixement i atac a la cèl·lula hoste per part de l'*Agrobacterium* (1) i la percepció de senyals específiques provinents de la planta a través del sistema VirA/VirG de l'*Agrobacterium* (2). Després de l'activació de la regió gènica *vir* (3), es genera una còpia mòbil del T-DNA es genera pel complex proteic VirD1/D2 (4), i en forma de complex VirD2-DNA (complex T inmadur) i junt amb altres proteïnes Vir, entra en el citoplasma de la cèl·lula hoste (5). Mitjançant la unió de VirE2 amb la cadena T, es forma el complex T madur que viatja pel citoplasma cel·lular de l'hoste (6) i es transportat de forma activa al nucli (7). Una vegada al nucli, el T-DNA és portat fins el lloc d'integració (8), alliberat de les proteïnes acompanyants (9) i integrat en el genoma hoste (10).

6.2 Cultius transgènics: gens *Cry* de *Bacillus thuringiensis*

La primera planta transgènica comercialitzada va ser el tomàquet *Flavr Savr*, que havia estat modificar per a reduir els nivells de l'enzim poligalacturonidasa, enzim que fa menys rígida la paret cel·lular. A la Comunitat Europea, l'han seguit el tabac, la colza, la soja, la xicoira i el blat de moro (de consum humà o en ramaderia) i el clavell (com a espècie ornamental). La majoria de cultius transgènics autoritzats a la Unió Europea, han estat modificats per augmentar la seva tolerància o per obtenir resistències als herbicides comercials. L'aplicació de la millora genètica per la resistència a plagues i patògens apareix

INTRODUCCIÓ

per primer cop en plantes de tabac i tomàquet, transgèniques per la biotoxina Bt de *Bacillus thuringiensis* (Adang *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987; Fishoff, 1987; Vaeck *et al.*, 1987), i plantes de tabac transgèniques per un inhibidor de proteases (veure **Apartat 4.2.3**) (Hilder *et al.*, 1987). Les primeres plantes transgèniques amb propietats millorades en la resistència a fongs fitopatògens, eren plantes de tabac i arròs que expressaven gens de glucanases i quitinases (Zhu *et al.*, 1994; Jach *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995).

Bacillus thuringiensis és un bacteri gram positiu del terra que produeix gran quantitat de cristalls proteics durant la seva esporulació. Moltes soques d'aquest microorganisme mostren una activitat insecticida contra larves de certs lepidòpters, i algunes mostren toxicitat contra coleòpters o dípters. Fins ara, s'han aïllat i caracteritzat gran nombre dels gens (gens *cry*) que codifiquen per aquest tipus de proteïnes en forma de cristall. Aquests productes codificats per gens *cry*, són ingerits per les larves en forma de protoxina, i és en el seu intestí on són processades proteolíticament a les formes actives que generen la toxicitat sobre l'insecte diana. El mecanisme d'acció de les proteïnes Cry de *B. thuringiensis* es basa en el seu reconeixement per part de receptors específics de les cèl·lules vegetals del sistema digestiu de l'insecte. Aquest fet porta, en darrer terme, una lisi de les cèl·lules epitelials del tracte intestinal de l'insecte, provocant finalment a la seva mort.

En els darrers 60 anys, s'han estat diversos gens *Cry* de *Bacillus thuringiensis* com alternativa a l'ús de pesticides químics. Es tracta de proteïnes ambientalment acceptades i altament selectives cap a l'insecte plaga problema. Els gens *Bt* van ser introduïts i expressats per primer cop en tabac (Barton *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987) i tomàquet (Fischhoff *et al.*, 1987). Al 2004, l'àrea global de cultius transgènics comercials havia arribat a 81 milions d'hectàrees, de les quals, el 28% eren de cultius *Bt* (22,5 milions d'hectàrees (James 2005). Tot i que és coneixen una gran quantitat de toxines *Bt* (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), només una petita part s'utilitzen de manera habitual per desenvolupar cultius transgènics en el control de les plagues d'insectes. Els gens *Bt* més comunament utilitzats són *Cry1Ab*, *Cry1Ac* i el gen fusió *Cry1Ac/Cry1Ab* (Fujimoto *et al.*, 1993; Nayak *et al.*, 1996; Wünn *et al.*, 1996; Ghareyazie *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1998; Alam *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Així, plantes de blat de moro i cotó, que expressen el gen *Cry1* s'observa un alt grau de protecció front lepidòpters plaga, com són els barrinadors de blat de moro (*Ostrinia nubilalis*), orugues (*Heliothis virescens*), o diferents espècies del gènere *Helicoverpa* en cotó (Shelton *et al.*, 2002). El 2003, es va començar a comercialitzar el blat de moro *Bt* per al control de diferents espècies de *Diabrotica*, expressant la toxina específica per coleòpters *Cry3Bb*. En altres casos, com en patatera expressant el gen *Cry3Aa* per el control de l'escarabat de la patata Colorado, s'han comercialitzat cultius transgènics des del 1996, però han estat retirats el 2001 per qüestions socials o per l'aparició de nous insecticides d'ampli espectre. En general, una de les principals aportacions que proporciona aquest tipus de cultius són la reducció de l'ús dels pesticides

químics convencionals. En el cas de la Xina per exemple, l'ús de cultius de cotó *Bt*, ha reduït en un 60-80% l'ús d'insecticides foliars. També s'han realitzat treballs on s'han expressat fusions de diferents gens *cry*. Com a resultat s'han obtingut àmplis espectres de protecció, demostrant que l'expressió de fusions traduccionals permet generar importants nivells de resistència front insectes (Honée *et al.*, 1990; Van der Salm *et al.*, 1994).

Després que els últims 8 anys s'hagi augmentat notablement l'ús de cultius *Bt* en camp, no s'ha descrit encara cap problema pel que fa la producció de cap proteïna Cry, o l'aparició de resistències en insectes plaga diana (Farinos *et al.*, 2004). Una de les principals estratègies aplicada per reduir la possibilitat de que es doni aquest fenomen d'adaptació, és l'anomenada estratègia de "refugi", on es pretén mantenir els al·lels susceptibles a la toxina(s) Bt en la població de l'insecte mitjançant "illes" de plantes no transgèniques, i així evitar alts costos econòmics. Aquesta, és actualment, la tàctica més àmpliament emprada per evitar o retardar l'aparició de resistències (Shelton *et al.*, 2000). Més recentment però, l'ús de combinacions de gens *Bt* amb mecanismes d'acció diferents (expressió piramidal) han sorgit com a una nova estratègia per evitar la possible aparició de resistència per part dels insectes (Zhao *et al.*, 2005).

Tot i que la majoria de cultius transgènics resistents a insectes emprats, expressen gens *Cry*, els possibles problemes anteriorment citats, fan que altres estratègies en el control integrat de plagues puguin esdevenir com a bons mètodes alternatius. En aquest sentit, molècules amb modes d'acció o orígens diferents, han de ser també considerades. Així, en el cas de la resistència a insectes l'expressió d'inhibidors de proteases pot ser presentada com a una estratègia alternativa interessant, a afegir a les ja utilitzades en els cultius *Bt*. Altres estudis proposen la utilització d'estratègies combinades, com és per exemple l'expressió de toxines Bt juntament amb inhibidors de proteases (Fan *et al.*, 1999).

En aquest treball, s'empra la seqüència d'aminoàcids situada al voltant del lloc de processament del precursor de la proteïna **CryIB** de *Bacillus thuringensis* (Van der Salm *et al.*, 1994), com a seqüència d'unió de dos inhibidors de proteases, els inhibidors **MPI** i **PCI**. Aquesta seqüència compren 28 aminoàcids situats entorn el lloc d'activació de la protoxina. Aquesta regió de la protoxina, és processada proteolíticament per tripsines digestives d'insectes, per a donar la forma activa, la proteïna *CryIB*. Així doncs, s'espera que la proteïna fusió **MPI-PCI** unida a través d'aquesta seqüència de processament, pugui ser processada en el tracte digestiu de l'insecte per tal d'alliberar aquests dos inhibidors de proteases. En principi, aquesta estratègia seria aplicable en l'expressió simultània d'altres proteïnes amb activitat insecticida d'interès.

6.3 Biotecnologia i arròs

Els avenços obtinguts en l'anomenada Revolució Verda (Borlaug, 1970), a partir de la qual es va millorar notablement el rendiment per àrea cultivada, van permetre donar un salt qualitatiu i quantitatiu enorme en la producció d'arròs i, tot i que aquest augment no va poder eradicar la fam i la pobresa mundial, va ajudar a disminuir-les, principalment a l'Àsia. Aquest avenç tecnològic s'assolí mitjançant la utilització de varietats de cultiu d'alt rendiment (VAR), aconseguides per creuaments successius entre varietats. La implantació d'aquesta tecnologia va ser facilitada pel desenvolupament de millores en el reg, i sobre tot per l'ús de fertilitzants inorgànics, pesticides i nova maquinària agrícola. Malgrat tot, aquesta millora tecnològica no va poder arribar a molts països, sobretot del continent Africà, degut a mancances polítiques i d'infraestructura.

Per altra banda, en els països on sí que es va implantar la "Revolució Verda", no tots els agricultors tenien accés a les noves varietats, ni als costos dels fertilitzants o la maquinària agrícola. També cal dir, que les característiques geogràfiques (tipus de sol, clima, etc..) fan que una varietat que és altament productiva en una determinada regió, no ho sigui en una altra. A més, es van generar problemes a nivell ambiental derivats d'aquestes pràctiques, com l'esgotament d'aqüífers degut al rec intensiu, l'erosió del sòl, o sobretot, l'ús desmesurat de pesticides químics per al control de plagues. Cal tenir en compte però, que l'augment en la producció d'arròs necessari per satisfer el consum de la creixent població mundial, s'ha d'aconseguir utilitzant la mateixa, o inclús una menor àrea cultivada, amb menys disponibilitat de reg i reduint l'ús d'agents agroquímics.

Tot i la millora de varietats i tècniques emprades en el seu conreu, la producció d'arròs s'ha estabilitzat les darreres tres dècades. A més, s'estima que en els països en desenvolupament, en general, entre un 20-70% d'una potencial collita, es perd per estressos biòtics (malalties o plagues) o abiòtics (principalment sequera). Les limitacions en la millora convencional del cultiu de l'arròs es deuen bàsicament a la pèrdua de gens de resistència en el germoplasma de l'arròs cultivat degut a dècades de conreu i la pèrdua de variabilitat genètica (Datta, 2004). A Europa, les principals causes de pèrdua de les collites d'arròs són la plaga de l'insecte lepidòpter *Chilo suppressalis*, conegut com el barrinador de l'arròs, i la piriculariosi o cremat, malaltia produïda pel fong *Magnaporthe grisea* (veure **Apartat 2**).

Per tal d'incrementar el rendiment dels conreus d'arròs, actualment s'apliquen diferents estratègies, com els procediments d'hibridació i selecció convencionals o els creuaments, el desenvolupament del germoplasma per obtenir noves línies de plantes (NPT, "New Plant Types"), i més recentment, l'enginyeria genètica (Datta, 2004). La recent seqüenciació del genoma de l'arròs (International Rice Genome Sequencing Project, IRGSP) ha accelerat el descobriment de nous gens que poden ser d'utilitat per a la millora del cultiu de l'arròs. A més, cal afegir que l'arròs té un genoma petit, d'uns 430 Mb,

amb un elevat grau de colinealitat amb el genoma d'altres cereals. És una planta de fàcil transformació i anàlisi genètic, esdevenint el model per a l'estudi entre monocotiledònies (<http://www.riceweb.org>). Així mateix, s'estan desenvolupant varis programes a nivell internacional per a la creació de col·leccions de mutants d'arròs.

Reconeixent el gran valor que presenten aquests avanços per a la millora d'aquest cultiu, l'IRRI (International Rice Research Institute) situat a les Filipines està desenvolupant una intensa labor, per tal de proporcionar una millor recerca en el cultiu de l'arròs a favor dels països en desenvolupament (IRRI, 2006).

Per altra banda, l'ús abusiu d'herbicides, adobs inorgànics, pesticides i fungicides químics, utilitzats en la lluita contra malalties i plagues de l'arròs, pot portar a l'acumulació de residus nocius que poden passar a la cadena alimentària. També és de gran preocupació el fet que aquests compostos puguin passar a aigües residuals que provenen dels arrossars ja que poden portar a l'eutrofització dels ecosistemes aquàtics (Fores *et al.*, 2002). Això s'agreuja a Europa on la majoria dels arrossars estan pròxims a zones protegides o parcs naturals (Delta del Ebre, Albufera de València, les Planes del Guadalquivir, el Delta del riu Po a Itàlia, i la Camarga a França).

És per aquest motiu, que la biotecnologia vegetal, pot proporcionar un ampli ventall de possibilitats en la millora genètica de l'arròs, tant pel que fa a la seva producció (la protecció de la planta front patògens, el seu creixement en condicions severes de sequera o salinitat, etc...), com per a l'obtenció de varietats d'arròs amb millors qualitats nutricionals. Fins a l'actualitat, i mitjançant l'enginyeria genètica, són nombrosos els gens que han estat introduïts a l'arròs (**Taula VII**).

INTRODUCCIÓ

Taula VII. Tipus de gens introduïts en arròs i propietats de les plantes transgèniques. Adaptat de Datta, 2004.

Gen	Trets	Cultivar	Característiques
Xa21	Resistència a <i>Xanthomonas oryzae</i>	IR72, IR64, IR68899B, MH63, BPT5204, Pusa Basmati-1, IR50, CO39	IR72 camp avaluat a la Xina, Índia i Filipines
Bt (cry1Ab, cry1Ac, cry1Ab+cry1Ac), cryIIA	Resistència a insectes	IR72, IR64, MH63, Irri-npt, Vaidehi	IR72 i MH63 camp avaluat. Arròs Bt produït ara a la Xina
Quitinasa (chit1, RC7), tlp D-34	Resistència a <i>Rhizoctonia solani</i>	IR72, IR64, CBII, Swarna	La transgènia va demostrar una resistència augmentada al fong
Xa21 + Bt + gens PR	Resistència a <i>Xanthomonas</i> , <i>barrinador de l'arròs</i> , i a <i>Rhizoctonia solani</i>	IR72	Resistència d'ampli espectre
PPT	Resistència a herbicides	IR72, Koshihikari, NHCD etc.	Bons resultats en condicions de camp
PEPC	Arròs de C4	IR68899B	Eficàcia fotosintètica realçada
pinII	Resistència a <i>Sesamia inferens</i>	Japonica	
AFP	Resistència al fong <i>M. grisea</i>	Sénia	L'activitat de la proteïna AFP ve donada per la seva capacitat de permeabilitzar membranes del fong i unir-se a àcids nucleics
CecA	Resistència al fong <i>M. grisea</i>	Sénia	
ORF2 de la serinaproteasa i la RNA polimerasa RNA-dependent	Resistència al virus RYMV	ITA 212 (FARO 35), BOUAKÉ 189, BG90-2	Resistència demostrada dels transgènics front el virió i dosis elevades de inòculs de RNA de RYMV
TPSP, DREB	Tolerància abiòtica de la tensió	Pb-1, BR29, IR68899B	L'arròs transgènic té tolerància a la sequera, salinitat, i baixes temperatures
psy, crtI, lcy	Biosíntesi de la provitamina-A1 "Golden rice"	T-309, IR64, BR29, Nang Hong Cho Dao, Mot Bui, IR68899B, Immeyobaw	Els transgènics presenten un endosperma groguenc per l'acumulació de betacarotens
Ferritina	Emmagatzematge de Fe	IR68144, BR29	Les línies transgèniques tenen acumulació creixent de Fe i Zn en llavors

Donada l'extrema pobresa que existeix en gran part dels països en desenvolupament, on part de la població només té accés a aliments de primera necessitat com l'arròs, la producció de varietats d'arròs més nutritives es presenta com una alternativa per a la lluita contra la desnutrició en aquests països. En aquest sentit, el cas més conegut és el de l'arròs daurat (*Golden rice*), desenvolupat en els laboratoris de I. Potrykus (Swiss Federal Institute of Technology) i de P. Beyer (University of Freiburg), per a la biosíntesi del β -caroté del precursor de la vitamina A (Ye *et al.*, 2000; Datta *et al.*, 2003) (**Figura 28A**). Les deficiències en vitamina A poden ser la causa de greus problemes de ceguera infantil, en aquelles regions on l'arròs és l'aliment fonamental per la població.

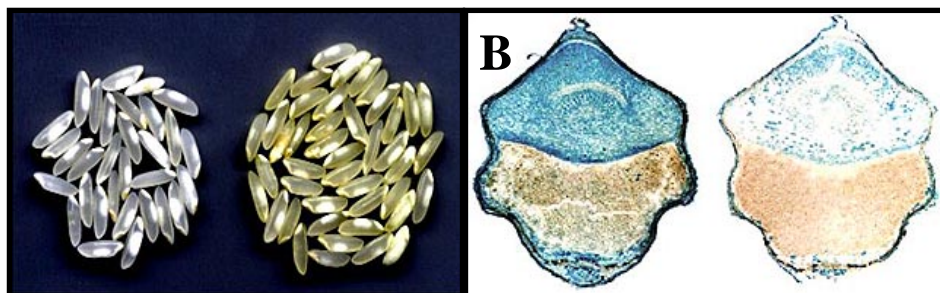


Figura 28. A) Llavors de l'anomenat "Golden Rice" expressant β -caroté (dreta) o controls sense expressió (esquerra). B) Llavors amb més contingut de ferro (esquerra) i controls (dreta).

Per altra banda, s'ha incrementat els nivells de ferro en alguna varietat mitjançant l'expressió del gen de la ferritina sota el control d'un promotor específic d'endosperm (**Figura 28B**). Aquestes millores junt amb d'altres futures (com el possible enriquiment d'aminoàcids essencials...), atorguen a la biotecnologia un paper clau en el futur per a la millora de les necessitats primàries en alimentació a nivell mundial.

7 EXPRESSIÓ SIMULTÀNIA DE GENS DE DEFENSA EN PLANTES TRANSGÈNIQUES

Fins ara, moltes de les àmplies aplicacions de la transgènia han estat realitzades mitjançant l'expressió o silenciament de transgens individuals. Actualment però, es requereix un major aprofitament dels recursos que proporciona potencialment l'enginyeria genètica, tant com a eina d'investigació, com a possible vehicle per la millora la biotecnològica de plantes.

Una aproximació atractiva per aconseguir resistència més eficaç i efectiva front un ampli rang de patògens o plagues en plantes, és l'expressió simultània de dos o més gens que codifiquen per proteïnes antimicrobianes o insecticides. Altres exemples, inclouen la producció de metabòlits particulars en les plantes mitjançant la co-expressió de múltiples transgens involucrats en les rutes de biosíntesi d'aquests metabòlits.

Hi ha diferents estratègies per obtenir plantes transgèniques que expressin més d'un transgen, tot i que aconseguir coordinar un nivell alt i estable d'expressió de múltiples transgens en plantes es sovint difícil. Els nivells d'expressió dels transgens són variables i estan influenciats per diversos factors que actuen de forma independent en els transgens. L'estabilitat d'un transgen varia entre transformants i pot variar també durant les diferents generacions d'un mateix transformant (Halpin *et al.*, 2001). En

INTRODUCCIÓ

general, la inestabilitat en l'expressió pot donar-se per la pèrdua o segregació, el reordenament o el silenciament dels transgens, i això pot acusar-se al incrementar el número de *loci* transgènics implicats i l'ús repetit de seqüències homòlogues.

Per lluitar contra aquesta variabilitat en l'expressió del transgen, han estat provades diferents estratègies. Una de les aproximacions ha estat l'ús de les seqüències MAR (*matrix attachment regions*), les quals tenen preferència per integrar-se en regions de cromatina activa, creant un "bucle" on els transgens són regulats de manera coordinada (Mylnarova *et al.*, 2002). Una segona problemàtica és el possible **silenciament del transgen**, un fenomen principalment basat en la homologia de seqüència, ja sigui per les regions codificants o per les regions promotores emprades, a més, pot donar-se a nivell transcripcional (*cis*) o post-transcripcional (*trans*). El silenciament, pot afectar l'expressió dels transgens de diferents maneres, per exemple, múltiples transgens integrats en un únic locus poden silenciar-se mutuament (*cis*-inactivació), o un locus transgènic pot ser afectat per un altre (*trans*-silenciament). La *cis*-inactivació ha estat observada sobretot quan s'introdueixen múltiples transgens sota el control d'un promotor fort en el genoma hoste (Halpin *et al.*, 2001). De totes maneres, són pocs els treballs que hagin estudiat en profunditat els esdeveniments de silenciament transgènic al llarg de les diferents generacions (Mylnarova *et al.*, 2002, 2003).

Una de les primeres estratègies utilitzades per a l'expressió simultània de diferents gens, ha estat introduir cada transgen individualment a través d'esdeveniments independents de transformació, per després realitzar **creuaments** de les línies que expressen individualment cada transgen (Zhu *et al.*, 1994; Bizily *et al.*, 2000). L'inconvenient d'aquest mètode és que el creuament ha de realitzar-se amb poblacions homozigotes per a cada un dels transgens, el que involucra diferents transformacions i la caracterització per separat de les plantes parentals amb còpies úniques del transgen. De totes maneres però, aquests passos són recomendables per tal de minimitzar els problemes potencials de la variabilitat en els nivells d'expressió i estabilitat del transgen. Aquest estratègia no és però aplicable a cultius que es propaguen vegetativament. Per altra banda, un dels principals problemes associats a l'expressió de transgens independents és la variabilitat en els seu nivells d'expressió, variabilitat que pot ser deguda al número d'integracions (Stockhaus *et al.*, 1987; Van der Hoeven, 1994), el lloc d'integració (regions promotores, regions codificants,...) (An, 1986; Matzke i Matzke, 1998), o per propietats estructurals i funcionals de la cromatina que envolta la regió d'integració (Halpin *et al.*, 2001). Tot i aquestes consideracions, i a nivell de recerca, s'han obtingut bons resultats en alguns casos, com és per exemple en la producció de plantes amb els gens insecticides *cry1Ac* i *cry1C* (Cao *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). S'han obtingut també resultats similars en arròs, combinant gens antimicrobians com el *Xa21* (contra *Xanthomonas oryzae*) i una quitinasa, amb gens insecticides com gens *Cry* (contra el barrinador de l'arròs *Scirpophaga incertulas*) (Datta *et al.*, 2002).

Una possible alternativa, és introduir els diferents transgens mitjançant **co-transformació** (introducció simultània de 2 o més gens en diferents vectors per a la transformació, cadascun portador d'un transgen) o **re-transformació** (passos seqüencials de transformació) sobre una mateixa planta. Tot i l'avantatge de ser un procés més ràpid, els inconvenients en aquest cas són la necessitat d'utilitzar diferents gens de selecció per cada pas de transformació; i a més no es soluciona el problema de la variabilitat d'expressió de cadascun dels transgens, tal i com s'ha comentat anteriorment. Tot i això, en alguns casos s'han obtingut bons resultat amb la re-transformació, com per exemple amb enzims relacionats amb la coloració dels pètals d'espècies ornamentals (Rosati *et al.*, 2003), enzims de tolerància a salinitat en tabac (Singla-Pareek *et al.*, 2003) o enzims implicats en la síntesi del midó en patata (Jobling *et al.*, 2002). Un dels exemples més coneguts de co-transformació, és l'anomenat "golden rice", on s'han introduït múltiples gens de la síntesi dels carotenoids (Datta *et al.*, 2003). En molts dels treballs realitzats emprant co-transformació s'ha descrit que, amb aquesta aproximació es generen nombroses integracions i/o vàries còpies de un o diferents transgens, i només en alguns casos s'ha assolit un patró d'expressió comparable entre els diferents transgens (Halpin, 2005).

Una altra opció és la "**introducció lligada**" dels diferents transgens, és a dir, cadascun dels transgens amb el seu propi promotor i terminador, posicionats de manera contínua dintre d'un mateix vector de transformació (per exemple dins d'un mateix T-DNA per transformar mitjançant *Agrobacterium*) (Slater *et al.*, 1999; Abdden *et al.*, 2005). Aquesta estratègia no obstant, requereix l'ús de promotors diferents per a dirigir l'expressió de cada transgen ja que, tal i com s'ha comentat anteriorment, l'integració de varies còpies del mateix promotor en el genoma de la planta pot portar al silenciament transcripcional dels transgens. De totes maneres, existeix un número limitat de promotors disponibles que presentin nivells similars d'expressió, especificitat temporal i espacial, i resposta als diferents factors ambientals. A més, també s'ha descrit que pot existir variabilitat en l'expressió dels transgens, inclús dins del mateix T-DNA, degut a la posició que n'ocupa cadascun (Breyne, 1992).

7.1 Sistemes per a l'expressió de gens fusió

Una de les maneres per aconseguir superat les dificultats per a l'expressió simultània coordinada de diferents transgens, sense la necessitat d'utilitzar diferents seqüències reguladores (promotors, terminadors o més d'un gen de selecció), és expressar més d'un gen d'interès en una única unitat transcripcional. Existeixen actualment, diferents alternatives per dur a terme aquesta estratègia, malgrat això cap ha estat àmpliament aplicada en plantes.

INTRODUCCIÓ

Una de les estratègies fins ara estudiades, per a la producció de múltiples proteïnes a partir d'un transcrit, és separar les regions codificants de cada una de les proteïnes d'interès, amb llocs interns d'accés per als ribosomes o **IRESs** (*internal ribosomal entry sites*) (**Figura 29A**). Aquesta estratègia, és utilitzada per diferents virus i se n'ha demostrat la seva funcionalitat en plantes (Urwin *et al.*, 2000, 2002; Dorokhov *et al.*, 2002; Jaag *et al.*, 2003). Es tracta de seqüències específiques, habitualment de varis centenars de nucleòtids, que poden dirigir els ribosomes cap a posicions internes del mRNA, iniciant així la traducció de manera independent a l'inici de la traducció. Un dels principals desavantatges d'aquest sistema és la diferent traducció dels cistrons, la qual sembla disminuir significativament a mesura que s'avança en el policistró (Halpin, 2005). A part d'aquesta pèrdua d'efectivitat, altres factors negatius són el seu tamany, i el fet que si s'utilitza el mateix IRES en una construcció policistrònica, es pot donar silenciament pels mecanismes anteriorment explicats (Halpin, 2005).

Una nova oportunitat va sorgir amb les tecnologies per manipular el genoma dels plastidis (Bock and Khan, 2004). El gran avantatge de la transformació d'aquests orgànuls rau en la facilitat per introduir operons bacterians en el cloroplast, on les seves senyals reguladores (incloent seqüències d'iniciació internes) són reconegudes. Els resultats obtinguts fins ara amb aquest sistema, han mostrat que es tracta d'una aproximació eficaç per a la producció de proteïnes recombinants (arribant al 45 % de la proteïna total soluble) i superant problemes com el silenciament de manera eficaç. A més, l'expressió en cloroplasts redueix el risc de flux gènic via polen. Alguns dels desavantatges d'aquest sistema són que actualment només és aplicable a cultius que poden ser fàcilment transformats amb aquest sistema, i per a certs tipus de proteïnes que no requereixen modificacions transcripcionals o direccionament cap altres localitzacions subcel·lulars.

Una altre estratègia per a la producció de múltiples proteïnes a partir d'una poliproteïna precursora codificada per una única unitat transcripcional, es basa en la utilització de seqüències d'origen viral. Els *Potyvirus*, per exemple, tradueixen el seu RNA genòmic en una única poliproteïna precursora que conté dominis amb activitat proteolítica capaç de tallar la proteïna precursora en *cis* i alliberar les proteïnes individuals (Carrington & Dougherty, 1988). Molts grups han utilitzat aquesta aproximació mitjançant la **proteasa NIa** (48 KDa) d'alguns d'aquests virus, flanquejada en ambdós costats per les seqüències de processament (**Figura 29B**). Algunes de les limitacions que presenta aquesta estratègia són el gran tamany de les proteases i la dificultat per dirigir les proteïnes a altres compartiments cel·lulars, ja que la traslocació de la poliproteïna sovint és més ràpida que el seu processament. Un altre desavantatge d'aquest sistema, és que és necessari produir proteases virals, juntament amb les proteïnes d'interès, proteases que poden causar la degradació de proteïnes endògenes i per tant, provocar efectes col·laterals no desitjables.

Una de les aproximacions més senzilles per l'obtenció de poliproteïnes codificades en una sola pauta de lectura, es basa en fusionar les diferents proteïnes per seqüències d'enllaç que són substrat per a proteases de la cèl·lula hoste (**Figura 29C**). Després de la traducció, la proteïna és processada correctament durant el seu pas a través del sistema d'endomembrana, o bé en el citoplasma. Aquest sistema ha estat utilitzat per a expressar la fusió de dos inhibidors de proteases en *Arabidopsis* (Urwin *et al.*, 1998). La mateixa estratègia fou utilitzada per produir dos proteïnes antimicrobianes emprant una seqüència d'enllaç d'una poliproteïna precursora de varies proteïnes antifúngiques produïda en llavors de *Impatiens balsamita* (François *et al.*, 2002). En ambdós casos, tot i que resulten en un eficaç processament post-traduccional, les proteases implicades són desconegudes (Halpin, 2005). El desavantatge d'aquesta estratègia és la dependència d'una sincronització tant temporal com espacial de la proteasa i la proteïna fusió.

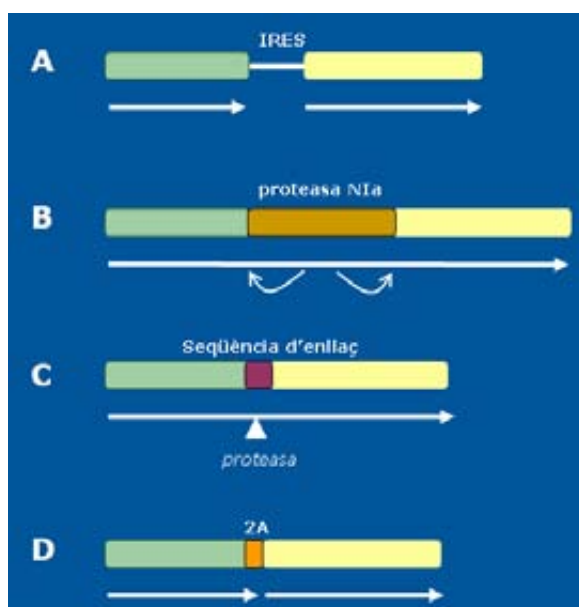


Figura 29. Sistemes per l'expressió de poliproteïnes. (A) IRESs (B) proteasa NIa (C) seqüència d'enllaç diana per proteasa, que prové del precursor de la proteïna de *I. balsamita* (François *et al.*, 2002) (D) seqüència de processament 2A del virus FMDV (Halpin *et al.*, 1999)

7.1.1 Seqüència processament 2A

Tal i com ja s'ha comentat, la unió de proteïnes en una única pauta de lectura és una estratègia que duen a terme molts virus, especialment els virus RNA+. Després de la traducció, les poliproteïnes són processades per proteases, codificades en la pròpia poliproteïna, que actuen en *cis*. Malgrat això, en el cas concret dels virus de la febre aftosa (FMDV, *foot-and-mouth disease virus*) una seqüència anomenada **2A**, de només 20 aminoàcids, sembla tenir la capacitat de mediar el processament en el seu propi extrem carboxi-terminal, per un tipus de reacció aparentment independent de proteases, i que es dona co-traduccionalment. De fet, la seqüència 2A pot funcionar independentment del context de la proteïna FMDV, i la regió flanquejant pot ser totalment reemplaçada per gens heteròlegs. Així, Halpin i col·laboradors (1999), van fusionar la regió codificant de dos gens informadors mitjançant els 20

INTRODUCCIÓ

aminoàcids d'aquesta seqüència viral. Van construir un gen quimèric, on la seqüència 2A estava inserida entre els gens CAT (*Chloramphenicol acetyltransferase*) i GUS (*β -glucuronidase*) mantenint una única pauta de lectura (**Figura 29D**). Aquesta poliproteïna va ser eficientment processada a les proteïnes CAT-2A i GUS tant en lisats de reticulòcits com en cèl·lules de mamífers. També en aquest estudi, es reporta l'expressió del gen fusió CAT-2A-GUS en plantes transgèniques de tabac. Ambdós gens informadors eren traduïts correctament, obtenint-se les dues proteïnes funcionals evidenciant que en la cèl·lula de tabac el processament es produïa de manera correcta i efectiva.

Estudis més recents, mostren que el pèptid 2A pot mediar el processament de la poliproteïna mitjançant un mecanisme no proteolític, que sembla involucrar un procés d'escapament del ribosoma (*intra-ribosomal "skip"*) durant la traducció, de manera que l'enllaç peptídic no es forma entre els aminoàcids 19 i 20, permetent no obstant la continuació de la traducció (Donnelly *et al.*, 2001). D'aquesta manera la primera proteïna incorpora una extensió C-terminal de 19 aminoàcids del 2A, mentre que la segona proteïna inclou una prolina en el seu extrem N-terminal.

El petit tamany del 2A representa un avantatge per a la producció de diferents proteïnes codificades en una única unitat transcripcional. Un possible desavantatge però, és la unió del pèptid 2A en els extrems de les proteïnes processades, principalment els 19 aminoàcids en l'extrem C-terminal de la primera proteïna.

Fins el moment, s'ha descrit l'ús d'aquesta l'estratègia de processament mediada per el pèptid 2A en diferents sistemes eucariotes, incloent cèl·lules de mamífers, insectes, llevats i fongs (Roosien *et al.*, 1990; Ryan i Drew, 1994; Suzuki *et al.*, 2000; Varnavski *et al.*, 2000; de Felipe *et al.*, 2003; François *et al.*, 2004). En plantes, a més del treball de Halpin i col·laboradors (1999) en tabac, el pèptid 2A també ha estat satisfactòriament emprat per altres autors també en tabac (El Armani *et al.*, 2004; Ma i Mitra, 2002) o en *Arabidopsis* (François *et al.*, 2004).

En aquest treball s'avalua l'utilitat de l'estratègia de l'autoprocessament de poliproteïnes basat en la seqüència 2A per a l'expressió coordinada de dos inhibidors de proteases, MPI i PCI.

7.2 Gens reguladors de la resposta de defensa de les plantes com a transgens

Una estratègia diferent a la comentada a l'apartat anterior per obtenir una expressió simultània de diferents gens de defensa (en aquest cas gens endògens), és la transformació amb gens reguladors d'una via de senyalització de la resposta de defensa. En aquest sentit, la recent caracterització de gens

clau en la resposta de defensa en plantes, com el *NPRI* o factors del tipus *WRKY*, faciliten la seva aplicació per tal d'obtenir varietats més resistents i front un major rang de patògens, que l'expressió individual de diferents gens antimicrobians.

Tal i com s'explica en l'**Apartat 3.2.2**, s'han descrit fins el moment alguns factors *WRKY* d'arròs, com els *OsWRKY71* i *OsWRKY03*, ambdós involucrats en la resposta a estressos biòtics en arròs (Liu *et al.*, 2006). La sobreexpressió d'aquests gens en arròs, augmenta l'expressió de *OsNHI* i *OsPR1b*, confirmant la conservació d'aquesta via similar a *Arabidopsis* i demostrant que una expressió simultània amb aquesta estratègia és factible (Liu *et al.*, 2006).

En el cas del gen *NPRI* d'*Arabidopsis*, a més, cal afegir que s'han trobat homòlegs en altres espècies, com tabac, tomàquet, poma, taronja i arròs (Durrant i Dong, 2004), suggerint que la seva funció pot estar conservada en altres espècies de plantes. Aquest fet està recolzat pels resultats obtinguts amb la sobreexpressió de la *AtNPRI* en arròs, que li confereix resistència front el patògen bacterià *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Chen *et al.*, 2001). Per altra banda, la sobreexpressió del seu gen homòleg en arròs (*OsNHI*), genera també una resistència incrementada front aquest mateix patògen, suggerint l'existència d'una via de defensa molt similar en arròs. En un altre treball, quan el gen *AtNPRI* es sobreexpressa en una varietat de blat susceptible a *Fusarium graminearum*, es confereix resistència heretable a aquesta malaltia (Makandar *et al.*, 2005). L'expressió del marcador *PR1* es mostra induïda a nivells elevats en aquestes plantes transgèniques (Makandar *et al.*, 2005). De la mateixa forma, quan s'introdueix el gen *AtNPRI*, en tomàquet, les línies transgèniques que l'expressen presenten un augment significatiu en la resistència al "pansiment bacterià" (BW, *Bacterial wilt*) i al "pansiment per *Fusarium*" (FW, *Fusarium wilt*), i un augment moderat de la resistència a la "taca grisa de les fulles" (GLS, *gray leaf spot*) i a les "taques bacterianes" (BS, *bacterial spot*) (Makandar *et al.*, 2005). En aquest treball de tesi, s'estudia l'efecte de l'expressió del gen *AtNPRI* d'*Arabidopsis* en plantes d'arròs en termes de protecció de les plantes front patògens.

INTRODUCCIÓ

Aquest treball s'emmarca dins d'una de les principals línies de recerca del nostre grup, dirigida a l'avaluació d'estratègies aplicables a l'obtenció de varietats d'arròs resistents a patògens i/o insectes plaga mitjançant la transformació genètica. L'objectiu general perseguit ha estat l'expressió simultània de gens que codifiquen proteïnes insecticides o antifúngiques en plantes d'arròs transgèniques. Primerament, s'ha plantejat avaluar l'eficàcia de l'expressió d'un gen fusió codificant dos inhibidors de proteases per a la protecció front insectes plaga, i la comparació dels resultats així obtinguts amb els que s'observen mitjançant l'expressió individual de cadascun d'ells. Per altra banda, per tal d'aconseguir millorar la resistència de varietats d'arròs front patògens s'ha avaluat la utilització d'un gen regulador de la resposta de defensa en plantes d'*Arabidopsis*, el gen *NPRI*, com a estratègia per la inducció simultània de varis gens de defensa endògens de la planta d'arròs mitjançant la utilització d'un únic transgen.

Els objectius concrets d'aquest treball han estat:

I. Expressió simultània dels gens *mpi* (*maize proteinase inhibitor*) de blat de moro i *pci* (*potato carboxipeptidase inhibitor*) de patata en plantes d'arròs.

S'han assajat tres estratègies: 1) expressió d'un gen fusió MPI-PCI mitjançant l'ús d'una seqüència d'autoprocessament vírica com a seqüència d'unió entre les proteïnes MPI i PCI (processament "*in planta*" de la proteïna fusió); 2) expressió d'un gen fusió MPI-PCI mitjançant l'utilització de la una seqüència de processament del precursor de la proteïna Cry1B de *Bacillus thuringiensis* com a seqüència d'unió entre ambdós inhibidors (processament de la proteïna fusió en el tracte digestiu de l'insecte); 3) d'encreuaments sexuals de plantes d'arròs amb expressió individual *mpi* o *pci*. L'objectiu plantejat va ser determinar si les estratègies assajades confereixen protecció a la planta d'arròs, i si els nivells de protecció són superiors als que s'observen quan s'expressa un d'aquests gens de manera individual. Es va plantejar també determinar l'efecte de l'expressió d'aquests gens en plantes d'arròs sobre el creixement i les activitats proteolítiques digestives de larves d'insectes alimentades en aquestes plantes transgèniques. Per fer-ho, es va fer necessari realitzar un estudi inicial per tal de caracteritzar el sistema de proteases digestives d'insectes plaga per l'arròs: *Chilo suppressalis* i *Spodoptera littoralis*.

- Per dirigir l'expressió d'un gen fusió *mpi-pci* en plantes d'arròs s'escollí el promotor induïble per ferida del propi gen *mpi* de blat de moro. Es va plantejar per tant, un estudi inicial per comprovar si aquest promotor dirigeix l'expressió i acumulació del seu propi

OBJECTIUS

producte gènic, la proteïna MPI, en resposta a ferida en diferents teixits de la planta transgènica d'arròs.

- Expressió del gen *pci* en plantes d'arròs sota control d'un promotor constitutiu, determinació del seu efecte de protecció front larves de *C. suppressalis*, i sobre el creixement de *C. suppressalis* i *S. littoralis*. Si bé, no va ser un objectiu plantejat a l'inici del treball, en el transcurs del mateix va sorgir l'interès per estudiar la capacitat de l'inhibidor PCI per actuar com a agent antifúngic.

II. Expressió del gen regulador de la resposta de defensa *AtNPR1* d'*Arabidopsis thaliana* en plantes d'arròs

- Obtenció i caracterització de plantes d'arròs que expressen el gen *AtNPR1* sota control d'un promotor constitutiu.
- Avaluació de les propietats de resistència/susceptibilitat de les plantes d'arròs *AtNPR1* en situacions d'infecció per diferents tipus de fitopatògens (fongs, bacteries i virus). Efecte de l'expressió en transgènia del gen *AtNPR1* sobre els mecanismes de defensa endògens de la planta d'arròs.
- Efecte de la sobreexpressió del gen *AtNPR1* en condicions d'estrès abiòtic.

I. INHIBIDORS DE PROTEASES COM AGENTS INSECTICIDES I/O ANTIFÚNGICS

I.A INHIBIDORS DE PROTEASES CONTRA INSECTES

En aquest treball s'han assajat estratègies per a la protecció de les plantes d'arròs front els insectes plaga, *Chilo suppressalis* i *Spodoptera littoralis*, basades en la utilització com a transgens que codifiquen inhibidors de proteases, els gens *mpi* i *pci*.

Prèviament a la realització d'aquests estudis, es van portar a terme uns experiments per tal de conèixer millor el sistema de proteases que opera en el tracte digestiu de les larves d'aquests insectes, així com per a determinar l'efecte dels inhibidors de proteases MPI i PCI sobre les mateixes. Per fer-ho, en primer lloc es van realitzar assaigs d'inhibició *in vitro* de l'activitat proteolítica d'extractes proteics per MPI i PCI (**Apartat I.A.1**), i posteriorment es va determinar l'efecte de la producció *in planta* de l'inhibidor MPI sobre les proteases digestives de *C. suppressalis* (**Apartat I.A.2.1**), insecte lepidòpter especialitzat de l'arròs.

I. A. 1 Perfil d'activitats proteolítiques digestives dels lepidòpters: *C. suppressalis* i *S. littoralis*

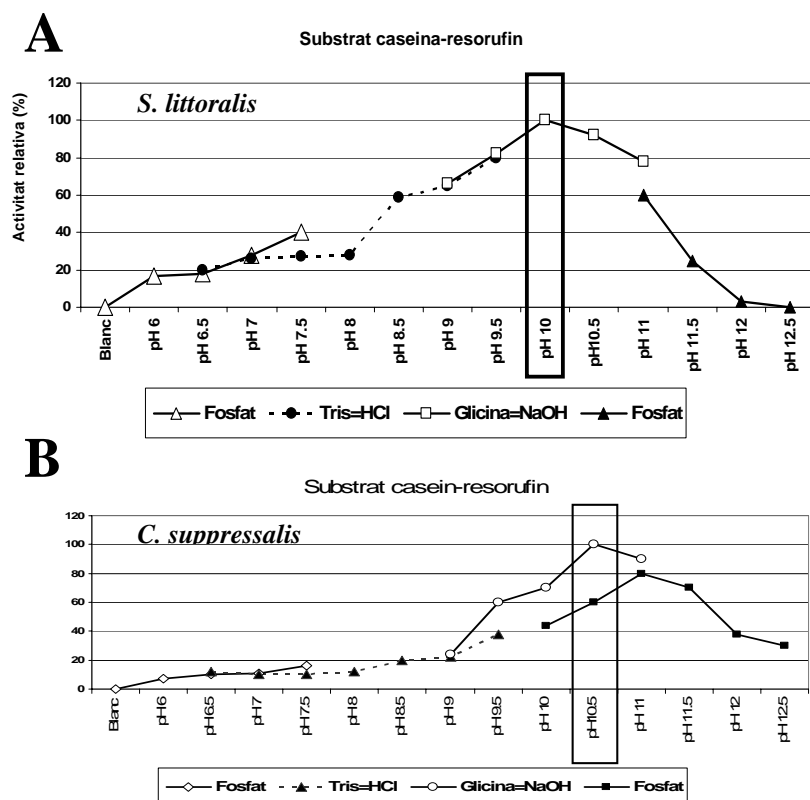
S'han realitzat estudis per tal de caracteritzar les principals proteases que actuen en el sistema digestiu de les larves de *C. suppressalis* en ser alimentades en plantes d'arròs, amb la finalitat de poder determinar posteriorment l'efecte de la ingestió dels inhibidors MPI i PCI produïts en plantes transgèniques sobre el seu sistema proteolític digestiu. Per fer-ho, es va extreure el tracte digestiu de les larves alimentades en plantes d'arròs Sénia (control), i es van preparar extractes dels intestins tal i com s'explica a l'apartat de materials i mètodes.

Per altra banda, i per tal de dur a terme un estudi comparatiu, es va decidir analitzar de la mateixa manera, les activitats proteolítiques del tracte digestiu de larves del lepidòpter *Spodoptera littoralis*. En aquest cas, es varen utilitzar larves L3, cedides pel grup de la Dra. G. Rossell (IIQAB-CSIC, Barcelona), i se'ls hi van extreure els intestins de la mateixa manera. En estudis anteriors realitzats al nostre laboratori, fent servir el substrat general per proteases, caseïna-resorufin, es va demostrar que la màxima activitat proteolítica total dels extractes digestius de *Chilo* es produeix a pH 10.5 (tampó glicina-NaOH pH 10.5 amb 0.15M NaCl) (Vila, 2003). De la mateixa manera en aquest treball, es va realitzar un estudi per tal de determinar el

RESULTATS

pH òptim de les activitats proteolítiques totals en extractes digestius de *Spodoptera littoralis*. Amb aquesta finalitat s'emprà una sèrie de tampons amb diferents pHs compresos entre 6 i 12.5.

Tal i com es mostra a la **Figura 30A**, la major hidròlisi de caseïna es dona a pH 10 (tampó glicina-NaOH 10). En la **Figura 30B** es mostra el perfil de l'activitat proteolítica el tracte digestiu de *C. suppressalis* (màxim a pH 10,5 ; Vila, 2003).



Així doncs, els assaigs posteriors d'activitats proteolítiques totals realitzats amb extractes intestinals de *Chilo suppressalis* i *Spodoptera littoralis*, es realitzaren a pH 10,5 i pH 10,0 respectivament (tampó glicina-NaOH).

Per tal de determinar la participació de proteases concretes en el sistema digestiu dels lepidòpters plaga *C. suppressalis* i *S. littoralis*, es va utilitzar una bateria d'inhibidors dirigits a diferents tipus de proteases. A la **Taula VIII** es mostren els inhibidors emprats i el tipus de proteasa sobre la que actuen. En cada cas, es realitzà una pre-incubació de 30 min amb els extractes digestius i l'inhibidor corresponent, abans de l'assaig d'activitat sobre el substrat general caseïna-resorufin.

Taula VIII. Inhibidors de proteases utilitzats i proteases sobre les que actuen. Es mostren entre parèntesis les concentracions emprades en aquest treball.

INHIBIDOR (Concentració)	TIPUS DE PROTEASA INHIBIDA
Aprotinina (5 µM)	SERINA (Tripsina)
SBBI (10 µM) (Inhibidor Bowman-Birk de soja)	SERINA (Tripsina i Quimotripsines)
STI (10 µM) (Inhibidor de Tripsina de soja)	SERINA (Tripsina)
Elastatinal (100 µM)	SERINA (Elastasa)
Quimostatina (100 µM)	SERINA (Quimitripsina) i CISTEÏNA*
Leupeptina (100 µM)	SERINA i CISTEÏNA
E-64 (100 µM)	SERINA (Tripsina **) i CISTEÏNA
Cistatina (10 µM)	CISTEÏNA
Pepstatina (10 µM)	ASPÀRTIC
EDTA (1 mM) (àcid etilenediaminetetraacètic)	METAL-LOPROTEASES
MPI (10 µM)	SERINA (Elastasa i Quimotripsina)
PCI (10 µM)	METAL-LO (Carboxipeptidasa A i B)

* Quimostatina, s'ha descrit que inhibeix proteases digestives de tipus Cisteïna de les larves d'insectes lepidòpters (Jongsma *et al.*, 1996; Novillo *et al.*, 1997).

** E64, s'ha descrit que inhibeix proteases digestives de tipus tripsina de les larves d'insectes lepidòpters (Novillo *et al.*, 1997).

El nivell d'activitat proteolítica dels extractes digestius en presència o en absència de cadascun dels inhibidors és un indicador de la contribució relativa de cadascuna dels tipus de proteases dins del complement total de proteases digestives. Els resultats obtinguts es mostren a la

Figura 31.

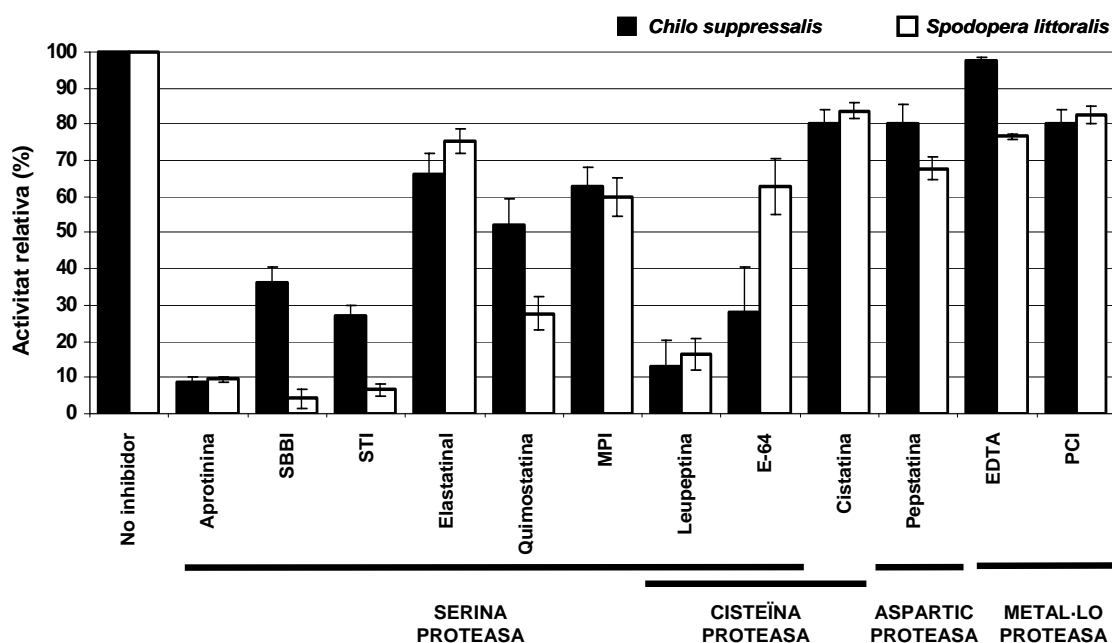


Figura 31. Efecte d'inhibidors de proteases específics sobre les activitats proteolítiques de larves de *Chilo suppressalis* (columnes negres) i *Spodoptera littoralis* (columnes blanques). S'utilitzaren 5 µg d'extracte de proteïnes, i el substrat general proteic caseïna-resorufin. Els valors s'expressen com el percentatge de l'activitat relativa de l'extracte preincubat amb l'inhibidor (respecte activitat total de l'extracte no preincubat amb l'inhibidor). Els inhibidors i concentracions utilitzades foren les detallades a la Taula VIII. Es van realitzar tres rèpliques per cada assaig. Les barres representen el promig ± l'error estandard de la mitja (ESM).

RESULTATS

Els inhibidors aprotinina, inhibidor Bowman-Birk de soja (SBBI), inhibidor de tripsines de soja (STI) i quimostatina, inhibeixen eficientment l'activitat proteolítica total, demostrant que tant *Chilo suppressalis* com *Spodoptera littoralis*, empren majoritàriament les serina proteases, en el seu tracte intestinal, concretament les tripsines i quimotripsines. Es van observar però, diferències en l'efecte dels inhibidors de tripsina, SBBI i quimostatina entre les proteases de *Spodoptera* i *Chilo*, essent les activitats de *Spodoptera* més susceptibles a la inhibició en ambdós casos. Per altra banda, l'inhibidor d'elastases, elastatinal, inhibia el 36,2% i 25% de les activitats proteolítiques de *Chilo* i *Spodoptera*, respectivament (activitats residual, 63,8% i 75%). També es va determinar l'efecte inhibitori de la proteïna MPI sobre l'activitat proteolítica present en els extractes d'intestins obtinguts de larves de *C. suppressalis*. Fent servir 1 µg de MPI en la barreja de pre-incubació dels assaigs d'inhibició *in vitro* (equivalent a una concentració de 3 µM de MPI) es va inhibir el 40% de l'activitat proteolítica total present en els extractes d'intestins de larves alimentades amb plantes d'arròs Sènia (activitat residual: 60%). Un increment en la quantitat d'inhibidor no es traduïa en un augment en el percentatge d'inhibició. Tanmateix, l'activitat proteolítica total de les larves de *C. suppressalis* i *S. littoralis*, presentava una elevada susceptibilitat a l'inhibidor de Serina i cisteïna proteases, leupeptina (activitats residuals, 13% i 16.35%), mentre que presentaven menor susceptibilitat a la cistatina, inhibidor de cisteïna proteases (activitats residuals, 80.3% i 83.6%).

Per un altra banda, l'inhibidor químic E-64, pel què s'ha descrit que té activitat inhibidora front cisteïna i serina proteases d'insectes (Novillo *et al.*, 1997), es va mostrar més eficient inhibint les proteases de *C. suppressalis* (activitat residual, 27.9%) que de *S. littoralis* (activitat residual, 62.8%). L'inhibidor pepstatina redueix l'activitat proteolítica de *C. suppressalis* i *S. littoralis* en un 20% i un 30%, respectivament (activitat residual, 80% i 70%, respectivament) indicant que les aspàrtic proteases, encara que no són activitats majoritàries, són també presents a l'intestí d'ambdós lepidòpters. El PCI, l'inhibidor de metal·locarboxipeptidases de patata (proteïna cedida pel grup del Dr. F.X. Avilés, UAB), redueix aproximadament en un 20% les activitats proteolítiques digestives d'ambdós insectes, *C. suppressalis* i *S. littoralis* (activitats residuals, 80.0% i 82.6%, respectivament), indicant que les carboxipeptidases són també actives als intestins d'aquests dos insectes lepidòpters. Finalment, l'agent quelant EDTA no inhibí significativament l'activitat proteolítica de *C. suppressalis* (activitat residual, 97.5%) mentre que sí mostrà certa inhibició sobre l'activitat proteolítica digestiva de *S. littoralis* (activitat residual, 76.6%).

Així doncs, el sistema d'activitats proteolítiques digestives que s'observa en el tracte digestiu de *Chilo suppressalis* i *Spodoptera littoralis*, és consistent amb les dades ja publicades sobre insectes lepidòpters, amb una participació majoritària de proteases del tipus serina proteasa.

S'observen així mateix diferències en la contribució dels diferents tipus de proteases entre els dos insectes lepidòpters: *C. suppressalis* i *S. littoralis*. Però, no hem de descartar la possibilitat que les diferències observades en l'efectivitat d'inhibició de les activitats proteolítiques entre els dos insectes sigui deguda a diferències en l'afinitat de cada inhibidor amb la seva proteasa (-es) diana en cada insecte. El fet que les larves de *Chilo* utilitzades en aquest treball haguessin sigut alimentades en plantes d'arròs, mentre que les de *Spodoptera* ho havien estat de medi sintètic, també podria explicar les diferències observades entre ambdós.

I. A. 2 Plantes d'arròs que expressen de manera induïble el gen *mpi*

En el nostre laboratori, va ser aïllat i caracteritzat el gen *mpi* present en un fragment de 12Kb de DNA genòmic de blat de moro, clonat en el bacteriòfag lambda (λ m35) (Cordero *et al.*, 1994). Es van dissenyar oligonucleòtids i mitjançant PCR, es van obtenir la regió codificant i les reguladores (promotor i terminador) del gen *mpi*. Es van obtenir dos fragments de DNA portadors del gen *mpi* que diferien només en la longitud de la zona promotora (fragment curt **C1*mpi*** i fragment llarg **2K*mpi***) (Vila, 2003). Aquestes dues regions promotores del gen *mpi* de blat de moro, presenten un nombre de seqüències concretes descrites en la literatura com elements de resposta a metil-jasmonat (MeJa). A la **Figura 17 (Introducció)** es mostra la seqüència del gen *mpi* (fragment C1*mpi* 2K*mpi* -1871/+197) i les diferents caixes o possibles motius reguladors presents en aquesta seqüència.

Estudis anteriors realitzats en el nostre laboratori en blat de moro, demostraren que el gen *mpi* era induïble mitjançant ferida mecànica i tractament amb les fitohormones MeJA i ABA (Cordero *et al.*, 1994). En posteriors estudis, es va provar que els fragments **C1** (-689/+197) i **2K** (-1871/+197) de la regió promotora del gen *mpi* confereixen expressió induïble per ferida del gen informador *uidA* (GUS) en fulles d'arròs (Vila, 2003; Moreno *et al.*, 2005). El gen *mpi*, bé sota el control del promotor llarg (**2K*mpi***) o bé sota el control del promotor curt d'aquest gen (**C1*mpi***), foren clonats en el vector pCAMBIA1300 i emprats per transformar arròs de la varietat Ariete mitjançant *Agrobacterium* (Vila, 2003).

En iniciar aquest treball es disposava ja de línies transgèniques d'arròs que expressaven de forma constitutiva el gen *mpi* (varietats Ariete i Sénia), així com plantes que expressaven el gen *mpi* sota el control del fragment petit (**C1*mpi***) o el fragment llarg (**2k*mpi***) del seu propi promotor (varietat Ariete).

RESULTATS

Les línies **C1mpi** i **2Kmpi** han estat utilitzades en aquest treball per tal d'analitzar el grau d'acumulació de la proteïna MPI, en condicions d'inductivitat, en plantes transgèniques (fulla en resposta a ferida), així com per determinar els efectes de la producció de l'inhibidor sobre el perfil d'activitats proteolítiques digestives de larves de *C. suppressalis*. Els resultats aquí obtinguts han servit de referència pels estudis posteriorment realitzats sobre les línies transgèniques que expressen un gen fusió *mpi-pci* i també sota control del promotor induïble del gen *mpi*. Així mateix, s'ha analitzat la possible acumulació de MPI en teixits de llavors de les plantes transgèniques *C1mpi* i *2Kmpi*.

I. A. 2.1 Efecte de l'expressió del gen mpi en plantes d'arròs sobre proteases digestives de larves de C. suppressalis

En treballs anteriors realitzats en el nostre laboratori, s'havia determinat l'efecte en el pes i desenvolupament de les larves de *C. suppressalis* al alimentar-se de plantes que expressaven, tant de manera constitutiva com induïble, el gen *mpi* (Vila, 2003). Així, les larves alimentades durant 10 dies en plantes d'arròs (varietat Ariete) que expressa el gen *mpi* de manera constitutiva, mostren una reducció de pes d'entre 35,6% i 59,6% depenent de la línia. Quan són alimentades en plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* sota control del fragment curt del seu propi promotor (plantes *C1mpi*), la reducció de pes per el mateix període és del 23%-28,6%, depenent de la línia (Vila, 2003). Havent-se comprovat, per tant, que la ingestió de MPI afecta negativament al desenvolupament larvari de *C. suppressalis*, es va voler determinar l'efecte de l'inhibidor MPI sobre les proteases digestives de les larves *C. suppressalis* alimentades en plantes transgèniques. En aquest punt, cal recordar que els resultats obtinguts en els assaigs d'activitat proteolítica *in vitro* amb extractes proteics intestinals de *C. suppressalis* (presentats a l'**Apartat I.A.1**), havien demostrat la participació majoritària de proteases susceptibles d'inhibició per inhibidors de tipus serina proteases. Aquests mateixos assaigs indicaven que la pre-incubació dels extractes amb MPI tenia un efecte inhibidor en les proteases digestives de les larves de *C. suppressalis* de fins un 40% (**Figura 31**).

Per tal de determinar l'efecte del consum de proteïna MPI produïda *in planta* sobre les proteases digestives de larves de *C. suppressalis*, es va analitzar l'activitat proteolítica total dels extractes digestius de larves alimentades en plantes transgèniques *C1mpi*, i es comparà amb els resultats obtinguts amb larves alimentades en plantes d'arròs control no transformada (varietat Ariete). Per fer-ho es va emprar el substrat general caseïna-resorufin. Tal i com es mostra a la **Figura 32**, l'activitat proteolítica total incrementà en els intestins de larves que eren

alimentades en plantes que expressen el gen *mpi* sota el seu propi promotor (*C1mpi* línies 5.2, 10.2 i 4.6).

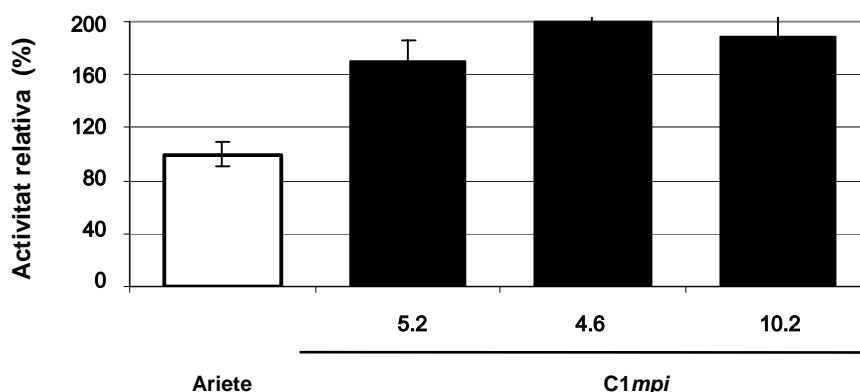


Figura 32. Activitat proteolítica total en extractes de proteïnes intestinals de larves de *C. suppressalis* alimentades en plantes Ariete no transformades i en línies transgèniques *C1mpi*. S'han utilitzat tres línies transgèniques homozigòtiques independents. Els assaigs d'activitat es realitzen fent servir caseïna-resorufin com a substrat i 5 µg d'extractes proteics d'intestins.

Per tal de caracteritzar millor l'efecte de la ingestió de l'inhibidor MPI en les proteases digestives de les larves de *C. suppressalis*, es varen comparar amb els nivells d'activitats proteolítiques de les larves alimentades en plantes transgèniques respecte a les observades en plantes control no transformades, mitjançant l'ús de substrats específics. Es van emprar substrats sintètics dissenyats per analitzar activitats endoproteases (serina i cisteïna proteases) i exoproteases (leucina aminopeptidases i carboxipeptidases).

Els substrats emprats foren: *N*-succinil-alanina-alanina-alanina-*p*-nitroanilida (**SA₃pNA**), *N*-succinil-alanina-alanina-prolina-leucina-*p*-nitroanilida (**SA₂PLpNA**), *N*-succinil-alanina-alanina-prolina-fernilalanina-*p*-nitroanilida (**SA₂PPpNA**), *N*α-benzoil-arginina-*p*-nitroanilida (**BApNA**)- *L*-piroglutamil-*L*-fenilalanil-*L*-leucina-*p*-nitroanilida (p-Glu-Phe-Leu-pNA), *L*-leucina *p*-nitroanilida (**LpNA**), hipuril-fernilalanina (**HPA**) i hipuril-*L*-arginina (**HA**). A la **Taula XIX** es mostra el tipus de proteasa que hidrolitza cadascun d'aquests substrats. Primerament, es va determinar el pH òptim per a la hidròlisi de cadascun dels substrats específics. Les activitats elastasa (SA₃pNA), quimotripsina (SA₂PLpNA i SA₂PPpNA) i tripsina (BapNA), presentaven un pH òptim de 10,5, mentre que les activitats cisteïna-proteasa (p-Glu-Phe-Leu-pNA) i leucina aminopeptidasa (LpNA) mostraven un pH òptim de 8,5. Finalment, la hidròlisi dels substrats per a les carboxipeptidases A i B (HPA i HA, respectivament) és màxima a pH 7,5.

Així doncs es procedí a la preparació dels extractes proteics, a partir dels intestins de larves alimentades tant en plantes d'arròs control (Ariete) com en plantes *C1mpi*, i als assaigs

RESULTATS

d'activitats proteolítiques utilitzant substrats específics. Els resultats es presenten a la mateixa **Taula XIX**. El consum d'arròs que expressa el gen *mpi* provocà un increment en les activitats de les serina proteases, elastasa, quimiotripsina i tripsina. Així, les larves alimentades en plantes *C1mpi* presenten les activitats elastasa i quimiotripsina incrementades 1.3 vegades (amb SA₃pNA i SA₂PppNA com a substrats, respectivament) i l'activitat tripsina incrementada 2.9 vegades (amb BapNA com a substrat) respecte les larves alimentades en plantes Ariete control. En el cas de la hidròlisi del substrat p-Glu-Phe-Leu-pNA, substrat de cisteïna proteases però que pot ser hidrolitzat també per aminopeptidases, es va observar un increment remarcable (4,6 vegades més) en les larves alimentades en plantes transgèniques. L'activitat cisteïna proteasa també fou determinada amb el substrat BapNA (afegint cisteïna a la reacció a una concentració final de 1 mM) (Novillo *et al.*, 1997), observant-se un augment d'aproximadament el doble en larves alimentades en les plantes transgèniques.

S'observa també que la ingestió de proteïna MPI produïda en planta resulta en un increment de les activitats exoproteases. Així, la ingestió per part de les larves de línies transgèniques d'arròs que expressen *mpi*, els hi causa un increment en els nivells d'activitats carboxipeptidasa tant del tipus A com del tipus B (2.1 i 1.3 cops respectivament; amb HPA i HA com a substrats). L'activitat leucina aminopeptidasa (amb LpNA com a substrat) està incrementada 2.0 vegades en larves alimentades en plantes transgèniques d'arròs *mpi*.

Taula XIX. Activitats de diferents tipus d'activitats proteolítiques assajades amb substrats sintètics en intestins de *C. suppressalis*. Les larves de *C. suppressalis* foren alimentades 14 dies en plantes control (Ariete) o plantes *C1mpi* (línies 5.2 i 10.2). Les activitats proteolítiques s'indiquen de la següent manera: Elastasa (ELA), Quimiotripsina (QUI), Tripsina (TRI), Cisteïna proteasa (CIS), Carboxipeptidasa A i B (CPA i CPB), Leucina aminopeptidasa (LAP).

	pH	Activitat específica (a)			Relació (b)
		Control (Ariete)	<i>C1mpi</i> (línia 5.2)	<i>C1mpi</i> (línia 10.2)	
SA ₃ pNA (ELA)	10.5	4.40 ± 0.19	5.45 ± 0.23	6.06 ± 0.26	1.31
SA ₂ PppNA (QUI)	10.5	36.36 ± 1.54	47.82 ± 2.03	50.19 ± 2.13	1.35
SA ₂ PLpNA (QUI)	10.5	39.20 ± 1.66	44.95 ± 1.91	45.27 ± 1.19	1.15
BApNA (TRI)	10.5	9.29 ± 0.47	28.23 ± 0.99	26.61 ± 0.73	2.95
BApNA + Cisteïna (CIS)	10.5	15.56 ± 2.91	28.78 ± 2.79	30.48 ± 4.83	1.90
P-Glu-Phe-Leu-pNA (CIS)	8.5	1.36 ± 0.50	7.48 ± 0.93	5.04 ± 1.18	4.60
HPA (CPA)	7.5	38.89 ± 1.29	74.07 ± 1.30	89.81 ± 1.01	2.11
HA (CPB)	7.5	45.37 ± 0.80	62.96 ± 1.97	57.41 ± 1.50	1.33
LpNA (LAP)	8.5	86.36 ± 1.17	198.48 ± 24.99	149.62 ± 14.12	2.02

^(a) Activitat específica expressada en nmol de substrat hidrolitzat/min/mg proteïna. Els valors representen la mitja i l'error estàndard a partir de 3 repeticions independents d'extractes (5 µg intestins) i tres rèpliques per assaig.

^(b) Relació de l'activitat proteolítica del extractes d'intestins de larves de *C. suppressalis* alimentades en plantes *C1mpi* respecte les larves alimentades en la varietat control no transformada Ariete.

Com a resum, els estudis portats a terme sobre les activitats proteolítiques d'extractes proteics digestius de larves de *C. suppressalis* i *S. littoralis*, indicaven que MPI exerceix una activitat inhibidora *in vitro* sobre l'activitat total de les proteases digestives (40% d'inhibició) (**Figura 31**). Per altra banda, els assaigs realitzats amb extractes digestius de larves de *C. suppressalis* que han sigut alimentades en plantes transgèniques ens mostren que, en resposta a la ingesta de la MPI produïda per la planta, s'observa una "activació" del sistema proteolític digestiu de les larves, tant a nivell de complement de proteases (**Figura 32**) com sobre activitats proteolítiques específiques, d'endoproteases i exoproteases (**Taula XIX**). D'aquesta manera, es pot concloure que l'insecte s'adapta a la ingestió de MPI per compensar així l'efecte de l'inhibidor mitjançant una "activació" de proteases que no són susceptibles d'inhibició per MPI. Aquest efecte estimulador del sistema proteolític digestiu no és, no obstant, capaç de contrarestar l'efecte nociu de l'inhibidor MPI, ja que les larves de *C. suppressalis* pateixen un retràs en el seu creixement al alimentar-se en plantes transgèniques d'arròs *mpi*.

I. A. 2. 2 Acumulació de la proteïna MPI en teixits de plantes d'arròs transgèniques

Les línies transgèniques d'arròs prèviament obtingudes en el laboratori (línies *C1mpi* i *2Kmpi*) (Vila, 2003) han sigut analitzades per tal de determinar el grau d'acumulació de l'inhibidor MPI en diferents teixits de la planta. Com a control, s'han utilitzat línies que expressen de manera constitutiva el gen *mpi*, sota la direcció del promotor del gen de la *ubiquitina 1* de blat de moro (promotor seguit del primer exó i primer intró del gen *ubi*), obtingudes també en el nostre laboratori (Vila, 2003).

Primerament, s'analitzà la producció induïble per ferida de la proteïna MPI en fulles de plantes de 21 dies *C1mpi* (varietat Ariete). Per fer-ho, es realitzaren talls paral·lels entre si i perpendiculars als marges de la fulla per a cadascuna de les plantes a analitzar, i a les 18h es recuperaren i processaren les mostres foliars. A la **Figura 33(A)** es mostra l'acumulació de proteïna MPI en fulles de dues línies homozigotes *C1mpi* de la generació T3 (línies 5.2 i 10.2). A la línia 5.2 *C1mpi* s'observà un nivell basal d'acumulació de MPI (0,1% de la proteïna total soluble) en fulles no ferides, percentatge que s'incrementava fins a 0,37% després de ferida (**Figura 33A**, carrils 2 i 3). Pel que fa a la línia 10.2 *C1mpi* s'observà un nivell d'acumulació de MPI major 0,2% de la proteïna total soluble, en fulles no ferides, mentre que el seu nivell incrementà fins al 0,5% de la proteïna total soluble en resposta a ferida (**Figura 33A**, carrils 4 i 5). A la línia 4.6 *C1mpi* la proteïna MPI s'acumulava a uns nivells de 0,15% i 0,4% de la proteïna

RESULTATS

total soluble en fulles no ferides i ferides, respectivament (resultats no mostrats). Per altra banda, es va analitzar també la línia *2kmpi* 5.2, sota les mateixes condicions d'inductivitat anteriorment descrites. En aquest cas no s'observà acumulació detectable en fulla no ferida, i sí una forta acumulació després de 18h de realitzar-se el dany mecànic (0,5% de la proteïna total soluble) (Figura 28A, carrils 10 i 11). No es van donar reaccions immunològiques en els extractes proteics preparats a partir de les fulles control provinents de plantes d'arròs no transformades, Sènia i Ariete (**Figura 33A**, carrils 6 i 9). L'acumulació de MPI induïda per la ferida en les línies *C1mpi* i *2kmpi* fou similar a l'observada en les fulles de la línia SC84, que expressa constitutivament el gen *mpi* (acumulació de MPI del 0,45% en la línia SC84 *ubi:mpi*; **Figura 33A**, carril 8). L'acumulació de MPI observada en la línia SC90 fou lleugerament major (acumulació de MPI del 0,5% en la línia SC90 *ubi:mpi*; **Figura 33A**, carril 7). Resultats similars als mostrats en la **Figura 33** per la generació T3, es van obtenir en determinar l'acumulació de MPI induïda per ferida en aquestes línies Ariete *C1mpi* a la generació T4 (resultats no mostrats). Cal afegir que, si bé els resultats mostrats a la Figura 28 corresponen a mostres de fulles recollides 18 h després del tractament de ferida, l'acumulació de MPI induïda per ferida es va observar ja 30 min després de la ferida tant en les diferents línies *C1mpi* analitzades, així com en la línia *2kmpi* 5.2 (resultats no mostrats).

Així doncs, aquests resultats indiquen que en resposta a ferida, les plantes d'arròs acumulen MPI en fulla. Els nivells basals d'acumulació de MPI en fulles no ferides de les línies *C1mpi*, poden ser un reflex de diferències en el dany mecànic sofert per aquestes plantes durant el seu creixement i desenvolupament.

Va ser del nostre interès també, determinar si la proteïna MPI s'acumulava o no, en teixits de la llavor de les línies transgèniques que expressen el gen *mpi* sota control del seu propi promotor (línies *C1mpi* i *2kmpi*). Per aquest motiu, es va dissecionar l'embrió i l'endosperm de llavors madures de plantes *C1mpi*, *2kmpi* i control, i se'n va preparar un extracte de proteïnes totals. A l'anàlisi per immunotransferència d'aquests extractes, no es va detectar proteïna MPI ni en endosperm ni en embrió de llavors produïdes per les plantes de la línia 5.2 *2kmpi* (**Figura 33B**, carrils 1 i 2). No es va detectar en les línies 4.6 *C1mpi* i 10.2 *C1mpi* (resultats no mostrats), en canvi sí es va detectar un petit nivell d'acumulació de MPI a l'endosperm, però no a l'embrió, de la línia 5.2 *C1mpi* (nivell MPI al límit de detecció en l'anàlisi dels extractes de l'endosperm mitjançant immunotransferència (**Figura 33B**, carrils 3, 4). Per altra banda, la proteïna MPI sí que s'acumulava en els teixits de les llavors de les línies amb expressió constitutiva *ubi:mpi* (SC84 i SC90). La quantitat de proteïna MPI acumulada a l'embrió de les llavors d'aquestes línies va ser del 0,2% de la proteïna total soluble (**Figura 33B**, carrils 7 i 9). En l'endosperm de les línies SC90 i SC84, la proteïna MPI s'acumulava a nivells de 0,45% i 0,40% de la proteïna

total soluble, respectivament (**Figura 33B**, carrils 8 i 10). No hi va haver reacció serològica en els extractes proteics preparats a partir de l'embrió i l'endosperm de llavors de plantes control de les varietats Ariete (**Figura 33B**, carrils 5 i 6) i Sènia (resultats no mostrats).

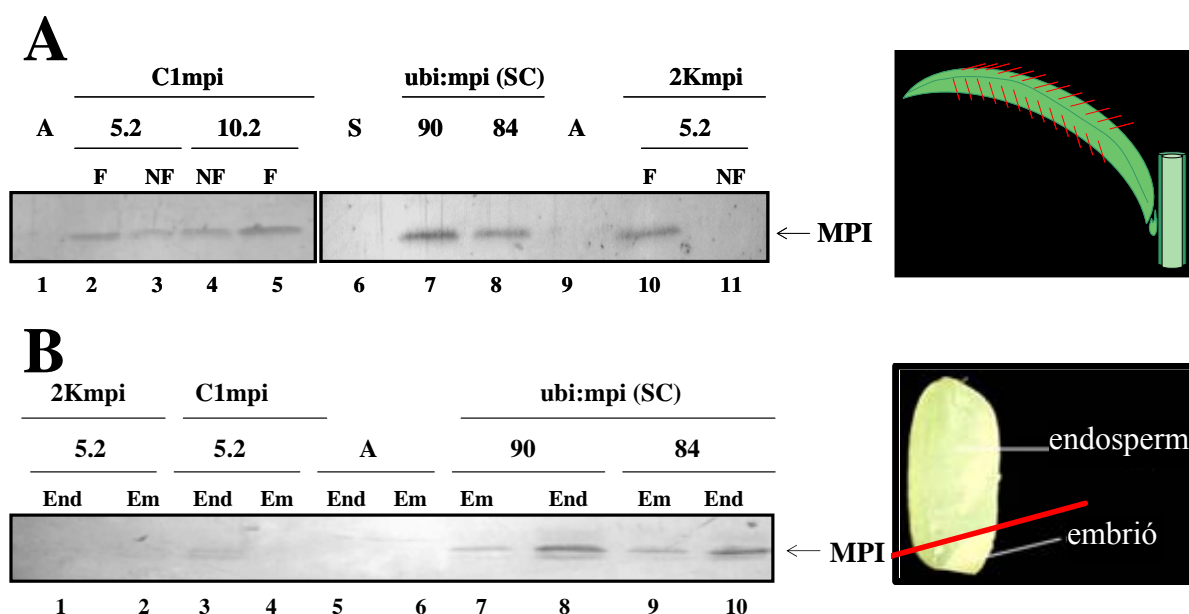


Figura 33. Immunodetecció de la proteïna MPI en teixits de plantes d'arròs *mpi*. **A)** Acumulació de MPI en resposta a ferida mecànica. Les plantes foren ferides al llarg de la fulla mitjançant un bisturí (dibuix a la dreta). L'anàlisi es realitzà a les 18 h després de realitzar-se la ferida. **B)** Anàlisi d'extractes proteics de teixits de la llavor d'arròs. L'embrió i l'endosperm es van disseccionar de llavors madures (dibuix a la dreta). Línies que expressen el gen *mpi* sota control del propi promotor: *C1mpi* (5.2 i 10.2) i *2Kmpi* (5.2); línies que expressen *mpi* de manera constitutiva: *ubi:mpi* (SC90 i SC8); línies control no transgèniques: Sènia (S) i Ariete (A). F, ferida; NF, no ferida; End, Endosperm; Em, Embrió.

A partir d'aquests resultats, podem concloure que la proteïna MPI no s'acumula a uns nivells significatius en teixits de llavors de plantes transgèniques d'arròs que expressen el gen *mpi* sota control del seu propi promotor. Així doncs, les característiques funcionals observades pel promotor del gen *mpi* en plantes d'arròs, això és la seva capacitat per regular l'expressió induïble del gen *mpi* en resposta a ferida, junt amb l'observació de que aquest promotor no és actiu en teixits de llavors, va permetre iniciar l'estratègia d'expressió de gens fusió *mpi-pci* sota el control del promotor *mpi* en plantes d'arròs.

I. A. 3 Plantes d'arròs que expressen un gen que codifica una proteïna fusió MPI-PCI: protecció front C. suppressalis

I. A. 3. 1 Preparació de les construccions mpi-2A-pci i mpi-C-pci per a la transformació

Es va procedir a avaluar l'efecte de l'expressió d'un gen fusió en el que el gen *mpi* s'uneix al gen *pci* a través d'una seqüència d'unió ("linker") en plantes d'arròs, sota el control del promotor induïble del gen *mpi*. Per a la preparació del gen fusió, es següen dues aproximacions. En la primera es va emprar com a seqüència la seqüència d'aminoàcids al voltant del lloc de processament del precursor de la proteïna Cry1B de *Bacillus thuringiensis*. Se sap que el precursor, a través d'un procés de proteòlisi limitada, es processa fins a la seva forma madura activa, la proteïna Cry1B, per una activitat del tipus tripsina present en el tracte digestiu de l'insecte (**Apartat 6.2, Introducció**). En una segona aproximació, es volgué assajar el potencial de la seqüència 2A del virus FMDV, com a seqüència d'unió entre MPI (N-terminal) i PCI (C-terminal) (**Apartat 7.1.1, Introducció**).

Per a la preparació del "cassette" per a l'expressió en plantes d'arròs del gen fusió *mpi:2A:pci*, es van obtenir mitjançant la tècnica de PCR cadascun dels següents fragments de DNA: **2K-mpi** (fragment 2Kb del promotor i cDNA *mpi*), la seqüència de processament **2A** (75 pb), el gen **pci** (117 pb) i el terminador del gen *mpi* (*term*, 450 pb) (**Figura 34**). La seqüència 2A fou obtinguda a partir del plàsmid pGUS2AGFP cedit amablement pel grup de la Dra. Claire Halpin, de la Universitat de Dundee (Halpin *et al.*, 1999).

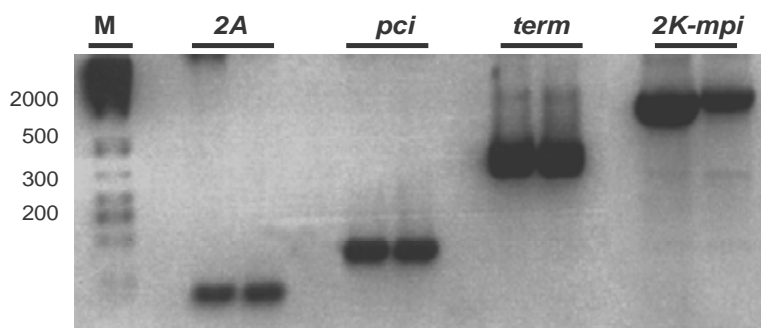


Figura 34. Amplificació per PCR dels diferents fragments de DNA obtingut per a la preparació del "cassette" per a l'expressió del gen fusió *mpi-2A-pci* en plantes d'arròs. 2A, seqüència de processament 2A (75 pb); gen *pci*, 120 pb; term, terminador del gen *mpi* de 450 pb; 2K-mpi, fragment de 2Kb del promotor del gen *mpi* i 219 pb del gen *mpi*. Es mostra una réplica de cada mostra.

En tots els casos, als oligonucleòtids utilitzats en les diferents reaccions de PCR, se'ls hi va afegir una seqüència diana (de restricció) en cada extrem per facilitar les etapes posteriors de clonatge (**Apartat 1.8.1, Material i Mètodes**). Els quatre fragments obtinguts, van ser clonats per separat en el vector *pGEM-T* i posteriorment seqüenciats. Seguidament es va procedir a una sèrie de subclonatges seqüencials, tal i com es mostra a la **Figura 35**. Així, es va clonar per separat el fragment *2Kmpi* amb la seqüència de processament *2A*, en el vector pBSK, mitjançant les dianes de restricció *SphI-BamHI*. De la mateixa manera es va fer amb els fragments *pci* i terminador del gen *mpi* (*Sall - HindIII*) en el vector pBSK. El fragment obtingut (*pci::term*), fou clonat en el vector pBSK:: *2K::mpi::2A* mitjançant els enzims de restricció *KpnI - BamHI*. Aquest segment de DNA, digerit amb *KpnI*, va ser finalment clonat en el vector per la transformació d'arròs, el plàsmid *pCAMBIA1300* (portador del gen *hptII* de selecció que confereix resistència a Higromicina).

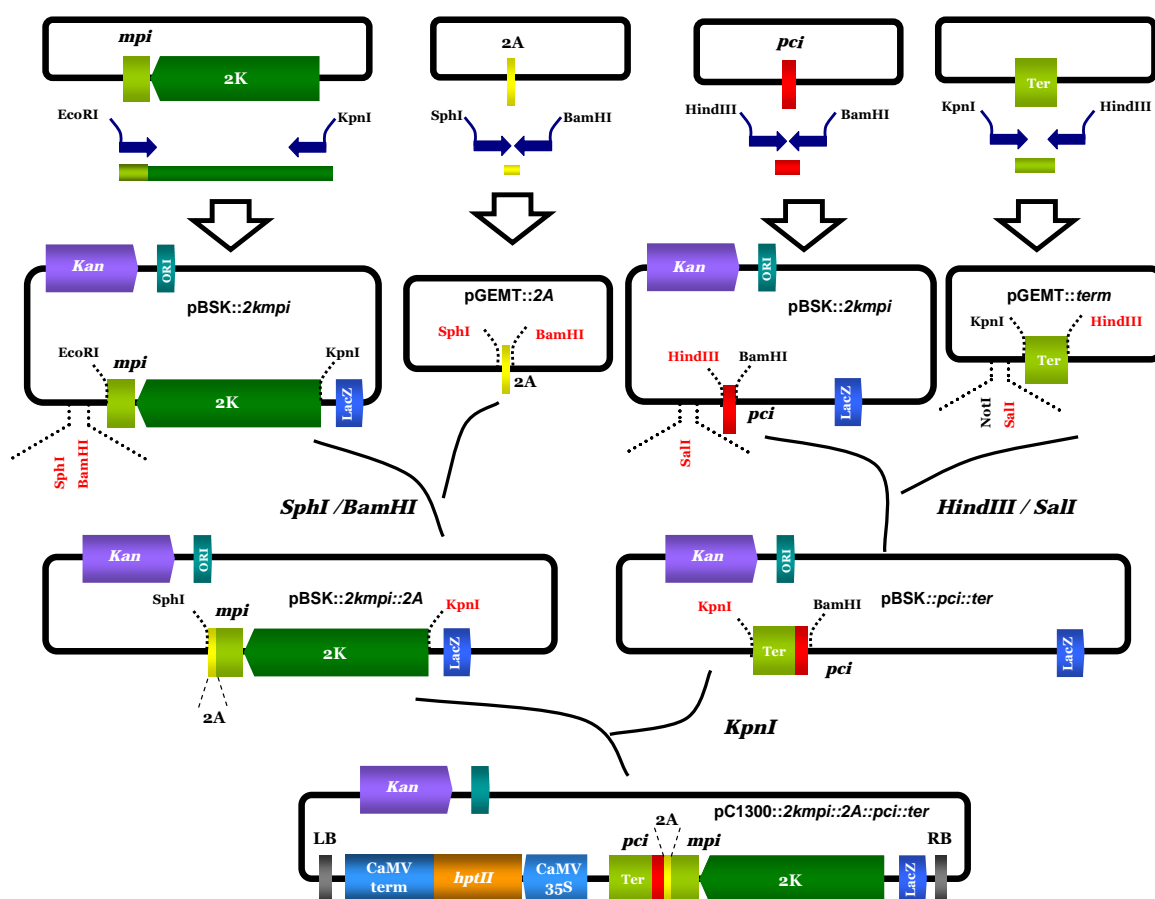


Figura 35. Esquema il·lustratiu del procés seguit per a la preparació de la construcció per a l'expressió en arròs del gen fusió *mpi-2A-pci*, sota el control del promotor i el terminador del gen *mpi* (plàsmid pC1300 *2Kmpi::2A::pci::term*). *Kan*, gen de resistència a kamamicina; *hptII*, gen de resistència a higromicina; CamMV 35S, promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor. RB, *right border*. LB, *left border*.

RESULTATS

Per la preparació de la construcció portadora del gen *mpi* fusionat al gen *pci* a través del fragment de DNA que codifica la regió de processament de la proteïna Cry1B (en endavant denominat **fragment C**), es seguí el mateix procediment que l'explicat anteriorment, però en lloc d'ampliar per PCR de la seqüència 2A, s'amplificà la seqüència de DNA de 84 pb que codifica la regió de processament de la proteïna Cry1B, amplificada per PCR, a partir del plàsmid pBSK::ubi::Cry1B::hybrid::Cry1Aa::nos (cedit pel Dr. Emmanuel Guiderdoni, CIRAD-Montpellier) (afegint les dianes *SphI* i *BamHI*). En la **Figura 36** es mostra la construcció així obtinguda.

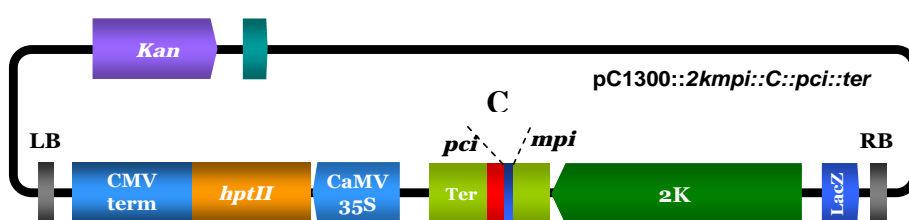


Figura 36. Vector per a la transformació d'arròs portador del gen *mpi* fusionat al gen *pci* a través del fragment de DNA que codifica la regió de processament de la proteïna Cry1B, sota el control del promotor i el terminador del gen *mpi* (plàsmid pC1300 2K*mpi*::C::pci::term). *Kan*, gen de resistència a kamamicina; *hptII*, gen de resistència a higromicina; CaMV 35S, promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor. RB, *right border*. LB, *left border*.

Un cop obtingudes les construccions portadores dels gens *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci*, aquestes foren seqüenciades i posteriorment utilitzades per a la transformació d'arròs. A la **Figura 37** es mostren les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques inferides dels gens fusió *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci* obtinguts en aquest treball.

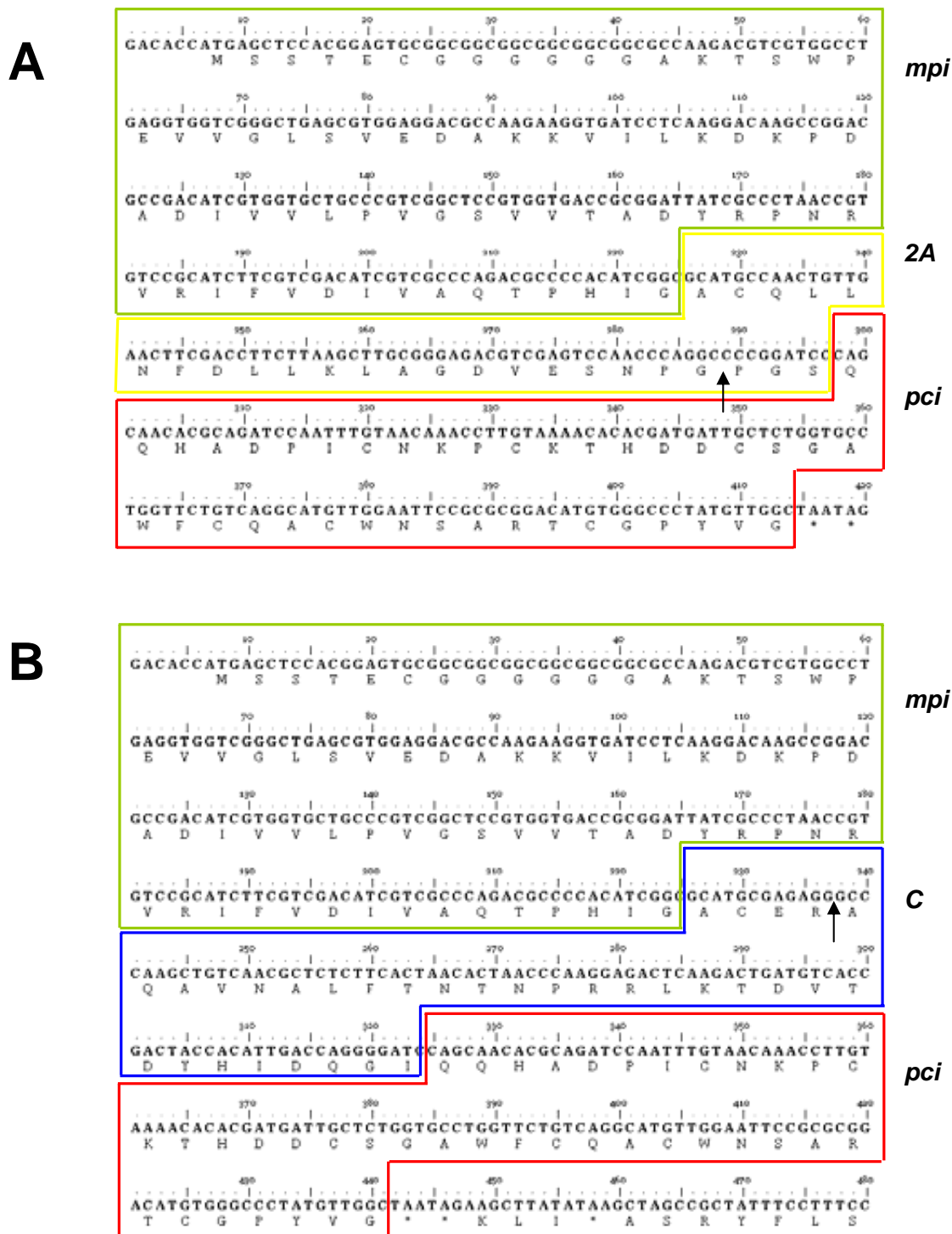


Figura 37. Seqüències nucleotídiques i aminoacídiques deduïdes dels gens fusió *mpi-2A-pci* (A) i *mpi-C-pci* (B). S'indica en colors les regions corresponents a als diferents gens (*mpi* en verd i *pci* en vermell) i seqüències de processament (**2A** en groc i **C** en blau). Les fletxes indiquen els llocs teòrics de processament.

I. A. 3. 2 Obtenció i caracterització molecular de plantes d'arròs transgèniques

Pel que fa a la construcció **pC1300::2kmpi::2A::pci::Term** (d'ara endavant **mpi-2A-pci**), es varen transformar tant la varietat Sénia com la varietat Ariete, mitjançant el mètode d'*Agrobacterium tumefaciens* (soca EHA105). Pel que fa a la construcció **pC1300::2kmpi::seq_proc_Cry1B::pci::term** (d'ara endavant **mpi-C-pci**), es va transformar la varietat Ariete amb el mateix mètode de transformació.

La transformació dels calls de la varietat Ariete, es va du a terme durant una estada al laboratori del Dr. Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, Montpellier, França). Per a la transformació amb el gen **mpi-2A-pci**, s'empraren 120 calls embriogènics inicials, dels quals un 47 % foren resistents a higromicina i van regenerar-se fins a planta adulta. Es van obtenir 57 esdeveniments de transformació i un total de 108 plantes. Per altra banda, pel que fa a la transformació amb el gen **mpi-C-pci**, s'inicià amb 90 calls inicials, dels que un 29% foren resistents a l'antibiòtic de selecció, obtenint-se finalment 49 plantes, a partir de 24 esdeveniments de transformació, les quals foren transferides a hivernacle.

En el cas de la transformació dels calls de la varietat Sénia, aquesta va ser realitzada en el grup de la Dra. Joaquina Messeguer (IRTA, Cabrils). En aquest procés s'obtingueren finalment 26 esdeveniments de transformació i un total de 48 plantes, les quals foren transferides a hivernacle.

Per tal de comprovar la integració del gen **mpi-pci** en el genoma de les plantes que creixien en presència d'antibiòtic, es va realitzar un primer anàlisi de les línies obtingudes (generació To), mitjançant PCR del DNA genòmic. Així, es van agafar mostres de les diferents línies en el moment de realitzar-se la transferència de les mateixes al hivernacle. Els oligonucleòtids utilitzats foren l'encebador **2Kmpi5'** i el **pci3'**, situats en l'inici del promotor **2Kmpi** i l'extrem **3'** del gen **pci**, respectivament. Així, s'obtingué un producte d'amplificació d'aproximadament 2300 pb en aquelles plantes que havien integrat el transgen. A la **Figura 38** es mostren els resultats obtinguts amb algunes de les línies analitzades.

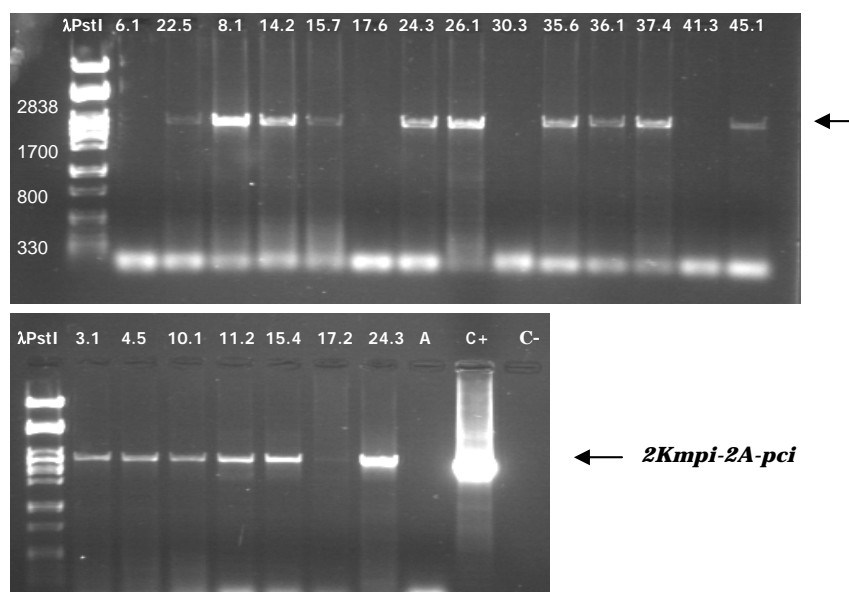


Figura 38. Cribatge per PCR de les línies transgèniques *mpi-2A-pci* (Ariete). Es mostren algunes de les línies obtingudes (carrils indicats amb el número de la línia corresponent). Com a control positiu (C+) es va utilitzar el propi plàsmid *pC1300::2Kmpi::2A::pci::term*. Com a control negatiu DNA genòmic de plantes no transformades Ariete (A). La fletxa indica el producte d'amplificació *2kmpi-2A-pci*. També s'indica un control negatiu (sense DNA) de la reacció (C-).

Per tal de caracteritzar les línies obtingudes, es va analitzar el número de còpies del transgen que s'havien integrat en les plantes obtingudes per a cadascun dels gens quimèrics *mpi-pci*. Es varen realitzar experiments de *Southern-blot*, per determinar el número d'integracions. El DNA genòmic fou digerit amb l'enzim de restricció *BstEII*, que no talla en la regió de DNA utilitzada com a sonda (regió codificant *mpi-pci*). Les membranes obtingudes es varen hibridar tant, amb una sonda del gen quimèric *mpi-pci* (*mpi-2A-pci* o *mpi-C-pci*, segons el cas), així com una sonda del gen de la resistència a l'higromicina (*hptII*), present també en el T-DNA (en aquest cas els DNAs van ser digerits amb *KpnI*). Aquest anàlisi va permetre identificar aquelles plantes procedents d'esdeveniments independents de transformació (diferent patró de bandes), així com aquelles línies que presentaven una única còpia del transgen integrada en el genoma de la planta. A la **Figura 39** es mostren els resultats obtinguts en aquest anàlisi *Southern-blot* al emprar la sonda de la higromicina. Els mateixos resultats foren obtinguts emprant la sonda del gen quimèric *mpi-2A-pci* (resultats no mostrats).

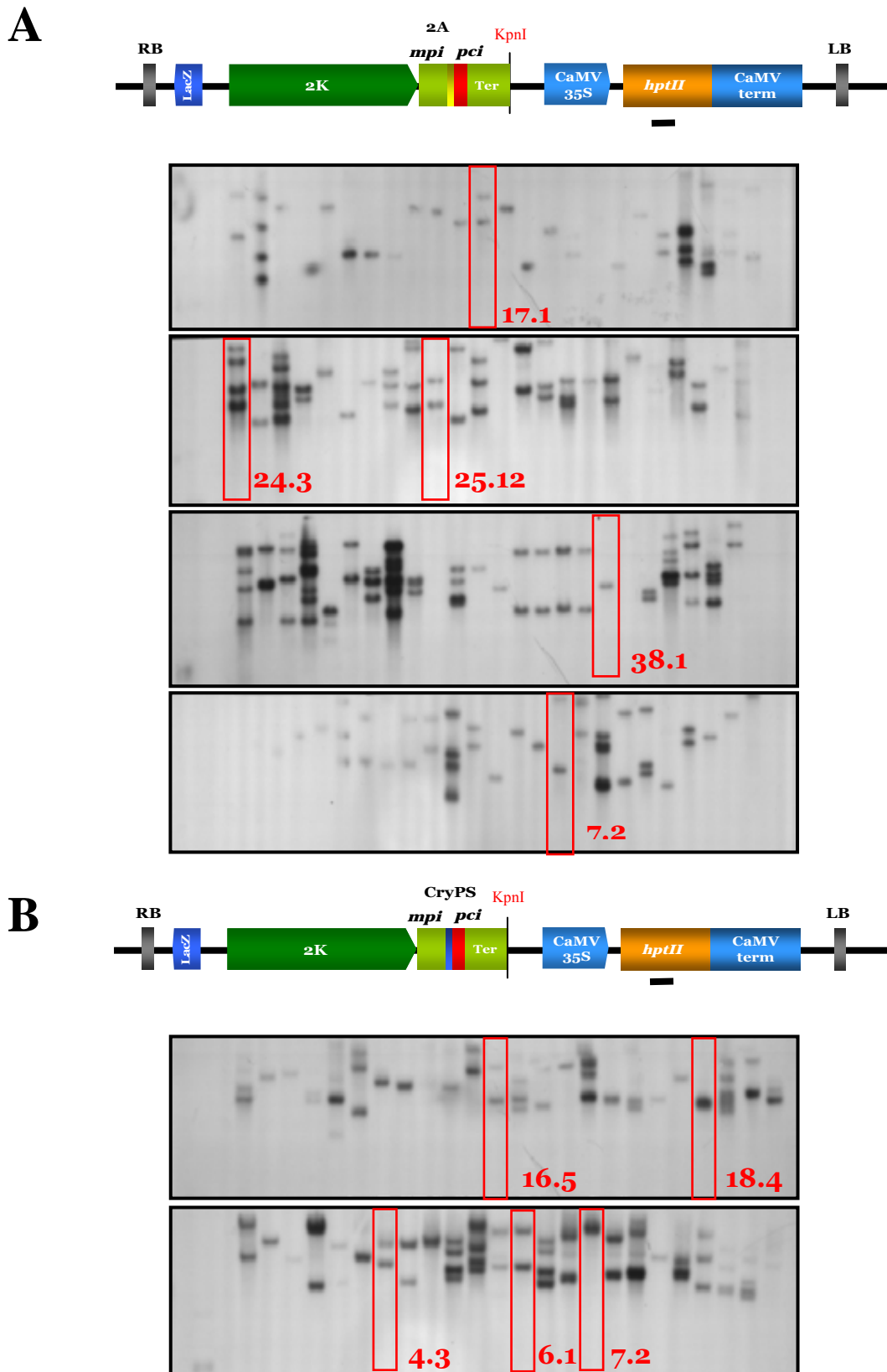


Figura 39. Anàlisi mitjançant *Southern-Blot* del DNA genòmic de les línies transgèniques Ariete (generació T₀) portadores del gen quimèric *mpi-2A-pci* (A) o *mpi-C-pci* (B). Resultat de la hibridació utilitzant la sonda del gen de higromicina (*hptII*)

Pel que fa el número d'integracions del T-DNA, tal i com es pot observar a la **Figura 40**, tant en la transformació amb el gen *mpi-2A-pci* com en la transformació amb el gen *mpi-C-pci*, el resultat fou molt semblant, con una còpia del transgen integrada en un ~40 % de les línies analitzades. Aquestes dades s'ajusten als resultats obtinguts per Sallaud i col·laboradors (2003), en la transformació de plantes d'arròs Ariete amb el mateix mètode de transformació.

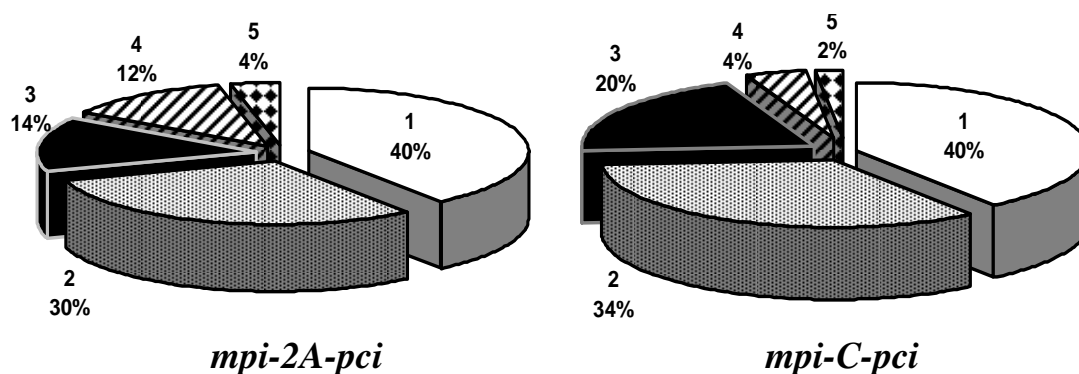


Figura 40. Distribució de les línies transgèniques *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci* de la varietat Ariete en funció del número de integracions del transgen. El nombre de còpies del transgen fou determinat per *Southern Blot* (Figura 39).

Les plantes obtingudes (generació T₀) foren crescudes fins al moment de la recollida de llavors. Seguidament es va procedir a l'obtenció de la generacions T₁ i T₂ homozigòtiques (mitjançant selecció amb higromicina).

Es va determinar el nivell d'expressió de transcrits del gen fusió en les diferents línies transformades, mitjançant anàlisis del tipus *Northen Blot*. Com a sonda es va emprar la zona codificant en cada cas (*mpi-2A-pci* o *mpi-C-pci*), obtinguda a partir de PCR amb els oligonucleòtids mpi5' i pci 3' (**Apartat 1.8.1, Material i Mètodes**) a partir del plàsmid pC1300::2Kmpi::2A::pci o pC1300::2Kmpi::C::pci. Per dur a terme l'anàlisi, es va extreure RNA de fulles sotmeses a ferides, de les diferents línies (generacions T₁ i T₂), i es va hibridar amb les sondes corresponents. En el cas de la generació T₁, aquest anàlisi va permetre seleccionar 15 línies per *mpi-2A-pci* i 13 línies per *mpi-C-pci*, que presentaven una expressió més forta (**Figura 41**). El tamany del transcrit detectat fou l'esperat per al gen fusió. En vermell s'indiquen aquelles línies que, posteriorment foren seleccionades (generació T₂) pels posteriors assaigs de resistència front *C. suppressalis* (del **Apartat I. A. 3. 5**).

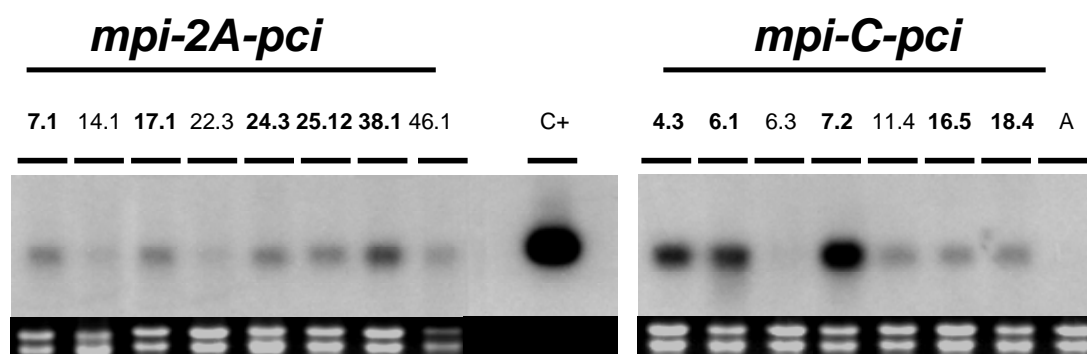


Figura 41. Anàlisi de l'expressió del gen *mpi-pci* en plantes transgèniques d'arròs mitjançant *Northern-blot*. RNA total aïllat de fulles d'arròs *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci* (T1), així com plantes control Aruete (A), 8 h després de haver estat ferides mecànicament. El RNA total (20 µg) fou hibridat amb sondes específiques en cada cas (regió codificant *mpi-2A-pci* o *mpi-C-pci*). El pannel mostra la tinció amb bromur d'etidi dels RNA de les mostres analitzades (film autoradiogràfic fou exposat de 4 dies). Com a control positiu (C+) s'utilitzarà 1 ng de la sonda .

Al laboratori es disposava d'un anticòs policlonal obtingut contra la proteïna MPI. Així doncs, es va procedir a analitzar les línies transgèniques obtingudes mitjançant immunotransferència d'extractes proteics de fulla. Es van preparar extractes proteics totals a partir de fulles sotmeses a ferida (16 h després del tractament per ferida). Els extractes van ser separats electroforèticament i incubats amb l'anticòs contra la proteïna MPI. Tal i com es mostra a la Figura 41, en les línies *mpi-2A-pci* l'anticòs va revelar la presència de dos proteïnes (línies 38.12 i 7.1, **Figura 42**), amb un pes molecular estimat d'aproximadament 8 kDa i 18 kDa, respectivament. Els pesos moleculars teòrics de les proteïnes MPI, MPI-2A-PCI i MPI-C-PCI són d'aproximadament 7,6 kDa, 14,3 kDa i 15,6 kDa, respectivament.

En les línies *mpi-C-pci* es detecta una única proteïna amb la mateixa mobilitat electroforètica que la proteïna de major pes molecular detectada en les línies *mpi-2A-pci*. En extractes obtinguts a partir de fulles de plantes control Ariete no transformades (carril A, **Figura 42**) no es detecta cap proteïna. En general, els resultats obtinguts, indiquen que la proteïna MPI-2A-PCI es processa parcialment en la planta d'arròs, ja que es detecta tant la proteïna MPI com la proteïna fusió MPI-2A-PCI no processada (valors de processament que oscil·len aproximadament del 65% al 20%, línies 38.1 i 7.1, respectivament). A partir d'aquests anàlisis per immunotransferència amb l'anticòs anti-*mpi*, es va poder estimar que el nivell d'acumulació de la fracció corresponent a la proteïna MPI processada es trobava entre el 0,10 i el 0,25% del

total de proteïnes solubilitzades (línies 7.1 i 38.1) Com s'espera, en el cas de les línies *mpi-c-pci* es detecta únicament la proteïna fusió. No obstant, en el cas de les línies *mpi-2a-pci* queda pendent d'estudi si la proteïna PCI s'acumula en les teixits de la planta d'arròs una vegada s'ha processat la proteïna fusió.

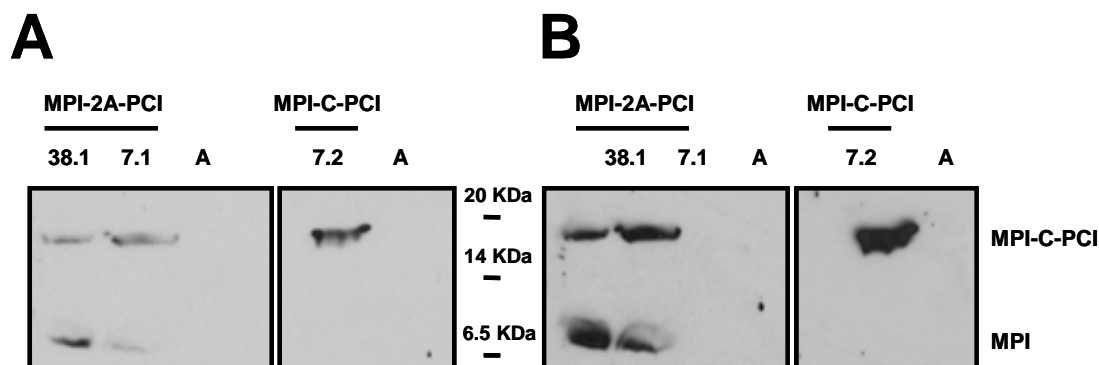


Figura 42. Immunodetecció de la proteïna MPI o MPI-PCI en extractes proteics totals de fulles d'arròs *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci* (varietat Ariete, T2). Les mostres foren presses 16 hores després d'inducció per ferida mecànica. Es mostren els resultats obtinguts amb les línies MPI-2A-PCI 38.1 i 7.1, i amb la línia MPI-C-PCI 7.2. S'utilitzaren 40 µg d'extracte proteic i l'anticòs front la proteïna MPI per a la detecció. Es realitzà una exposició en film autoradiogràfic de 2 minuts (A) i 9 minuts (B).

I. A. 3.3 Bioassaigs amb plantes que expressen un gen fusió mpi-pci amb larves de C. suppressalis: Efecte sobre el pes i creixement de larves alimentades en les plantes transgèniques

Tal i com s'ha explicat anteriorment, estudis previs van demostrar l'efecte de protecció parcial en les plantes d'arròs que expressen del gen *mpi* front *C. suppressalis* (Vila *et al.*, 2005). Es sabia també que després d'un període d'alimentació de les larves de *C. suppressalis* en plantes transgèniques que expressen constitutivament *mpi*, les larves es desenvolupen més lentament i mostren una reducció de pes d'entre 40% i 54%, respecte les larves que són alimentades en plantes control, no transformades.

Així, en aquest treball es va voler comprovar l'efecte que produeix l'expressió del gen fusió dels inhibidors *mpi* i *pci*, dirigida pel promotor induïble del gen *mpi*, sobre larves de *C. suppressalis*. Amb aquesta finalitat es van realitzar bioassaigs amb les línies d'arròs transgèniques **2kmpi-2A-pci** (varietats Sènia i Ariete) i **2kmpi-C-pci** (varietat Sènia).

RESULTATS

Per a la realització d'aquest bioassaigs era necessari disposar d'un número molt important de larves de *C. suppressalis*. Es va decidir, en aquest punt, organitzar sortides als arrossars de la Camarga francesa i del Delte de l'Ebre, per tal d'aconseguir una població suficient d'adults de *C. suppressalis* que permetés després obtenir el número de larves necessàries pel bioassaig. El procés seguit per a la captura de les papallones de *C. suppressalis* en camp es mostra en la **Figura 43 A-D**. Així, es van realitzar 7 sortides a diferents arrossars de la Camarga (Sambuc, França) obtenint-se un total de 189 adults de *C. suppressalis*. Posteriorment, es va posar a punt el protocol per la reproducció i manteniment de les larves neonates, en una cambra amb les condicions necessàries per fer-ho (27°C, 75% HR i un fotoperíode de 16h de llum) (**Apartat 5, Material i Mètodes**). D'aquesta manera, es van obtenir aproximadament entre 4500- 5000 larves de *C. suppressalis*.

Per a la realització dels bioassaigs, les plantes es van créixer en testos (3 plantes/test) fins l'estadi de formació de l'espiga. Les plantes control no transformades Ariete i Sénia es van créixer fins el mateix estadi. Els testos es disposaren en diferents taules, agrupades formant una "illa" en la mateixa cèl·lula de l'hivernacle del CIRAD-Montpeller. Un cop crescudes, es varen infestar les línies d'arròs del bioassaig a raó de 4 larves en estadi de L2 per planta, fent servir un pinzell (**Figura 43E**). Les plantes es mantingueren en els hivernacles (**Figura 43F**). En la **Figura 49A** es mostra un esquema indicant la distribució de les plantes en la cèl·lula dels hivernacles.

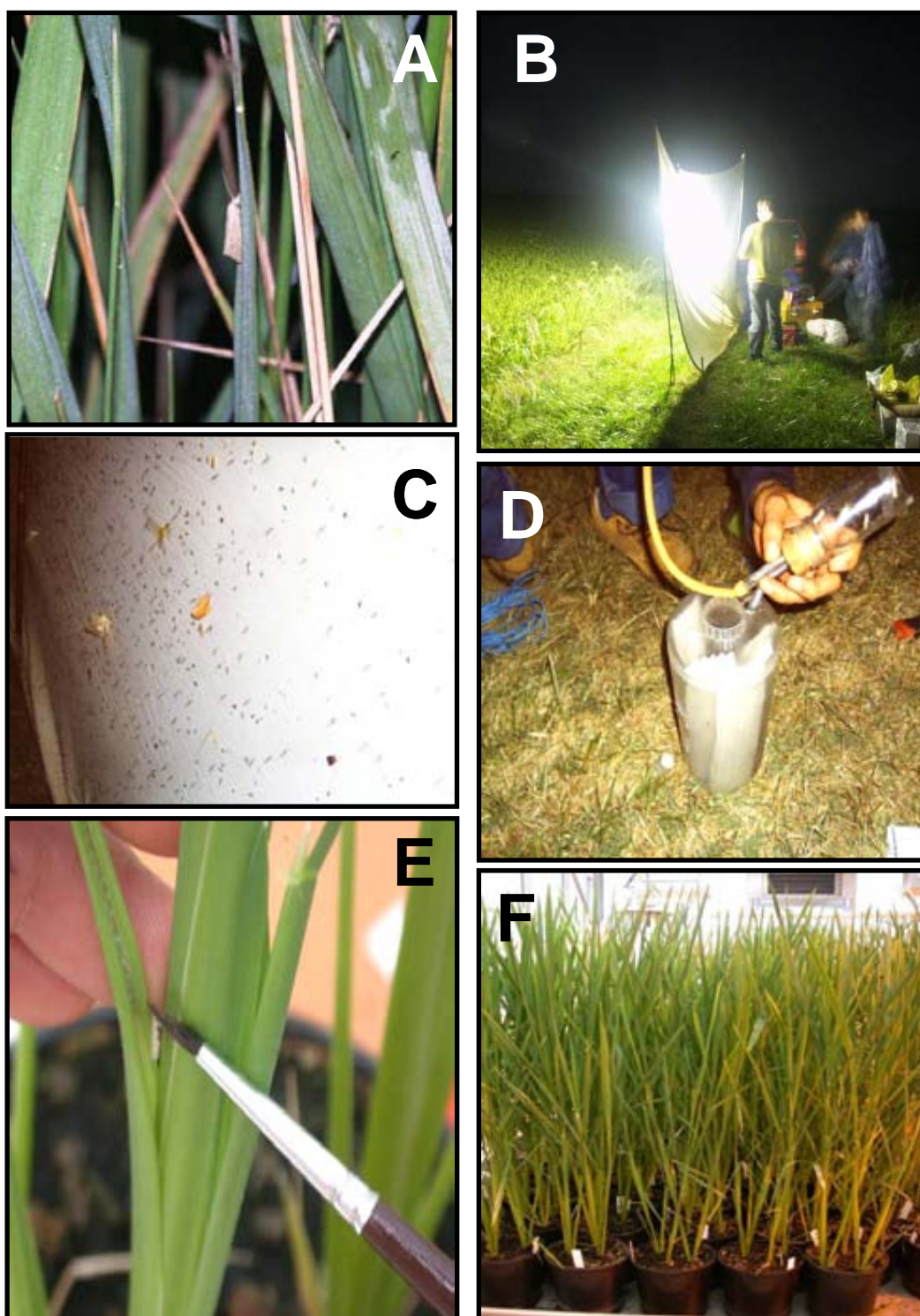


Figura 43. Bioassaig amb larves de *Chilo suppressalis*. A) Adult de *C. suppressalis* sobre una fulla d'arròs. B) Sortida als arrosars de la Camarga francesa (Sambuc) i montatge del dispositiu per la captura de papallones de *Chilo suppressalis*. C) Llençol blanc emprat en la captura de les papallones de *Chilo*. D) Transferència dels adults a l'interior d'una gerra o "bonnette" de captura. E) Col·locació d'una larva de *C. suppressalis* a la fulla de la beina d'una planta d'arròs. F) Plantes d'arròs emprades en el bioassaig .

RESULTATS

Els bioassaigs es van realitzar amb les següents línies transgèniques (Generació T2, línies homozigòtiques independents):

- plantes Ariete mpi-2A-pci. Línies: 7.1, 17.1, 24.3, 25.12 i 38.1
- plantes Ariete mpi-C-pci. Línies: 4.3, 6.1, 7.2, 16.5 i 18.4
- plantes Sènia mpi-2A-pci. Línies: 3.3, 4.1, 4.16 i 26.3

Després d'un període d'infestació de 14 dies, les plantes van ser disseccionades i es larves foren recuperades de les diferents línies i pesades individualment.

Es determinà el pes promig de les larves alimentades en les diferents línies transgèniques (*mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci*) en relació al de les larves alimentades en plantes control de la varietat Ariete. Els resultats obtinguts per las línies mpi-2A-pci de la varietat Sènia es mostren més endavant (**Figura 48**).

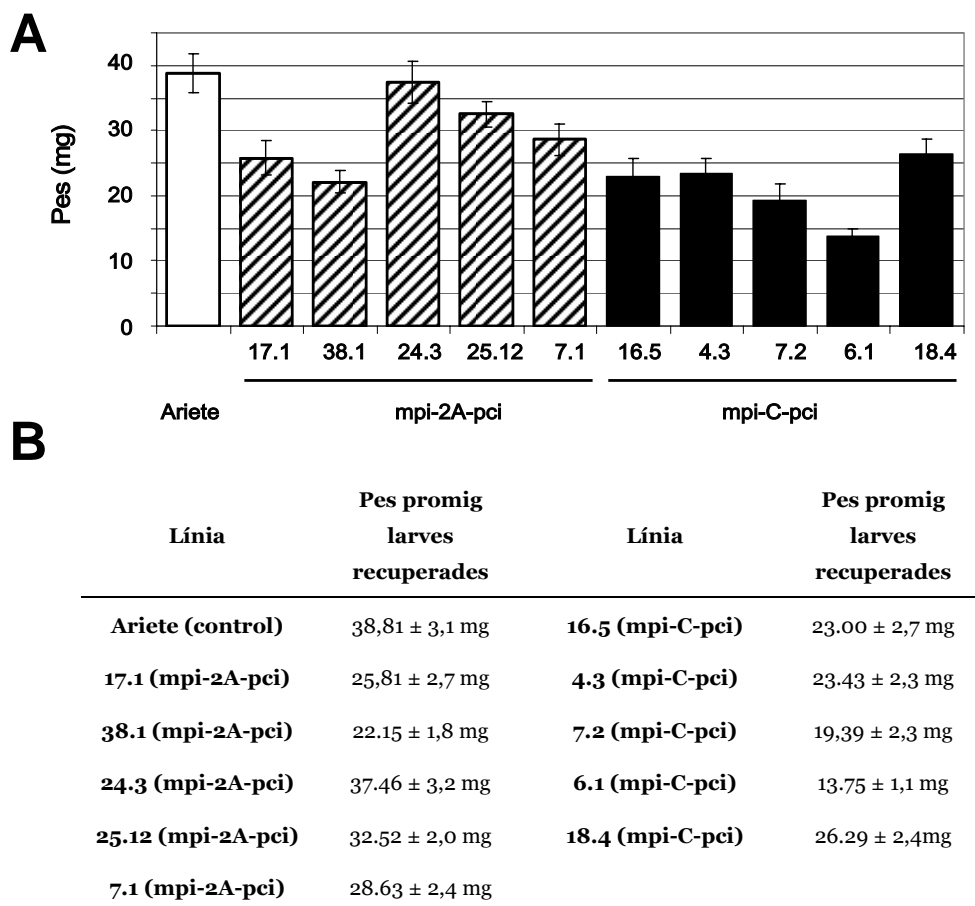


Figura 44. Pes mitjà de les larves recuperades als 14 dies després de la infestació amb les larves (estadi L2) de *C. suppressalis*, de plantes transgèniques *mpi-2A-pci* (columnes ratllades) i *mpi-C-pci* (columnes negres) de la varietat Ariete (generació T2). S'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a controls (columna blanca). Les barres d'error indiquen en A l'error estàndard de la mitja (Test t-Student; ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$).

Els pesos promig de les larves alimentades en aquestes plantes queden representats a la **Figura 44A**, i els valors numèrics obtinguts en cada mesura a la **Figura 44B**. S'observà una disminució significativa del pes en les larves recuperades de les línies transgèniques *mpi-2A-pci* **17.1, 38.1, 7.1 i 25.12** respecte el pes obtingut per les larves alimentades en les plantes **Ariete** control. El mateix succeí amb les línies transgèniques *mpi-C-pci* **4.3, 6.1, 7.2, 16.5 i 18.4** ($P \leq 0,01$).

Per altra banda, també es volgué determinar la distribució de pesos dintre de la població de larves recuperades de cadascuna de les línies utilitzades en aquests bioassaigs. Així, es van establir intervals de pes de manera arbitrària, separats en grups de 10 mg. D'aquesta manera, es pot representar la distribució en funció del pes de les larves recuperades, tant de les línies transgèniques com de les plantes control (**Figura 45**).

En la població de larves recuperades de les plantes Ariete control es podien trobar larves de tots els grups de pes fins a >70 mg, amb representants de tots els grups de pes, però un percentatge molt baix de larves de menys de 10 mg (1,52 %). El major nombre de larves recuperades es trobaven entre els grups centrals de pes (de 31 a 50 mg) (**Figura 45A**).

Per contra, les larves alimentades en les plantes transgèniques que expressaven un gen fusió *mpi-2A-pci*, presentaren en la seva majoria representants dins els grups de pes més baixos, compresos entre 11 i 40 mg (**Figura 45B**). Únicament en la línia *mpi-2A-pci* 24.3 es trobaren larves amb pes > 70 mg. En les línies *mpi-C-pci*, les larves recuperades es trobaven fonamentalment en el grup de pes d'entre 0 i 30 mg, excepte en el cas de la línia 18.4, on les larves es trobaven més àmpliament distribuïdes (**Figura 45C**). En aquestes línies transgèniques *mpi-C-pci* també es trobaren moltes més larves de menys de 10 mg (arribant al 37,5 % en la línia *mpi-C-pci* **6.1**) (**Figura 45C**), fet que gairebé no es dona en les larves alimentades en plantes Ariete control (1,52 % de les larves trobades en pesos inferiors a 10 mg).

En general, s'observà una reducció de pes més important en les larves que havien estat alimentades en les línies que expressen el gen *mpi-C-pci* que en les línies *mpi-2A-pci*.

RESULTATS

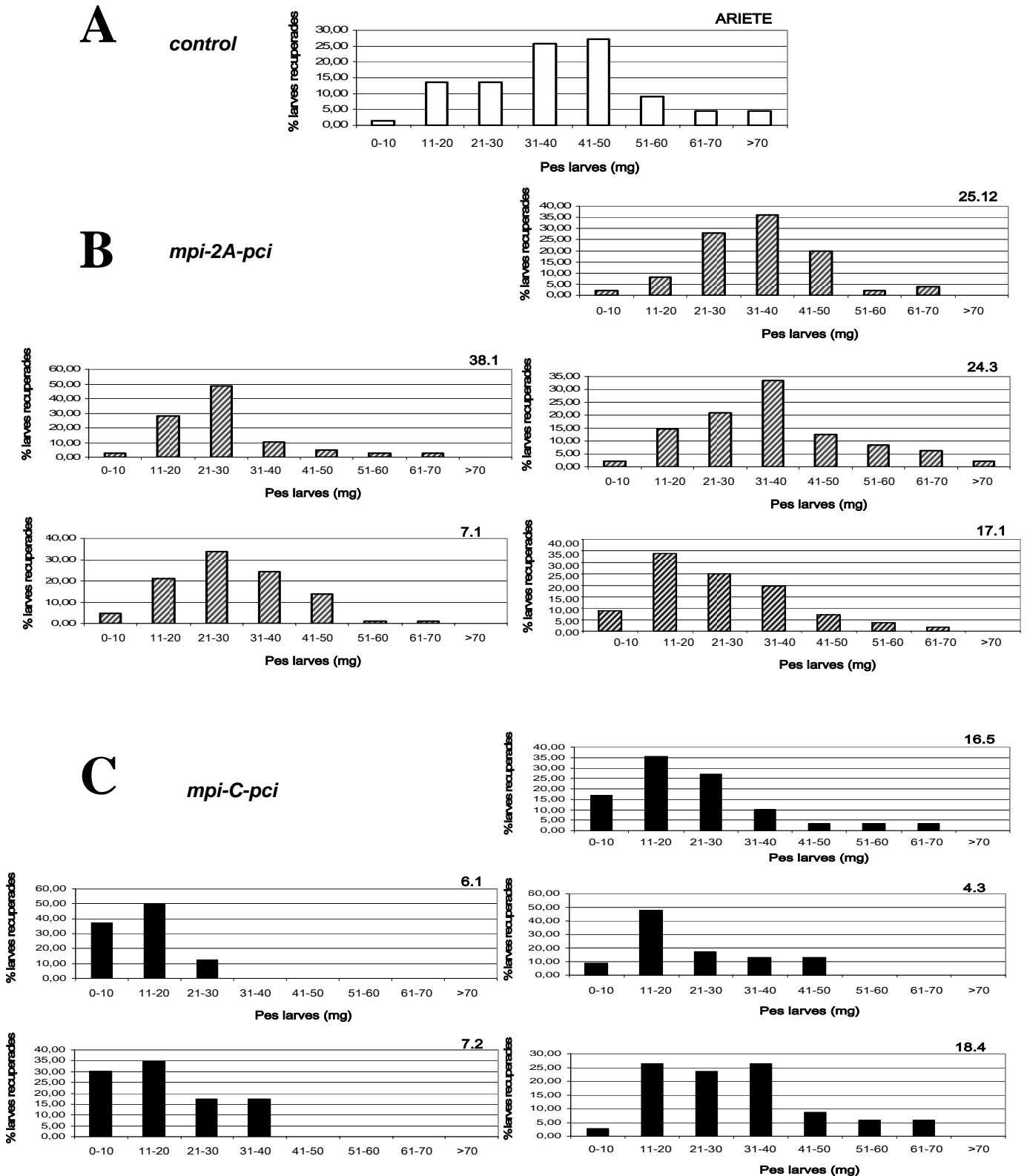


Figura 45. Bioassais amb *C. suppressalis* de plantes transgèniques que expressen un gen fusió *mpi-pci* (generació T2, línies homozigòtiques independents). A) Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes control no transformades (Ariete), B) plantes transgèniques *mpi-2A-pci*, C) *mpi-C-pci*. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia.

Es va determinar el nivell d'expressió del transgen en les plantes utilitzades en els bioassaigs amb *C. suppressalis*. Es van analitzar mostres de RNA total de les mateixes plantes que van ser dissecionades per la recuperació de les larves. Per fer-ho es va realitzar un "pool" amb diverses fulles de les plantes utilitzades (6 plantes de cada línia). Es recollí la fulla sencera en aquelles que en la seva base (en la zona que embolcalla la tija) presentaven orificis de penetració de les larves cap a l'interior de la tija.

L'anàlisi per *Northern-blot* d'aquestes mostres revela l'expressió del transgen en totes les línies transgèniques utilitzades, sense que es detectin grans diferències en el nivell d'expressió entre les diferents línies (**Figura 46**). Aquest resultat contrasta amb l'obtingut en l'anàlisi d'expressió realitzat en fulles de plantes transgèniques ferides mecànicament, on sí que s'observaven diferències importants en el nivell d'acumulació de transcrits del transgen entre les diferents línies transgèniques.

Donat que una regió molt petita de les fulles analitzades en aquest estudi havien sigut directament danyades per les larves (base de la fulla que embolcalla la tija), molt probablement l'expressió del transgen es troba activada en la fulla sencera (inducció sistèmica). Això explicaria l'expressió generalitzada que s'observa en totes les mostres analitzades. Per confirmar aquest aspecte seria necessari completar l'estudi d'expressió del transgen en diferents parts de la fulla distants de la zona on es produeix la penetració de les larves de *C. suppressalis*.

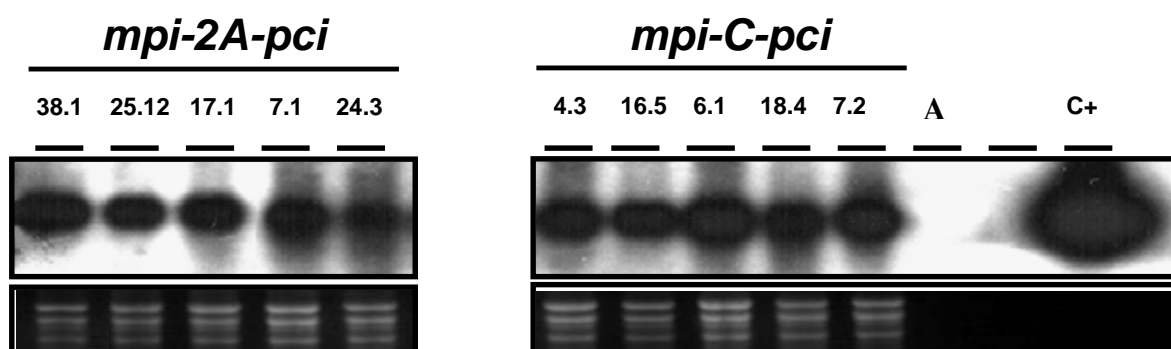
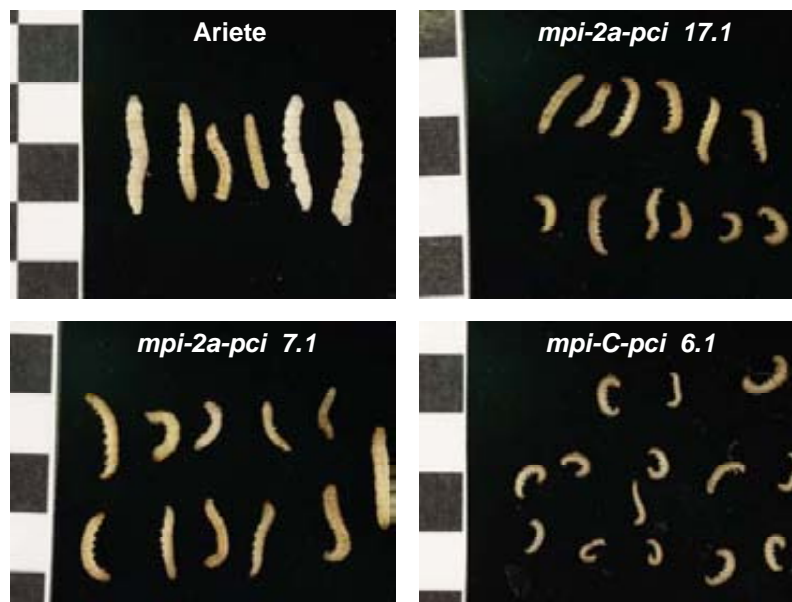


Figura 46. Anàlisi de l'expressió del gen *mpi-pci* en plantes transgèniques d'arròs infestades amb *C. suppressalis*. El RNA total (20 µg) fou hibridat amb sondes específiques en cada cas (regió codificant *mpi-2A-pci* o *mpi-C-pci*). El panell inferior indica el marcatge amb bromur d'etidi del RNA de les mostres analitzades. Com a control positiu (C+) s'utilitzarà 1 ng de la sonda (El film autoradiogràfic fou exposat 10 dies).

RESULTATS

En la **Figura 47** es mostra l'aspecte de les larves recuperades de les plantes utilitzades en els bioassaigs amb *C. suppressalis*, tant de les línies *mpi-2A-pci* com de les línies *mpi-C-pci*, així com de les larves recuperades en plantes control no transformades (Ariete).

Figura 47. Larves de *C. suppressalis* recuperades en els bioassaigs. Es van recuperar les larves després d'un període d'infestació de 14 dies en plantes transgèniques *mpi-2A* i *mpi-C-pci* i plantes control no transformades Ariete.



Els bioassaigs amb larves de *C. suppressalis* foren també realitzats amb les plantes transgèniques *mpi-2A-pci* de la varietat **Sénia**. Els resultats es mostren a les **Figures 48 i 49**. De la mateixa manera que es va observar en els bioassaigs amb les plantes transgèniques de la varietat Ariete, també s'observà la reducció de pes en les larves alimentades en aquestes línies en comparació a les larves alimentades en plantes Sénia no transformades. Cal indicar però, que en aquest cas larves foren alimentades durant 16 dies, mentre que en el cas de les línies de la varietat Ariete el període fou de 14 dies. Així, s'observà una disminució significativa del pes en les larves recuperades de les línies *mpi-2A-pci* **3.3**, **4.1**, **4.16** i **26.3** respecte al valor obtingut per les larves alimentades en les plantes **Sénia** control (**Figura 48**).

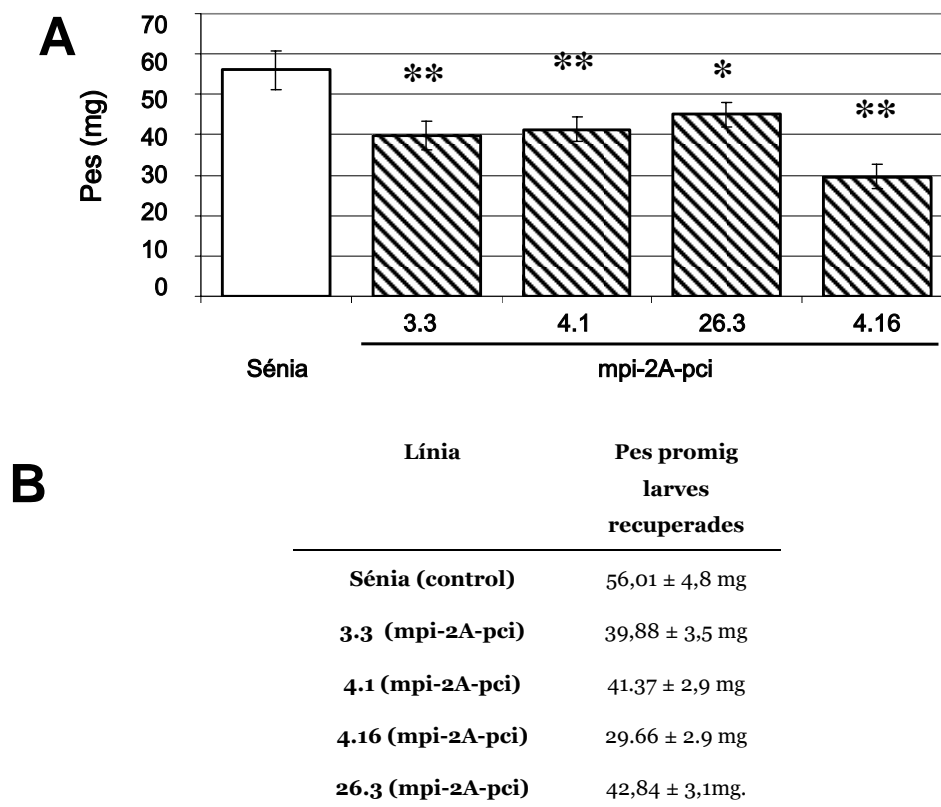


Figura 48. Pes mitjà de les larves recuperades després de 16 dies de plantes transgèniques *2k-mpi-2A-pci* (columnes ratllades) de la varietat Sénia (generació T2). S'utilitzaren plantes de la varietat Sénia no transformades com a controls (columna blanca). Les barres d'error indiquen l'error estàndard de la mitja (Test t-Student; ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$).

De la mateixa manera que es va fer amb les línies transgèniques *mpi-2A-pci* de la varietat Ariete, es determinà la distribució en grups de pes de les larves recuperades de les línies transgèniques obtingudes de la varietat Sénia (**Figura 49**). Les poblacions de larves recuperades de les plantes Sénia control presentaven una distribució en tots els grups de pes fins a >70 mg (el més abundant amb un 26,19 %), mentre que foren molt poques les larves recuperades d'aquestes plantes control de menys de 10 mg (2,38 %). Així doncs, el major nombre de larves recuperades de plantes Sénia es trobaven en els grups més avançats de pes (de 51 a 70 mg). Per altra banda, les larves alimentades en les plantes transgèniques de la varietat Sénia que expressaven el gen quimèric *mpi-2A-pci*, presentaren representants en grups de pes més baixos, majoritàriament dins els grups compresos entre els 11 i 40 mg (línia 4.16), els 11 i 60 mg (línia 3.3), entre 21 i 50 (línia 4.2), o els 31 i 60 mg (línia 26.3). En la línia 4.16, fins un 90 % de les larves recuperades es trobaven per sota dels 40 mg de pes.

RESULTATS

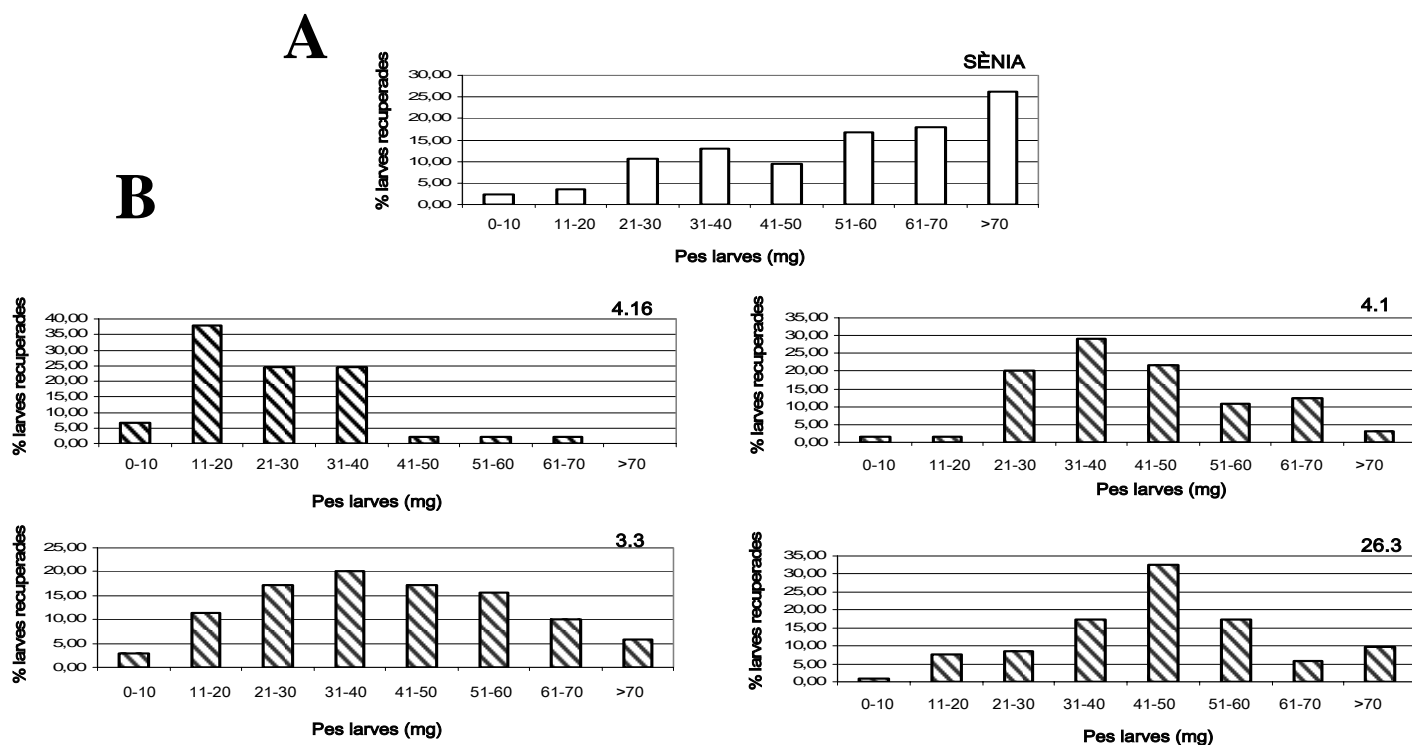


Figura 49. Bioassaigs amb *C. suppressalis* de plantes transgèniques (Sènia) que expressen un gen fusió *mpi-2A-pci* (generació T2, línies homozigòtiques). A) Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes control no transformades (Sènia), B) plantes transgèniques *mpi-2A-pci*. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia.

En general, pel que fa al número total de larves recuperades, aquest fou molt inferior en el cas de les plantes que expressen un gen fusió *mpi-pci* (tant *mpi-2A-pci* com *mpi-C-pci*), al comparar-lo amb el número de larves recuperades de les plantes de les varietats control no transformades (Ariete o Sènia). El tant per cent de larves trobades en les plantes de les varietats Ariete (transformades i control) després del bioassaig es representa a la **Figura 50**, així com a la **Taula X**.

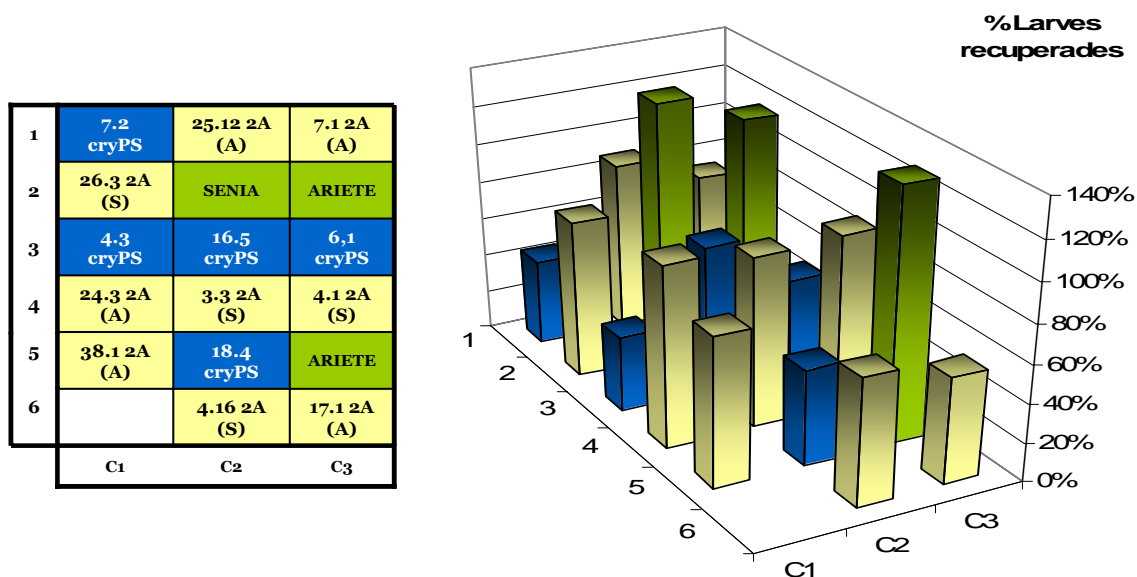


Figura 50. Bioassaigs amb *C. suppressalis* de plantes transgèniques *mpi-2A-pci* (◆), *mpi-C-pci* (◆) de la generació T2 i plantes Ariete i Sènia no transformades (◆). A la taula de l'esquerra es mostra la distribució dels testos a la taula d'una de les cèl·lules dels hivernacles del CIRAD (Montpeller). A la dreta es mostra el percentatge de larves recuperades. En el cas de les línies 2k*mpi-2A-pci* s'indica la varietat d'arròs corresponent: Ariete (A) i Sènia (S)

Per altra banda, després dels bioassaigs, el nombre de crisàlides recuperades en les plantes transgèniques fou també significativament inferior a les trobades tant a les plantes control de la varietat Ariete com Sènia (resultats no mostrats). Cal comentar que en les plantes control, tan de la varietat Ariete com de la varietat Sènia, es trobaren un número de larves superior al que s'havia utilitzat per infestar aquestes plantes. Això indicaria que un número de larves originalment col·locades en les línies transgèniques s'han desplaçat fins a les plantes control situades en la mateixa cèl·lula, en resposta a l'efecte negatiu que l'expressió del transgen exerceix sobre el procés digestiu de les larves. En la **Taula X** es mostra un resum dels resultats obtinguts en aquests bioassaigs amb les línies *mpi-2A-pci* (línies 17.1, 38.1, 24.3, 25.12 i 7, 1); i línies *mpi-C-pci* (línies 16.5, 4.3, 7.2, 6.1 i 18.4).

RESULTATS

Taula X. Resum dels resultats obtinguts en aquests bioassaigs amb larves *C. suppressalis* alimentades en plantes d'arròs de les línies *mpi-2A-pci* 17.1, 38.1, 24.3, 25.12 i 7, 1; i les línies *mpi-C-pci* 16.5, 4.3, 7.2, 6.1 i 18.4, així com plantes d'arròs Ariete no transformades

	Línia	% Larves recuperades	Grups de pes (%)				Pes mitjà (mg)
			0 -10 mg	11 -30 mg	41 - 60 mg	> 61 mg	
mpi-2A-pci (A)	17.1	55,5	8,9	58,9	30,4	1,8	25,81
	38.1	62,5	2,6	76,9	17,9	2,6	22,15
	24.3	96,0	2,1	35,4	54,2	8,3	37,46
	25.12	88,5	2,0	36,0	58,0	4,0	32,52
	7.1	74,5	4,7	54,7	39,5	1,2	28,63
mpi-C-pci (A)	16.5	80,0	16,9	62,7	16,9	3,4	23,00
	4.3	39,0	8,7	65,2	26,1	0,0	23,43
	7.2	44,5	30,4	52,2	17,4	0,0	19,39
	6.1	50,5	37,5	62,5	0,0	0,0	13,75
	18.4	50,0	2,9	50,0	41,2	5,9	26,29
Ariete		125,5	1,5	27,3	62,1	9,1	38,81
mpi-2A-pci (S)	3.3	84,8	3,1	28,8	52,3	15,8	39,88
	4.1	86,7	2,4	22,5	58,3	16,8	41,37
	4.16	63,4	6,8	62,5	28,5	2,5	29,66
	26.3	78,8	1,5	17	65,8	15,7	42,84
Sénia		129	2,9	16,5	36,8	43,8	56,01

En conclusió, els resultats obtinguts en els bioassaigs de les línies transgèniques *mpi-pci* amb *C. suppressalis* indiquen que les larves alimentades en plantes transgèniques, tant en les línies *mpi-2A-pci* com en les línies *mpi-C-pci*, creixen menys i aconsegueixen un pes inferior al que s'observa quan les larves s'alimenten en plantes control, no transformades. En general, el número de larves recuperades després d'un període d'alimentació en planta de 14 dies (16 en el cas de les plantes Sénia) és inferior en el cas de les línies transgèniques que per les plantes control. Malgrat que el percentatge de mortalitat del les larves no es pogué determinar, aquesta diferència en el nombre de larves recuperades es revela com a força significativa. Depenent de la línia analitzada, la reducció de pes oscil·lava entre el 32,2 i el 64% per les línies *mpi-C-pci* (Ariete), entre el 23,5 i el 47% per les línies *mpi-2A-pci* (Ariete), i entre el 26,2 i el 42,9% per les línies *mpi-2A-pci* (Sénia). Si es compara amb els resultats prèviament obtinguts respecte la reducció de pes de les larves alimentades en plantes transgèniques que expressen el gen *mpi* també sota control del propi promotor en els que s'observava una reducció de pes de entre el 23-28,6% (Vila *et al.*, 2005), es desprèn que l'expressió d'un gen fusió *mpi-pci* frena o redueix el creixement de les larves de *C. suppressalis*, d'una manera més acusada que quan s'expressa únicament el gen *mpi* en la planta d'arròs.

I. A. 3. 4 Resistència de les plantes que expressen un gen fusió mpi-pci a la infestació per C. suppressalis

Havent-se comprovat que l'expressió d'un gen fusió *mpi-pci* exerceix un efecte negatiu en el creixement de les larves de *C. suppressalis*, es va voler comprovar si la planta d'arròs resulta protegida front aquest insecte. Per tal de determinar si l'expressió d'un gen fusió *mpi-pci* conferia protecció a les plantes d'arròs front *C. suppressalis*, es realitzà un nou bioassaig amb les mateixes línies transgèniques i no transgèniques (varietats Ariete i Sénia), amb plantes en l'estadi de formació d'espiga. En aquest cas es col·locaren 10 plantes (3 testos) per cada una de les varietats control no transformada, així com per cada línia *mpi-pci*, i es disposaren en els dispositius entomològics. Aquestes plantes s'infestaren de la mateixa manera que en els bioassaigs anteriors a raó de 4 larves L2 per planta.

Així, 21 dies després de la infestació s'observà els efectes produïts per les larves de *C. suppressalis* en les diferents línies i les varietats control Sénia i Ariete. A la **Figura 51** es pot veure com l'aspecte de les plantes transgèniques *mpi-pci* infestades, restaven en general en bon estat després de 21 dies, en comparació amb les plantes control no transformades. En alguns casos, les fulles de la beina de les plantes transgèniques que havien estat perforades per les larves, estaven danyades arribant a presentar-se completament seques. En les plantes control però, aquest símptomes eren presents en la major part de les fulles de la planta.

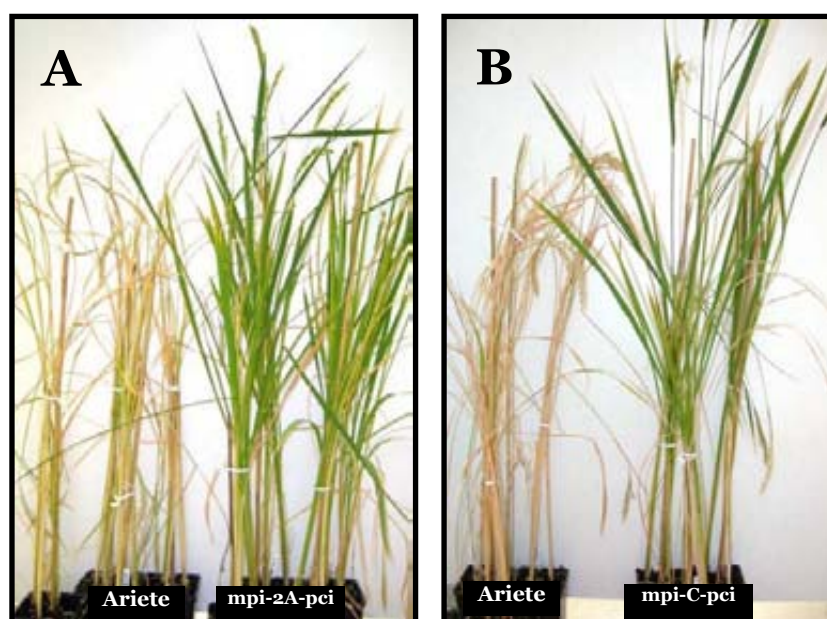


Figura 51. Efecte de la infestació amb larves de *C. suppressalis* en plantes transgèniques *mpi-pci*. Aspecte de les plantes 21 dies després de la infestació. A) Plantes control no transformades (Ariete) i plantes *mpi-2A-pci* B) Plantes control no transformades (Ariete) i plantes *mpi-C-pci*.

RESULTATS

Donat que les plantes emprades en el bioassaig es trobaven en estadi de formació d'espiga, es va poder comparar també l'efecte de la infestació amb larves de *C. suppressalis* sobre el desenvolupament de les espigues. Així, un cop finalitzats els bioassaigs, es van recuperar totes les espigues de les línies transgèniques així com de les varietats control. Tal i com es pot veure a la **Figura 52**, en les plantes control el nombre d'espigues blanques (síntoma característic del dany produït per *C. suppressalis* en la planta d'arròs) observades fou del 20 % en la varietat Ariete. Per contra en el cas de les línies transgèniques que expressen un gen fusió *mpi-pci*, aquests valors es mostraven significativament menors, oscil·lant entre 5,26% (línia 6.1 *mpi-C-pci*) i 13,1% (línia 24.3 *mpi-2A-pci*).

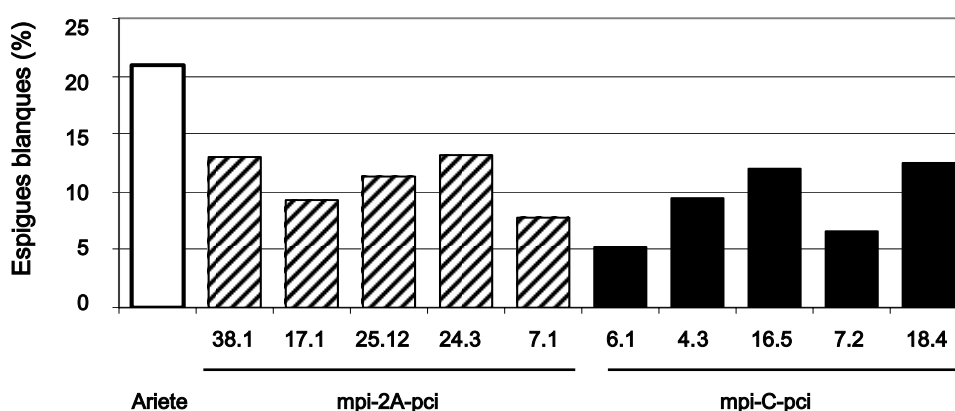


Figura 52. Percentatge d'espigues blanques (síntoma característic del dany produït per *C. suppressalis* en la planta d'arròs) de plantes control no transformades Ariete (columna blanca), plantes transgèniques *mpi-2A-pci* (columnes ratllades) i *mpi-C-pci* (columnes negres). Els valors s'expressen en % del total d'espigues recuperades per a cada línia.

Així doncs com a conclusió, aquests bioassaigs indicaven que l'expressió d'un gen fusió *mpi-pci* en plantes d'arròs protegeix a la planta de la infestació per *C. suppressalis*. Per completar aquests estudis seria, no obstant, necessari realitzar nous bioassaigs en els que la infestació amb larves de *C. suppressalis* es realitzés en altres estadis de creixement de la planta d'arròs. En qualsevol cas, els resultats aquí presentats pel que fa l'expressió d'un gen fusió del dos inhibidors de proteases, tant del gen *mpi-2A-pci* com del gen *mpi-C-pci*, ens permet concloure que el nivell de protecció observat en planta i l'efecte de retard en el creixement de les larves, és superior al que s'observa en el cas d'expressar-se únicament el gen *mpi* també sota control del promotor induïble *mpi* (Vila *et al.*, 2005).

I. A. 4 Plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *pci*: efecte sobre insectes lepidòpters

I. A. 4. 1 Producció i caracterització molecular de les plantes d'arròs *pci*

Paral·lelament a l'obtenció de línies transgèniques d'arròs que expressen un gen fusió *mpi-pci*, en el transcurs d'aquest treball s'han obtingut i caracteritzat plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *pci*. Es partí del cDNA de 309 pb del gen *pci* clonat en el vector pAHC17 (cedit pel Dr. F.X. Avilés, UAB), on va ser aïllat i caracteritzat (Villanueva *et al.*, 1998). La seqüència comprèn la regió de la proteïna madura, així com les regions N-terminal i C-terminal de la proteïna precursora. El gen *pci* es va clonar en la diana *BamHI* sota el control del promotor de la *ubiquitina 1* de blat de moro (*ubi*) i el terminador *nos*, en el vector para la transformació de plantes pCAMBIA1300. Els components del plàsmid utilitzat en el clonatge es mostren a la **Figura 53A**. Es van produir plantes transgèniques, varietat Ariete, mitjançant transformació amb *Agrobacterium*, fent servir el gen de resistència a la higromicina com a marcador de selecció. Així, s'obtingueren a la generació T₀ un total de 320 plantes resistents a higromicina que contenien el "cassette" per a l'expressió del gen *pci* (*ubi::pci::nos*).

Per tal de determinar el nivell d'expressió del gen *pci* en les diferents línies transgèniques (T₀), es van realitzar anàlisis per *Northern-blot*. Aquest anàlisi mostrà que un total de 190 dels 320 transformants primaris acumulaven a diferents nivells transcrits de *pci* en les seves fulles. En la **Figura 53B** es mostren els nivells d'acumulació de transcrits *pci* en les línies analitzades en aquest treball. No es va observar cap efecte en la morfologia o fertilitat en les línies d'arròs que expressen el gen *pci*. Es van seleccionar línies representatives de la T₀ i es van utilitzar com a línies parentals per obtenir una progènie homozigota (T₂).

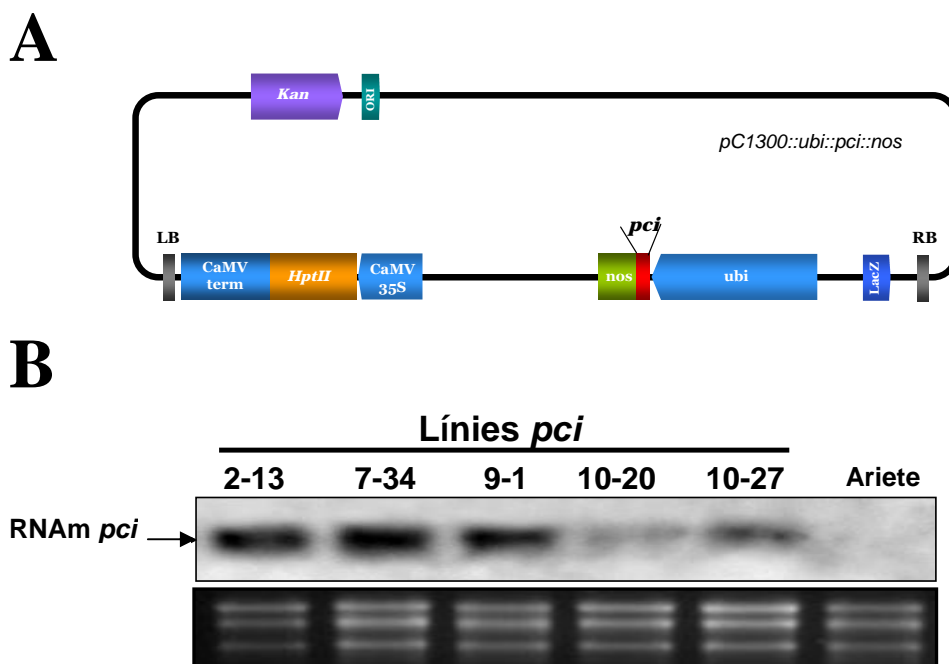


Figura 53. Plàsmid per a l'expressió en plantes del gen *pci* (A) i anàlisi *Northern blot* de les plantes d'arròs obtingudes (To) (B). A) L'expressió del gen *pci* es realitza sota el control del promotor de la ubiquitina de blat de moro (*ubi*) i el terminador *nos*. El gen *hptII* que codifica la resistència a higromicina es va fer servir com a marcador de selecció en la transformació. 35SCaMV, promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor. RB, *right border*. LB, *left border*. B) Anàlisi del RNA total (10 µg) obtingut de fulles de plantes d'arròs (To) resistents a higromicina i plantes Ariete control no transformades. El RNA es va separar per electroforesi en gels d'agarosa/formaldehid, es va transferir a membranes de nylon i es va hibridar amb una sonda *pci* marcada radioactivament amb ³²P. A la part inferior es mostra la tinció amb bromur d'etidi dels RNAs analitzats.

Per tal de confirmar que la proteïna PCI produïda en plantes d'arròs era funcional es va analitzar l'activitat inhibidòria del PCI present en extractes proteics de fulles d'arròs transgènic, sobre la carboxipeptidasa A bovina. Es coneix que el PCI és un potent inhibidor d'aquest enzim. Per fer-ho, es realitzaren assaigs d'inhibició de l'activitat de la carboxipeptidasa A bovina (Sigma) amb diferents quantitats d'extracte proteic de fulles de plantes control Ariete i plantes *pci* (línies 2.13, 7.34, 9.1 i 10.27). Seguidament es realitzaren els assaigs d'activitat emprant el substrat sintètic AAFP (substrat específic per a CPA).

Els extractes obtinguts a partir de fulles de plantes no transgèniques mostren una certa activitat inhibidora de la carboxipeptidasa A bovina. Els extractes de fulles de plantes transgèniques *pci* mostraven una activitat inhibidora de la CPA bovina superior en totes les línies analitzades a la que s'observa per extractes de plantes no transgèniques. A la **Figura 54** es mostren els resultats obtinguts amb les línies 7.34 i 9.1, respecte el control (Ariete). Aquests resultats confirmaven la funcionalitat de l'inhibidor PCI en ser expressat en plantes d'arròs.

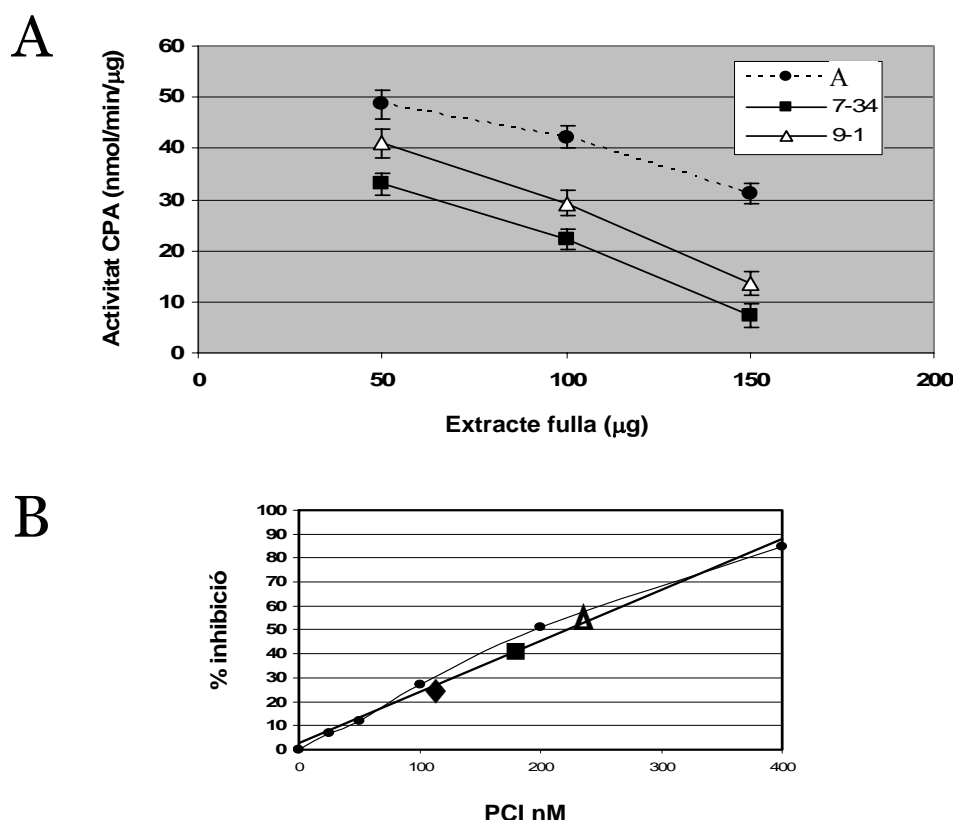


Figura 54. Activitat del PCI. A) Activitat CPA en presència de quantitats creixents d'extractes proteics de plantes d'arròs Ariete control (A) i plantes transgèniques *pci* (línies 7.34 i 9.1). Les unitats s'expressen en nmols de substrat AAFP degradats per minut i µg de CPA (CPA bovina). Es realitzaren tres assaigs independents. Les barres indiquen l'ESM. B) Activitat relativa PCI en fulles de línies transgèniques d'arròs. Els nivells de PCI en fulles de plantes transformades d'arròs foren estimats mitjançant 100 µg de proteïna total soluble en assaig d'inhibició de l'activitat carboxipeptidasa A. La taxa d'inhibició fou comparada amb la corba d'inhibició estàndard obtinguda a partir de 100 µg d'extractes de fulles Ariete amb concentracions conegudes de PCI recombinant (25-400 nM) (línia de punts). A partir de la línia de tendència obtinguda, es mostra l'estimació de la concentració de PCI en les línies d'arròs analitzades: línies 7.34 (Δ); 9.1 (■) i 10.27 (♦).

RESULTATS

Les quantitats relatives de PCI en les línies transgèniques d'arròs van ser també determinades mitjançant una comparació dels percentatges d'inhibició de la CPA bovina amb una quantitat fixa (100 µg) d'extractes de fulla de les diferents línies i plantes Ariete control. Així, es realitzaren una sèrie de dilucions de PCI purificat (25-400 nM) que foren incubats amb 100 µg d'extracte total de fulles Ariete control, per tal de generar una recta patró d'inhibició de la CPA bovina. A partir dels percentatges d'inhibició obtinguts (amb 100 µg d'extracte proteic de cada línia transgènica), s'estimà la concentració de PCI en els extractes per extrapolació. Aquest assaig va permetre estimar la concentració relativa de PCI de les diferents línies assajades, en aproximadament un 0,55%, 0,40% i 0,25% de la proteïna total soluble, línies 7.34, 9.1 i 10.27, respectivament (**Figura 54B**).

Així doncs els nivells d'acumulació relatius de l'inhibidor PCI en extractes proteics de fulles d'arròs(7.34 > 9.1 > 10.27 en proteïna MPI), coincideixen en general amb els nivells de transcrits detectats per aquestes línies en els anàlisis de *Northern-blot*.

I. A. 4. 2 Bioassaigs en plantes d'arròs amb expressió constitutiva del gen pci: efecte sobre el pes i creixement de larves de C. suppressalis i S. littoralis alimentades en plantes transgèniques

Tal i com s'ha presentat a l'apartat anterior, l'expressió en plantes d'arròs d'un gen fusió *mpi-pci* tenia un efecte de reducció de pes i retard en el desenvolupament de larves de *Chilo suppressalis* en ser alimentades en les plantes transgèniques. Així mateix, l'expressió d'aquests gens fusió en plantes d'arròs conferia una protecció front l'atac per *C. suppressalis*. El mateix efecte però en menor grau s'havia observat anteriorment per l'expressió del gen *mpi* en plantes d'arròs (Vila *et al.*, 2005)

Per tal de determinar l'efecte de l'expressió individual del gen *pci* sobre *C. suppressalis*, es va realitzar un bioassaig amb plantes transgèniques d'arròs que expressaven constitutivament el gen *pci*. Les plantes (generació T3) utilitzades en aquest bioassaig es trobaven espigues en formació i foren infestades amb larves (L2) tal i com es realitzà en les bioassaigs anteriors.

Després d'un període d'infestació de 14 dies, les larves foren recuperades de les diferents línies, així com de les plantes de la varietat control Ariete, i pesades de manera individual.

En la **Figura 55** es mostra el pes de les larves alimentades en tres línies *pci* independents (que provenen de diferents calls) en relació a les alimentades en plantes control de la varietat Ariete. A diferència del que s'havia observat en el cas de les plantes d'arròs *mpi* o *mpi-pci*, s'observà un augment significatiu del pes en les larves recuperades de les línies transgèniques *pci* 2.13 ($P \leq 0,01$) i 9.1 ($P \leq 0,05$) respecte al valor obtingut per les larves alimentades en les plantes Ariete control. En el cas de les larves alimentades en la línia 10.27, que mostrava menor nivell d'expressió del transgen, no s'observen diferències respecte a les larves alimentades en plantes control. Els pesos promig de les larves alimentades en les diferents línies es mostren a la **Figura 55B**.

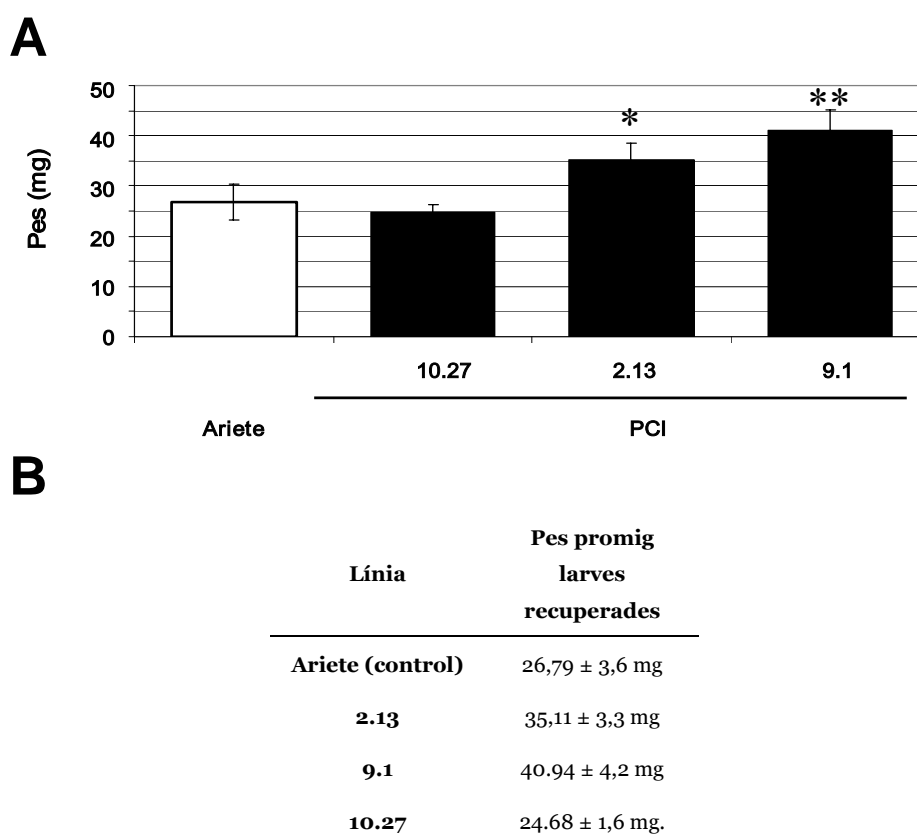


Figura 55. Pes mitjà de les larves de *C. suppressalis* recuperades de plantes transgèniques *pci* (columnes negres) (generació T3). S'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a controls (columna blanca). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard (Test t-Student; ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$).

La distribució en funció del pes de les larves recuperades en aquest bioassaig es mostra a la **Figura 56**.

RESULTATS

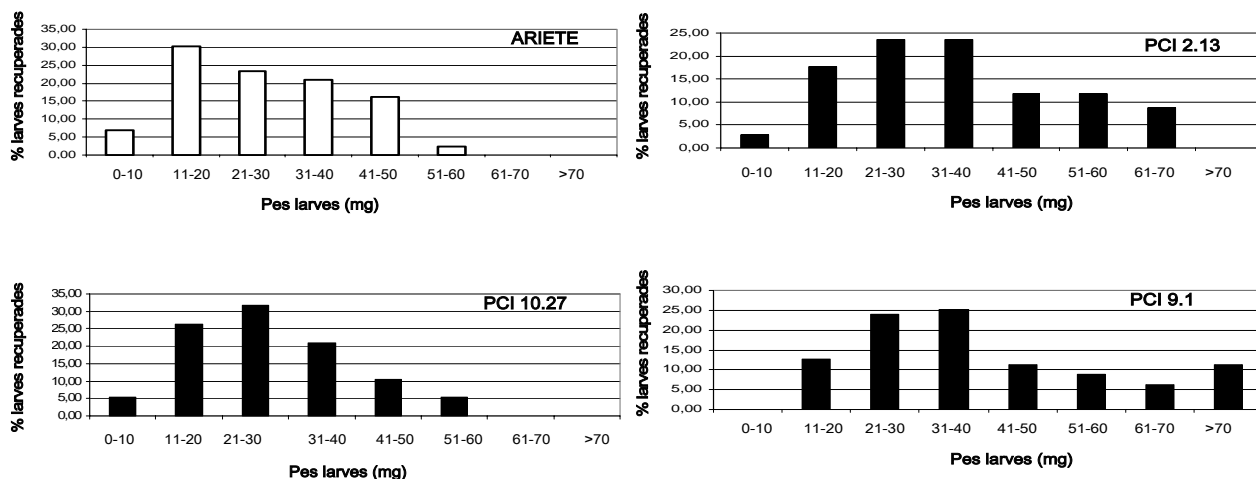


Figura 56. Distribució en grups de pes de larves de *C. suppressalis* recuperades de plantes transgèniques *pci* (columnes negres) de la generació T2 i plantes Ariete no transformades (columnes blanques). Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia.

Així, els pesos de les larves alimentades en les plantes transgèniques d'arròs *pci* es trobaven en grups de pes lleugerament superiors, trobant el màxim nombre d'individus en els grups de pes de 21-40 mg (línies 2.13 i 9.1). A més, tal i com es veu a la **Figura 56**, es trobaren fins i tot larves en els estadis més avançats (fins a més de 70 mg) també en el cas de les línies 2.13 i 9.1, fet que no s'observa a les plantes control no transformades (ni en el cas de la línia 10.27).

Al determinar-se el número de larves totals recuperades, no s'observaren diferències significatives entre les línies transgèniques i les plantes Ariete control (**Figura 57**). El percentatge de larves recuperades fou del 91% (línia 2.13), del 93% (línia 9.1) i del 82% (línia 10.27), mentre que en les plantes d'arròs de la varietat Ariete control fou del 85%.

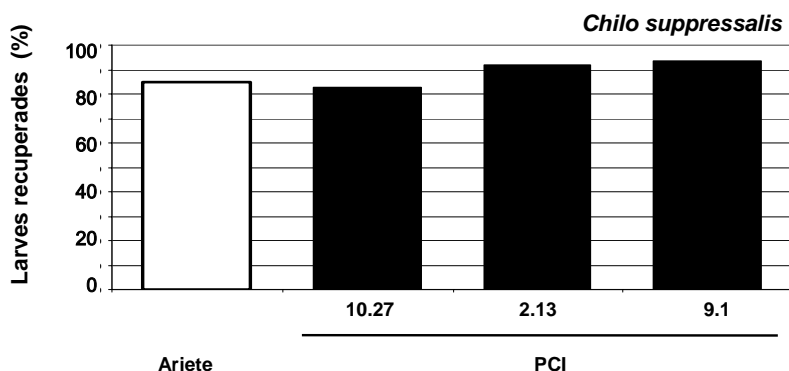


Figura 57. Percentatge de larves de *C. suppressalis* recuperades de plantes transgèniques *pci* (columnes negres) de la generació T3 i plantes Ariete no transformades (columna blanca).

Per altra banda, s'observà en aquest bioassaig de plantes amb expressió constitutiva del gen *pci*, que totes les plantes utilitzades mostraven un fenotip similar al de les plantes Ariete no transformades, al cap de quinze dies d'infestació amb larves L2 de *C. suppressalis* (resultats no mostrats).

En aquest punt del treball, es va decidir també analitzar si el fenomen observat en l'increment de pes de les larves de *C. suppressalis* al alimentar-se en plantes d'arròs *pci*, succeïa també amb una segona espècie d'insecte plaga, el lepidòpter generalista *Spodoptera littoralis*. Els bioassaigs amb *S. littoralis* es realitzaren també amb larves L2, en aquest cas alimentades amb una dieta que consistia en fulles de plantes d'arròs, tant control no transformades com transgèniques *pci*. Es va mesurar diàriament el pes individual de les larves del bioassaig, tant per les línies *pci* (7.34, 9.1 i 2.13) així com de les plantes alimentades en plantes Ariete control durant 4 dies consecutius. A més, es va determinar el percentatge de teixit foliar consumit per les larves. Els resultats obtinguts a partir de tres experiments independents es mostren a la **Figura 58**.

Les larves alimentades en fulles de plantes *pci*, mostraren un creixent significativament major que les larves alimentades amb fulles de plantes Ariete control. Després dels 4 dies d'infestació, l'increment de pes de les larves alimentades en fulles de plantes *pci* fou del 72% (línia 7.34), 62% (línia 9.1) i 58% (línia 2.13). Per altra banda, tal i com es mostra a la **Figura 58B i C**, aquest augment de pes observat en les larves de *S. littoralis*, anà acompanyat per un increment en el consum del material foliar. Queda no obstant pendent per futurs estudis el determinar el nivell d'expressió de cada transgen individual i l'acumulació del seu corresponent producte gènic, en les línies assajades en aquest estudi.

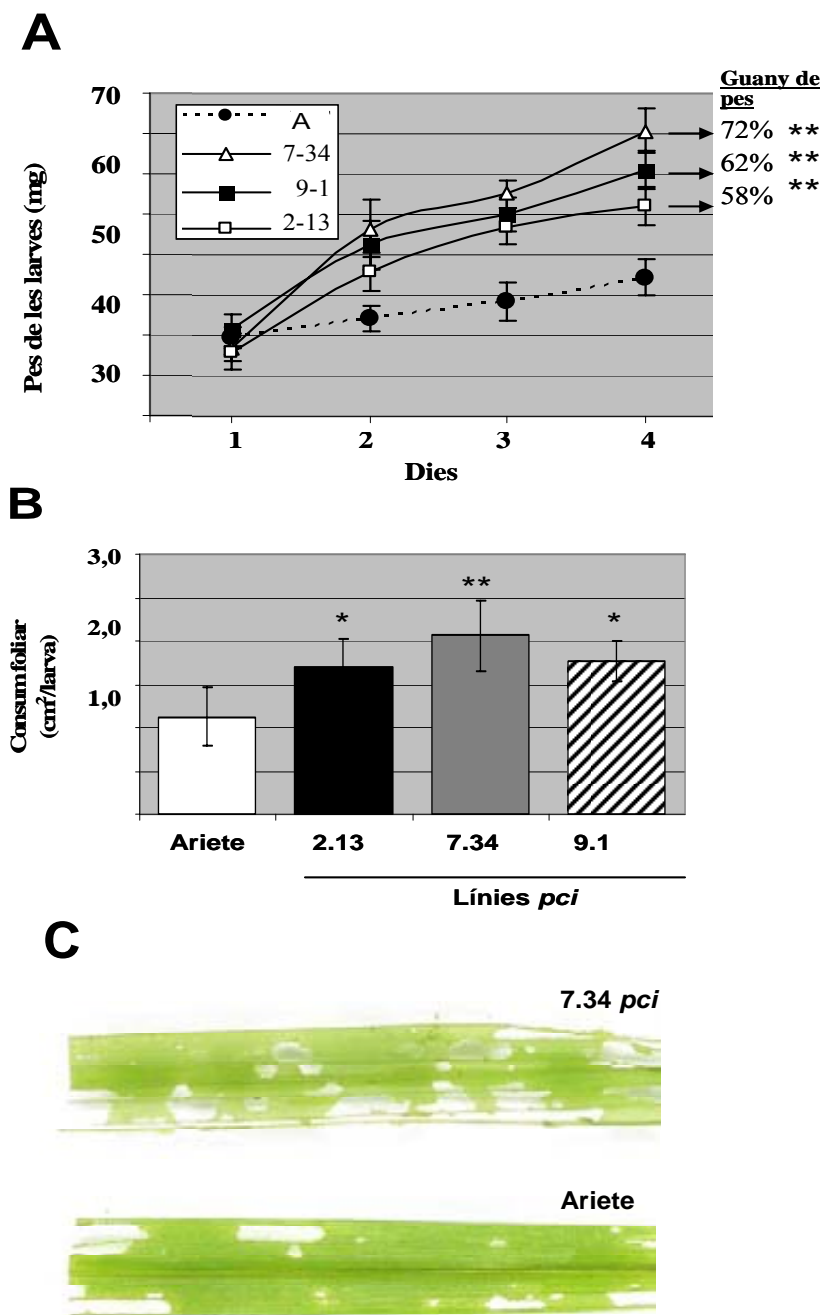


Figura 58. Bioassaig de les plantes d'arròs *pci* amb larves de *Spodoptera littoralis*. A) Creixement de larves de *S. littoralis* (L2) alimentades amb fulles de plantes Ariete control i plantes homozigotes T2 que expressen el gen *pci* (línies 7.34, 9.1 i 2.13). S'utilitzaren 20 larves per línia durant 4 dies sobre fulles d'arròs. Les larves foren pesades diàriament, mostrant-se la mitja de pes diari. B) Consum de material foliar d'arròs causat per *S. littoralis*. Es mostra la superfície total consumida (cm²) per larva. C) Efecte de la infestació amb larves de *S. littoralis* (L2) en fulles d'arròs *pci*. Aspecte representatiu d'una fulla de la línia 7.34 *pci* després de 24h (fotografia superior), comparant amb una fulla Ariete control en les mateixes condicions (foto inferior). Les barres d'error en A) i B) indiquen l'error estàndard de la mitja (Test t-Student; ** P≤0.01, * P≤0.05).

Així, els resultats obtinguts en els experiment de bioassaigs amb *C. suppressalis* i *S. littoralis*, revelen un augment de pes de les larves d'ambdós insectes plaga, al ser alimentades en línies *pci*, superior a l'observat en les larves alimentades en plantes/fulles Ariete control. Aquest efecte de guany de pes de les larves alimentades en plantes d'arròs *pci* és més acusat sobre un insecte polífag, com *S. littoralis*, que sobre un insecte monòfag de l'arròs com *C. suppressalis*.

I. A. 5 Plantes d'arròs que expressen simultàniament els gens *mpi* i *pci* obtingudes mitjançant creuaments

I. A. 5. 1 Caracterització molecular de les línies obtingudes per creuament

Donat que es disposava de línies transgèniques d'arròs que expressen de manera constitutiva bé el gen *mpi* (Vila *et al.*, 2005) o bé el gen *pci* (Apartat I.A.4), es va decidir obtenir línies que expressessin simultàniament ambdós transgens mitjançant creuament sexual. El creuament es va realitzar entre la línia *pci* 7.34 i la línia *mpi* 24.6, ambdós en fons genètic d'Ariete.

Es van realitzar tres sembres escalonades en intervals d'una setmana amb 30 plantes de cada línia per sembra. Es va utilitzar la línia 7.34 *ubi:pci* (generació T3) com a “donadora” (♂) i la línia 24.6 *ubi:mpi* (generació T3) com a “receptora” (♀). Un cop realitzats els creuaments, s'obtingueren 3 línies viables (anomenades **MxP1**, **MxP2** i **MxP3**), les quals foren sembrades als hivernacles per tal d'obtenir-ne la següent generació. Durant aquest procés, es prengueren mostres per tal d'extreure DNA del teixit foliar, i es va confirmar la presència d'ambdós gens mitjançant PCR (**Figura 59**). Es va confirmar l'autenticitat del producte de la amplificació per PCR mitjançant seqüenciació, per plantes de les tres línies obtingudes .

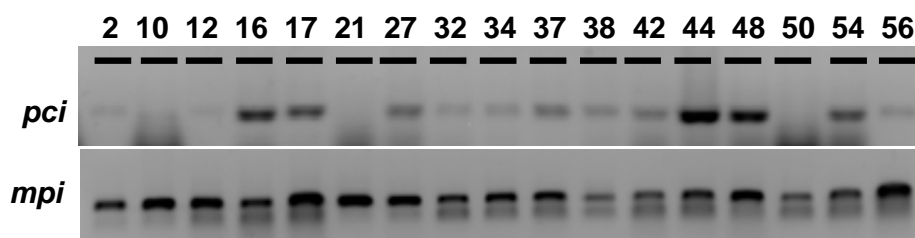


Figura 59. Amplificació per PCR dels gens *mpi* i *pci* a partir de DNA de fulles de plantes MxP obtingudes per creuament. Es mostra el resultat de 17 plantes representatives.

I. A. 5. 2 Bioassaigs de les plantes que expressen simultàniament els gens *mpi* i *pci* amb larves de *C. suppressalis*

Un cop comprovada la integració d'ambdós gens *mpi* i *pci* en les línies obtingudes, es seleccionaren 24 plantes de cada una de les 3 línies, per a la realització del bioassaig amb larves de *Chilo suppressalis*. Es sembraren les plantes de tres en tres, i es disposaren a les taules d'una de les cèl·lules dels hivernacles del CIRAD (Montpeller), i s'infestaren amb 4 larves en estadi L2 per planta. Un cop passats 14 dies, es recuperaren les larves de les diferents plantes de manera individual foren posteriorment pesades. En la **Figura 60** es mostren el promig de larves recuperades en cadascuna de les plantes MxP individualment. En un alt percentatge de les plantes avaluades, s'observà una disminució significativa ($p < 0,005$) del pes mitjà en les larves recuperades.

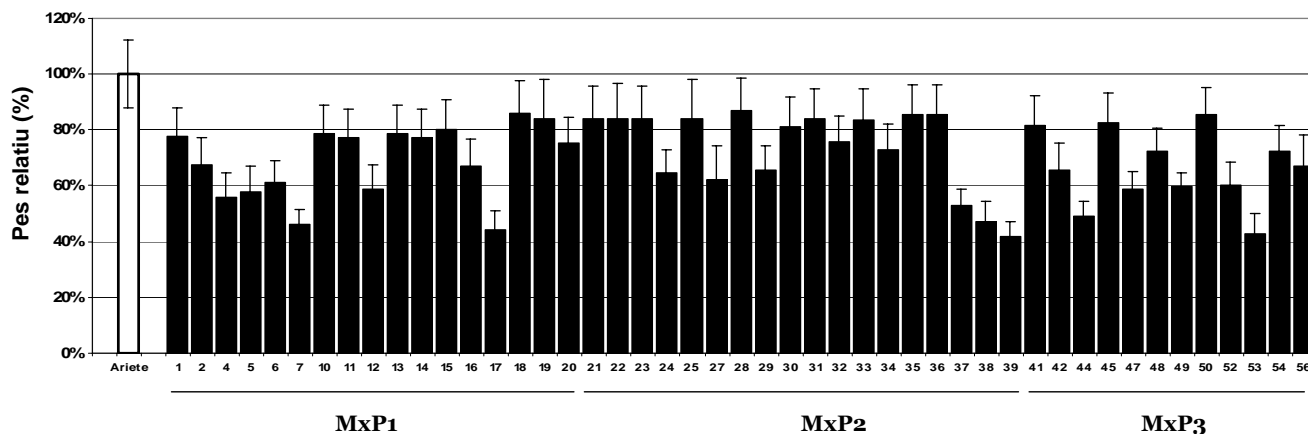


Figura 60. Pes de les larves de *C. suppressalis* recuperades de plantes que expressen simultàniament els gens *mpi* i *pci* obtingudes per creuaments (MxP1, MxP2 i MxP3). S'indica el pes relatiu (percentatge) en comparació amb les larves recuperades de plantes Ariete control (columna blanca). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard (Test t-Student: $P \leq 0,05$)

Així doncs, els resultats obtinguts en aquest bioassaigs amb les línies obtingudes per creuaments *mpi x pci*, s'assemblen als anteriorment obtinguts amb les línies transgèniques que expressen un gen fusió *mpi-pci*. S'observa una reducció en el pes de les larves alimentades en les línies dobles transgèniques que oscil·la entre el 14% i el 58% (depenent de la línia) respecte el pes que aconseguixen les larves que s'alimenten en plantes no transformades (Ariete).

I. A. 6 *Plantes d'arròs amb expressió constitutiva de gens Cry1Aa i Cry1B: bioassaigs amb C. suppressalis*

En el context d'una col·laboració anterior entre el nostre laboratori i el grup del Dr. Emmanuel Guiderdoni del CIRAD de Montpellier, s'havien obtingut línies transgèniques d'arròs que expressaven els gens Cry1B o Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*. Així doncs, i en paral·lel als bioassaigs amb les línies d'arròs que expressen inhibidors de proteases, es van portar a terme també bioassaigs amb línies transgèniques d'arròs portadores d'aquests gens *Cry* de *B. thuringiensis*.

Així, s'utilitzaren plantes de la varietat Ariete transformades bé amb el gen *Cry1B* (línia A3.4), o bé amb el gen *Cry1Aa* (línies A19.14-1, A19.14-3 i A19.14-7), en ambdós casos sota control del promotor constitutiu *ubi1*. Es van assajar també plantes obtingudes a partir del creuament entre aquestes línies i portadores, per tant, d'ambdós gens *Cry1B* i *Cry1Aa* (A3.4 x A.19.14, línies 1, 2 i 3).

Les línies *Cry1B* i *Cry1Aa*, utilitzades en aquest estudi, havien mostrat una protecció molt efectiva front l'atac del barrinador de l'arròs en assaigs de camp, amb resultats comparables als obtinguts amb l'ús d'insecticides químics en plantes Ariete control (Breitler *et al.*, 2004).

Per tal de realitzar el bioassaig, es sembraren 21 plantes per línia i es creixeren als hivernacles. S'infestaren amb 4 larves de *C. suppressalis* en estadi L2, tal i com es va realitzar en les bioassaigs amb plantes d'arròs que expressen inhibidors de proteases. Als 14 dies després de la infestació les plantes es van disseccionar per recuperar les larves del interior de les tiges. El nombre de larves recuperades de les línies *Bt* fou molt reduït, tant en el cas de les línies amb expressió individual dels gens *Cry* (*Cry1Aa* i *Cry1B*), com en el cas dels creuaments *Cry1B* x *Cry1Aa* (**Figura 61**).

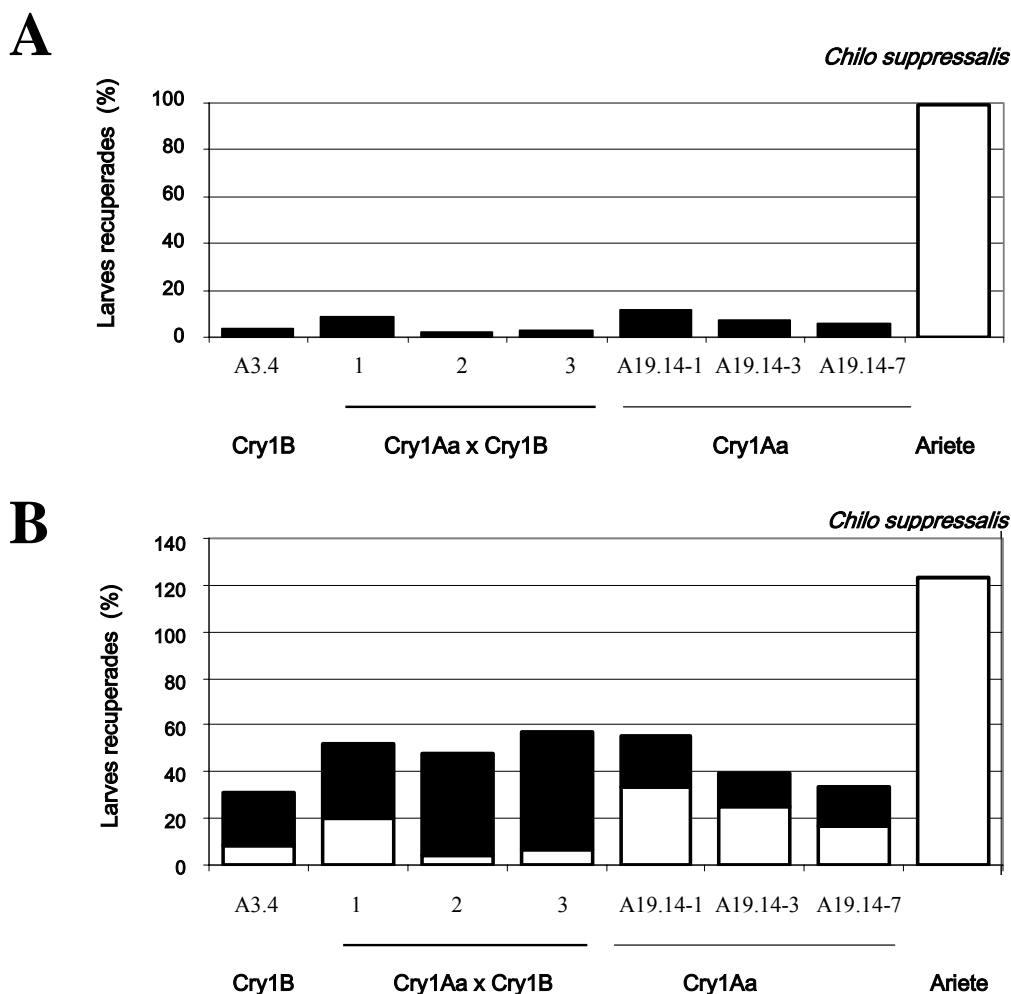


Figura 61. Bioassaig amb *C. suppressalis* de plantes d'arròs control Ariete i plantes transgèniques *Cry1Aa*, *Cry1B* i *Cry1Aa x Cry1B*. A) Percentatge del total de larves recuperades de cada línia. B) Percentatge de larves recuperades vives (columna blanca) en comparació amb el percentatge de larves recuperades mortes (columnes negres) per cada línia.

El percentatge de mortalitat de les larves fou molt elevat en el cas de les línies *Cry1Aa x Cry1B*, mentre que en les plantes de la varietat Ariete control fou pràcticament nul (**Figura 61B**). Donat el reduït nombre de larves recuperades de les diferents línies *Bt*, no es va poder determinar el pes d'aquestes, tot i que s'observà un efecte més nociu en el cas de les línies obtingudes pel creuament *Cry1Aa x Cry1B*. A la **Figura 62** es mostra l'aspecte representatiu de les larves recuperades de les diferents línies del bioassaig.

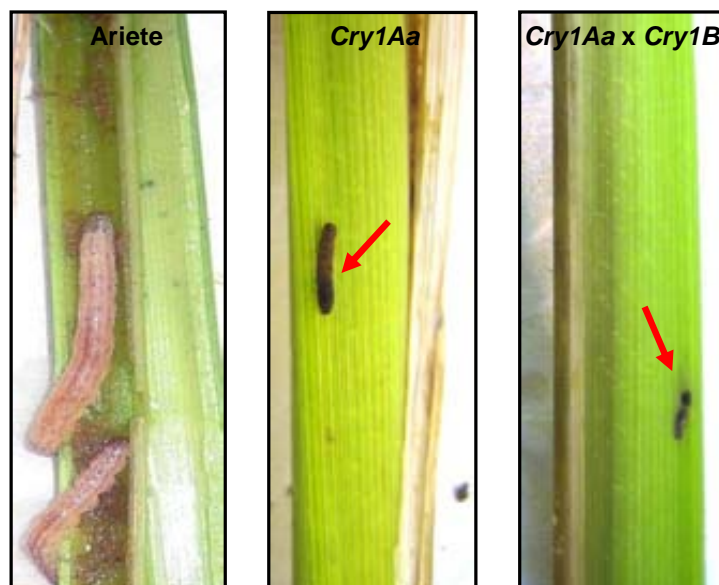


Figura 62. Aspecte de les larves de *C. suppressalis* recuperades de plantes Ariete no transformades i de plantes transgèniques *Cry1Aa* i *Cry1Aa x Cry1B*, després de 14 dies d'infestació.

S'observà a partir dels resultats obtinguts en aquest bioassaig, que totes les plantes que expressen els gens *Cry*, restaven en bon estat després de 14 dies d'infestació amb *C. suppressalis*, a diferència de les plantes Ariete no transformades, que ja es trobaven més danyades (resultats no mostrats). Totes les plantes assajades foren utilitzades per la recuperació de larves del seu interior, per aquesta raó no es va poder continuar amb el creixement de les plantes durant temps més llargs per comprovar el seu efecte de protecció (aquests mateixos resultats van ser publicats anteriorment per Breitler *et al.*, 2001, 2004).

Així doncs, aquests resultats confirmen, tal i com es descriu a la literatura, el fort efecte insecticida de les proteïnes CRY, que és superior al que s'observa en el cas d'altres inhibidors de proteases.

I.B PCI: UN INHIBIDOR DE PROTEASES AMB ACTIVITAT ANTIFÚNGICA

Tot i que són escassos, existeixen a la literatura alguns exemples d'inhibidors d'endoproteases pels quals s'ha descrit activitat antifúngica *in vitro* (Joshi *et al.*, 1998; Pernas *et al.*, 1999; Valueva i Molosov, 2004; Kim *et al.*, 2005). Per altra part, tal i com succeeix en el cas d'altres gens implicats en defensa, com els gens *PR*, s'ha descrit que gens concrets que codifiquen inhibidors de proteases són induïts en resposta a infecció per patògens (Cordero *et al.*, 1994; Valueva i Molosov, 2004).

Durant el desenvolupament d'aquest treball, es va decidir realitzar un estudi per tal de determinar si PCI presenta activitat antifúngica front a patògens de l'arròs.

I. B. 1 Anàlisi de l'expressió del gen *pci* en plantes de patata infectades amb *P. infestans*

En primer lloc es va determinar si l'expressió del gen *pci* es veia induïda en patata per infecció. Per fer-ho, es va analitzat l'efecte de la infecció fúngica en els nivells d'acumulació de transcrits de *pci* en plantes de patata. Com a patogen, s'utilitzà l'oomicet *Phytophthora infestans*. Així, es van inocular fulles amb espores de *P. infestans*, i es van recollir mostres a diferents temps post-inoculació, així com també de fulles control, no infectades. Es realitzaren anàlisis d'expressió mitjançant RT-PCR a partir dels mRNAs obtinguts per aquestes mostres. Els transcrits *pci* gairebé no es detectaren en les fulles de plantes de patata control no infectades. Passades 16 h des de la inoculació, l'acumulació de transcrits *pci* incrementà notablement (**Figura 63**). La inducció de l'expressió del gen *pci* induïda per patògens fou, però, transitòria. Així, els nivells de transcrits de *pci* disminuïren 24h després de la inoculació fins nivells similars als que s'observen en fulles no infectades. Durant la resta del període d' infecció estudiat (fins a 7 dies després de la inoculació) l'expressió del gen *pci* es manté en nivells similars en fulles infectades i no infectades. Com a control s'utilitzà RNA procedent de fulles de plantes de patata ferides o tractades amb MeJA. Així, l'expressió del gen *pci* s'activà fortament per ferida i tractament amb MeJA (Figura 63, carrils F i MeJA), resultats que concorden amb els anteriorment publicats per Villanueva i col.laboradors (1998).

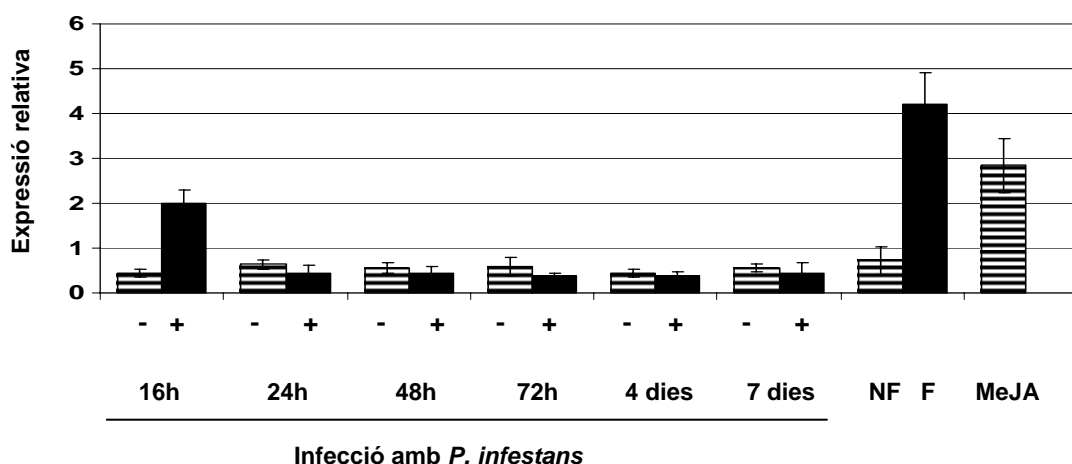


Figura 63. Expressió del gen *pci* en plantes de patata infectades amb l'oomicet *P. infestans*. Es va obtenir RNA total de fulles control i fulles infectades amb *P. infestans* als temps post-inoculació indicats (-, no infectat; +, infectat). Les fulles de patata van ser també ferides mecànicament (F, ferida; NF, no ferida) o bé tractades amb MeJA (50 μ M, MeJA) i es va extraure el RNA total passades 16 h del tractament. En les reaccions de RT-PCR es va emprar 2 μ g de RNA total. Com a control intern es va analitzar l'expressió del gen *actina* de patata. Es van realitzar 3 assaigs de RT-PCR amb 3 mostres de RNA independents. Les barres sobre les columnes indiquen l'ESM. La quantificació de l'expressió es va realitzar amb el programa *Quantity One (BioRad)*.

Si bé aquests resultats mostraren una inducció ràpida però transitòria de l'expressió del gen *pci* en les fulles de patata infectades, queda pendent de futurs estudis el poder determinar si l'inhibidor PCI presenta activitat inhibidora del creixement de *P. infestans*. La transitorietat de l'expressió d'aquest gen en fulles infectades podria indicar que, d'alguna manera el fong és capaç de contrarestar la resposta de defensa inicial de la planta, i per tant, pot desenvolupar-se i desencadenar la malaltia en la planta. Per comprovar aquest punt s'hauran de realitzar estudis d'expressió d'altres gens de defensa de patata en la seva interacció amb *P. infestans* i d'expressió del gen *pci* en situacions d'infecció amb fongs no patògens per la planta.

I. B. 2 Activitat antifúngica in vitro de la proteïna PCI

En una primera aproximació, i per poder determinar si la proteïna PCI mostrava activitat antifúngica front *M. grisea*, es van realitzar assaigs de creixement *in vitro* del fong en presència o absència de l'inhibidor. Així, espores de *M. grisea* foren pre-germinades en PDB, en plaques de microtitulació, per un període de 6h. Seguidament s'afegiren quantitats creixents de la proteïna PCI. La proteïna fou produïda en *E. coli* i la seva puresa fou confirmada per HPLC (Molina *et al.*, 1992) en el grup del Dr. FX. Avilés (UAB). Es va continuar el creixement del fong a 28°C. Es va fer un seguiment del creixement del fong a diferents temps mitjançant espectroscòpia (DO_{595nm}) i microscòpia, per tal d'establir si existia un efecte per part de l'inhibidor PCI. Tal i com es pot veure a la **Figura 64**, el creixement de *M. grisea* és inhibit significativament en presència de PCI. A les 48 h després de l'inici de la germinació, una concentració de PCI de 20 μ M fou suficient per inhibir el creixement del fong en un 50%. També s'observà com increments de la concentració de PCI fins a 45 μ M resultaren en una inhibició del creixement de *M. grisea* del 70%. Com a control el fong es va créixer en presència de BSA, cultius que presentaven un creixement normal, o en presència de l'agent fungicida *nystatin* (0,1 μ g/ μ l), el qual inhibia totalment el creixement del fong (resultats no mostrats).

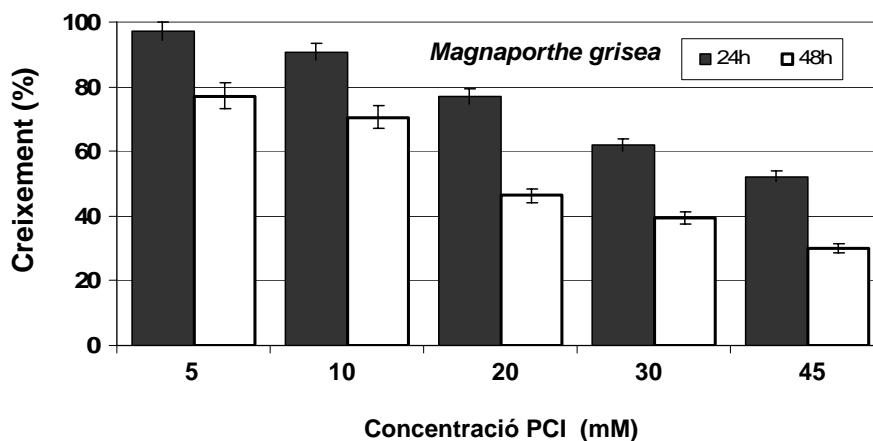


Figura 64. Assaig antifúngic *in vitro*. Les espores del fong es van pre-germinar durant 6h en el medi PDB (*potato dextrose broth*) abans de l'addició del PCI a les concentracions finals indicades. Es van determinar les absorbàncies dels cultius fúngics passades 24 i 48h de la incubació amb PCI (columnes negres i blanques, respectivament). El creixement fúngic s'expressa com el percentatge de creixement als cultius control (el 100% representa el creixement del fong en el medi PDB, sense PCI). Es van realitzar 3 experiments independents amb preparacions independents de PCI, així com 3 rèpliques de cada concentració. Les barres sobre les columnes indiquen l'ESM.

Paral·lelament, al analitzar per microscòpia els cultius de *M. grisea* crescut en presència de PCI s'observà que aquest presentava hifes més curtes i primes, amb regions amb algunes constriccions, formant una aparença de rosari, inclòs a baixes concentracions (5µM). A la **Figura 65** es mostren els canvis en la morfologia de les hifes del fong *M. grisea*, causats per la presència de l'inhibidor PCI en el medi de creixement. A partir d'aquests resultats es pot concloure que una concentració baixa de PCI inhibeix el creixement *in vitro* de *M. grisea*.

Per a una millor caracterització de l'efecte d'inhibició per PCI en el creixement de *M. grisea*, es va fer servir el colorant selectiu “vermell Congo” (*Congo red*). Aquest colorant, que presenta una elevada afinitat pels β-glucans, s'uneix a la quitina. La quitina, component estructural de la paret cel·lular de molts fongs, inclòs *M. grisea*, és rica en β-glucans. El colorant “vermell congo” permet diferenciar, per tant, si les hifes estan en creixement o no (Matsuoka *et al.*, 1995). Les hifes amb un creixement actiu, presenten poca deposició de quitina a les puntes i per tant, un marcatge amb el vermell Congo reduït. Per contra, la coloració amb el vermell Congo incrementa en els extrems de les hifes on el creixement està inhibit. Així, es varen pre-germinar espores de *M. grisea* durant 6h i després d'afegir-li PCI a una concentració de 40 µM, es va continuar el creixement del fong a 28°C (durant 16h més). A continuació el cultiu es va tenyir amb vermell Congo i es va observar mitjançant microscòpia confocal. Els resultats obtinguts en marcar amb vermell Congo cultius de *M. grisea*, no tractats o tractats amb PCI, es mostren a la **Figura 65B**. Els cultius de *M. grisea* tractats amb PCI presenten una coloració vermella més marcada a la punta de les hifes, en comparació amb els cultius crescuts en condicions control (no tractats), indicant que el creixement de les hifes es frenat en cultius fúngics que han estat incubats amb PCI.

Aquests resultats confirmen que efectivament la presència de PCI en el medi inhibeix el creixement *in vitro* de *M. grisea*.

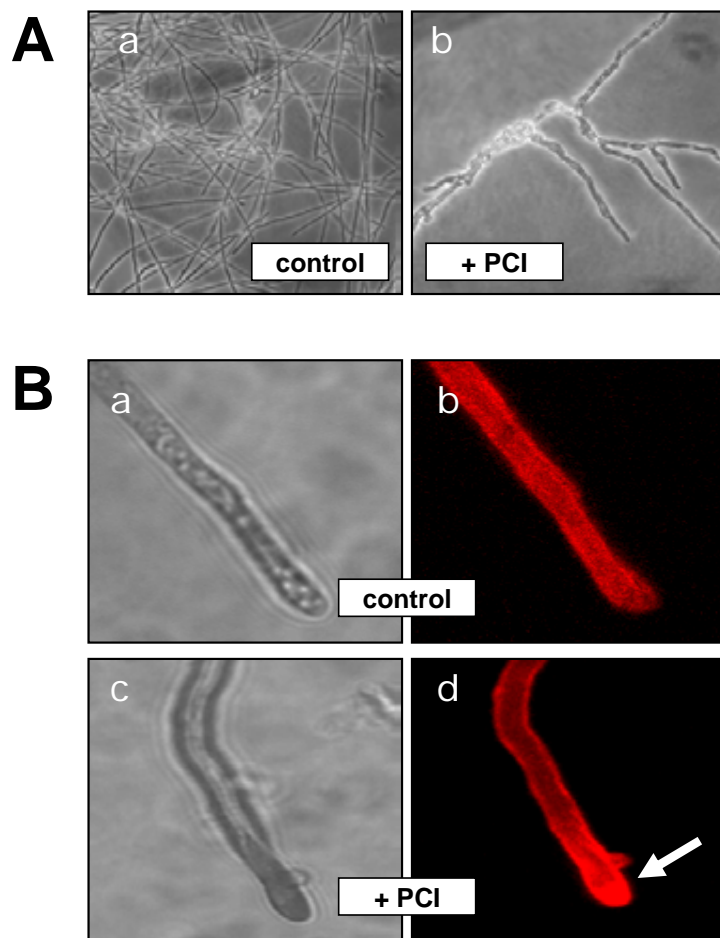


Figura 65. Activitat antifúngica *in vitro* del PCI front *M. grisea*. A) Miceli de *M. grisea* observat al microscopi. El fong es va créixer en medi PDB en absència (a) o en presència de 40 μ M PCI durant 16h (b). Es van realitzar observacions microscòpiques després de 16h d'incubació. B) Tinció amb vermell congo de cèl·lules de *M. grisea* crescudes en absència (a i b) o presència (c i d) de PCI tal i com s'indica en A. Els cultius fúngics, després de tenyir-se amb vermell congo, es van examinar amb microscòpia confocal, realitzant imatges seqüencials a intervals de 0.1 μ m. Es mostres les imatges de transmissió (a i c) així com les projeccions de les hifes de *M. grisea* tenyides amb vermell congo (b i d). En els cultius tractats amb PCI s'observa una inhibició del creixement, que es revela amb la deposició de quitina observada a la punta de les hifes.

I. B. 3 Localització de l'inhibidor PCI en hifes de M. grisea

Una vegada provada l'activitat antifúngica del PCI front *M. grisea*, es va analitzar la localització de la possible diana del PCI en les hifes de *M. grisea*. Per dur-ho a terme, es va realitzar un marcatge fluorescent de la proteïna PCI amb el fluorocrom Alexa-488 (emissió en verd). La proteïna PCI marcada fluorescentment es va utilitzar en assaigs de creixement *in vitro* amb el fong *M. grisea*, seguit d'observacions dels cultius per microscòpia confocal. D'aquesta manera es va confirmar que les propietats antifúngiques de la proteïna marcada amb Alexa-488 eren similars a les obtingudes amb el PCI sense marcar, sota les mateixes condicions experimentals, descartant d'aquesta manera una influència negativa del marcatge sobre l'activitat del PCI (resultats no mostrats). Un cop pre-germinades 8h les espores, els cultius de *M. grisea* es van

créixer en presència de l'inhibidor marcat amb Alexa-488. L'observació amb el microscopi confocal va revelar que la fluorescència del PCI marcat es distribuïa de forma uniforme en la perifèria de les hifes de *M. grisea* (**Figura 66A**). No es va detectar fluorescència en l'interior de les cèl·lules fúngiques en els cultius tractats amb PCI marcat, suggerint que aquesta proteïna no s'internalitza en la cèl·lula del fong. Tampoc es va detectar fluorescència a les espores de *M. grisea*, suggerint que la molècula diana pel PCI no està present en espores fúngiques. Per altra banda, cultius fúngics incubats només amb el fluorocrom Alexa-488 no mostraven fluorescència (resultats no mostrats). De la mateixa manera, no es va detectar fluorescència en cultius de *M. grisea* crescuts en presència de PCI no marcat i incubats amb el fluorocrom Alexa-488 lliure (resultats no mostrats). Aquests resultats suggereixen que PCI podria interaccionar amb alguna molècula diana situada, bé en la membrana plasmàtica o bé a la paret cel·lular de *M. grisea*.

L'observació de que la proteïna PCI marcada amb Alexa fos detectada en la perifèria de les cèl·lules del fong, ens va portar a investigar si la proteïna PCI té algun efecte sobre la integritat de la membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules. En aquest sentit, s'ha descrit que algunes proteïnes i pèptids antifúngics presenten una capacitat de permeabilització de membranes de les seves cèl·lules diana a través de la formació de porus en aquestes (Theis i Stahl, 2004; Zasloff, 2002). Per aquest motiu, es va estudiar si la proteïna PCI mostrava capacitat de permeabilització de membranes de la proteïna PCI mitjançant l'assaig amb el colorant "verd SYTOX" (SYTOX green). El "verd SYTOX" presenta una elevada afinitat per les cadenes d'àcids nucleics, als quals s'uneix donant fluorescència verda. A més, aquest reactiu únicament entra en cèl·lules que tinguin la membrana plasmàtica compromesa (amb porus) i no en aquelles cèl·lules vives amb la membrana intacte. D'aquesta manera, es va créixer *M. grisea* en presència o absència de PCI a una concentració de 40 μ M durant 16h, i a continuació es va tenyir amb "verd SYTOX". No es va detectar permeabilització en aquelles cèl·lules fúngiques tractades amb PCI (**Figura 66B, panells a i b**). Com a control positiu, es va créixer *M. grisea* en presència d'etanol 70%, com agent permeabilitzador, i seguidament es va tenyir amb el "verd SYTOX". Així, el fluorocrom entra en les cèl·lules fúngiques a través de la membrana plasmàtica tractada amb etanol (compromesa) i tenyeix els àcids nucleics (**Figura 66B, panell c**). Finalment, es van realitzar experiments de localització del PCI marcat amb Alexa en cèl·lules fúngiques amb la membrana compromesa (tractada amb etanol 70%). En aquests experiments, la proteïna PCI es va marcar amb el fluorocrom vermell Alexa-568. Els resultats es mostren a la **Figura 66B, panell d**. De la mateixa manera que es va veure en els cultius de *M. grisea* crescuts en presència de PCI marcat amb Alexa-488 (verd) (**Figura 66a**), el PCI marcat amb Alexa-568 (vermell) s'acumula a la perifèria de les cèl·lules del fong. Quan aquests cultius eren tractats amb etanol 70%, s'observa fluorescència a l'interior de les cèl·lules degut al "verd SYTOX"

RESULTATS

complexat amb àcids nucleics (**Figura 66B, panell d**). En cap cas, s'observà localització intracel·lular de la proteïna PCI marcada amb Alexa en cultius fúngics tractats amb PCI, ni tampoc en cultius tractats amb etanol 70%.

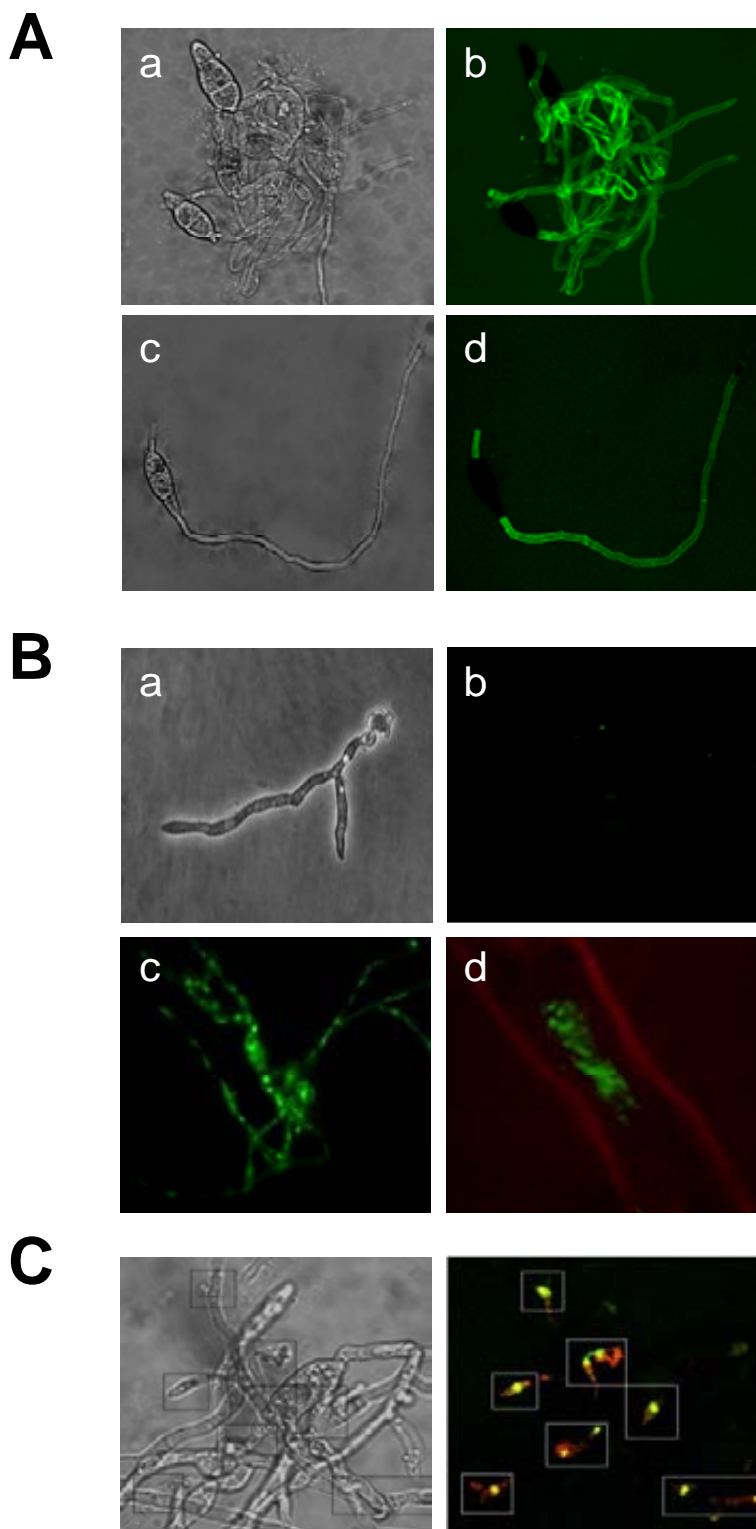


Figura 66. Localització de la proteïna PCI marcada amb Alexa en cèl·lules de *M.grisea*. A) Imatge de transmissió (a i c) i microscòpia confocal de fluorescència (b i d) de cultius de *M.grisea* crescuts 16h en presència de PCI marcat amb Alexa-488 a una concentració de 40 µM. El color verd de (b) i (d) indica la fluorescència del PCI marcat amb Alexa-488. B) Imatge de transmissió (a) i microscòpia confocal de fluorescència (b) de cultius de *M.grisea* crescuts en presència de 40 µM PCI i tenyits posteriorment amb “verd SYTOX”. Com a control, els cultius fúngics es van tractar amb etanol 70% per tal de permeabilitzar les membranes i posteriorment es van tenyir amb “verd SYTOX” (c). Cultius de *M.grisea* crescuts en presència de PCI marcat amb Alexa-568, tractats amb etanol 70% i tenyits posteriorment amb “verd SYTOX” (d). El color vermell de (d) indica la fluorescència del PCI marcat amb Alexa-568. El color verd de (c) i (d) indica el marcatge d'àcids nucleics amb el “verd SYTOX”. C) Efecte de AFP sobre *M.grisea* (imatge de transmissió en el panell esquerre i de microscòpia confocal en el panell dret). El fong es va créixer en presència de AFP 4 µM marcada amb Alexa-568 (vermell) i posteriorment incubada amb “verd SYTOX”. El color groc indica l'entrada de AFP en la cèl·lula del fong i localització nuclear de la mateixa (col·localització amb el “verd SYTOX”) (Moreno *et al.*, 2006)

En general, s'ha descrit que l'activitat antimicrobiana de moltes de les proteïnes i pèptids antimicrobians resideix en la seva capacitat per a formar porus de membrana, i com a conseqüència permeabilitzar-la (Theis i Stahl, 2004; Zasloff *et al.*, 2002). Aquest és el cas, per exemple, de la proteïna antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* (Moreno *et al.*, 2006). L'efecte de AFP sobre *M. grisea* queda il·lustrat en la **Figura 66C**. En aquests experiments, el fong *M. grisea* fou crescut en presència de la proteïna AFP marcada amb Alexa-568 (vermell) i els cultius van ser posteriorment incubats amb “verd SYTOX”. La proteïna AFP té la capacitat per permeabilitzar la membrana del fong i a més se sap que aquesta proteïna es dirigeix fins el nucli de la cèl·lula del fong on interacciona amb el DNA (col·localització, color groc) (Moreno *et al.*, 2006). En aquest cas però, els resultats obtinguts en els experiments fent servir proteïna PCI marcada amb fluorescència (Alexa-488 i Alexa-568) en combinació amb els assaigs amb “verd SYTOX” i la microscòpia confocal, ens han permès concloure que la inhibició del creixement fúngic que produeix el PCI no està relacionada amb una permeabilització de les membranes de les cèl·lules del fong. A més, el PCI no entra en les cèl·lules del fong, ni tan sols en aquelles condicions en que les cèl·lules fúngiques tenen les membranes compromeses.

I. B. 5 Resistència a la infecció fúngica de les plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen pci

Un cop determinada l'activitat antifúngica *in vitro* del PCI, front a *M. grisea*, es va voler determinar la rellevància funcional de l'expressió de PCI en arròs, en relació amb la resistència de les línies transgèniques a la infecció per *M. grisea*. En primer terme, es va determinar el grau de resistència en experiments de fulla tallada. Per fer-ho, les fulles s'inocularen localment amb suspensions d'espores de *M. grisea* preparades a diferents concentracions (20 µl d'inòcul a 10⁶, 10⁵ i 10⁴ espores/ml). Es van assajar cinc línies homozigotes *pci* (T2) independents (línies 2.13, 7-34, 9-1, 10-20 i 10-27) així com plantes Ariete control. Els resultats obtinguts fent servir un inòcul de 10⁵ espores/ml es presenten a la **Figura 67A**. S'observen diferències clares en el grau de simptomatologia provocada per la infecció comparant les línies *pci* amb les plantes de la varietat Ariete control. A la concentració de 10⁵ espores/ml les lesions a les fulles de les plantes Ariete control apareixen després de 2-3 dies post- inoculació (dpi), mentre que, sota les mateixes condicions experimentals, no hi ha símptomes visibles de la malaltia fúngica en les fulles de les línies *pci*. Passats 6 dies des de la inoculació, les fulles de les plantes control es mostraren visiblement danyades, mentre que les fulles de les plantes *pci* es mostraven sanes. També s'analitzaren per microscòpia fulles d'arròs infectades amb *M.grisea* i tenyides amb

RESULTATS

colorant “blau trypan”. Tal i com es mostra a la **Figura 67B**, el teixit foliar de les plantes Ariete control (no transformades) es mostra àmpliament colonitzat pel miceli, amb una esporulació molt important del fong sobre el teixit infectat. Sota les mateixes condicions experimentals, s’observa un baix creixement de les hifes en les fulles de plantes que expressen el *pci* (línies 7-34 i 9-1). També es realitzaren experiments d’infecció amb plantes transformades amb el vector pCAMBIA1300 (emprat en la producció de les línies *ubi::pci::nos*) obtenint-se resultats pràcticament idèntics al de les plantes Ariete control no transformades (resultats no mostrats).

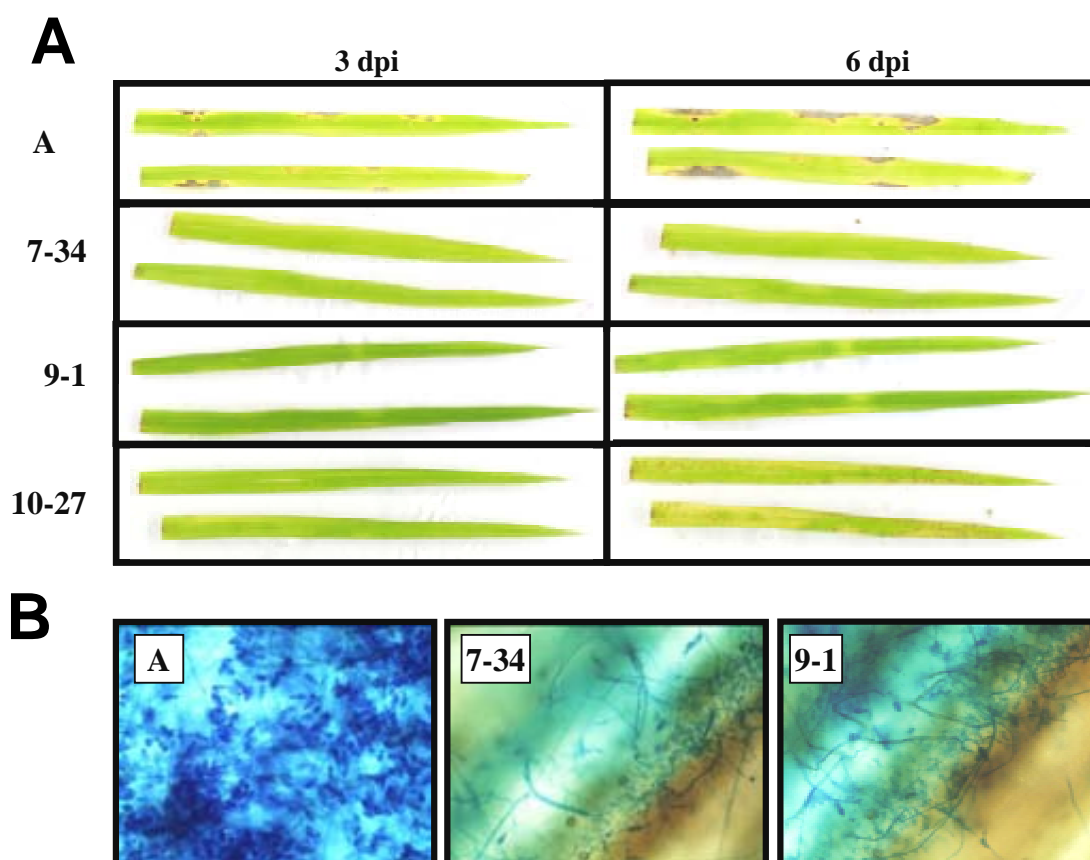


Figura 67. Experimentos de fulla tallada per determinar la resistència de plantes transgèniques d’arròs que expressen el gen *pci*. A) Fulles de plantes control Ariete no transformades (A) i línies d’arròs *pci* (generació T2, línies 7-34, 9-1 i 10-27) es van inocular localment amb espores de *M.grisea* (20 µl 10⁵ espores/ml). Es mostren els símptomes passats 3 i 6 dies després de la inoculació, en 1 dels 3 experiments realitzats amb resultats similars. B) Tinció representativa amb “blau de trypan” de fulles inoculades amb suspensions d’espores de *M.grisea* (10⁶ espores/ml). La tinció es va realitzar passats 9 dies de la inoculació amb el fong. S’observen resultats similars en la línia 10-27.

Es va quantificar també la capacitat de les línies *pci* per bloquejar el creixement *in planta* de *M. grisea*, mitjançant el comptatge d'espores produïdes en fulles infectades de plantes Ariete control així com en les diferents línies transgèniques. Passats 8 dies de la inoculació, la mitja d'espores recollides en fulles infectades de plantes Ariete control van ser 11.250 ± 1.050 espores/ml (**Figura 68**). La mitja d'espores recollides en fulles infectades de plantes transformades *pci* van ser: 3.750 ± 200 espores/ml, 2.750 ± 250 espores/ml i 4.500 ± 350 espores/ml per les línies 7.34, 9.1 i 10.27, respectivament.

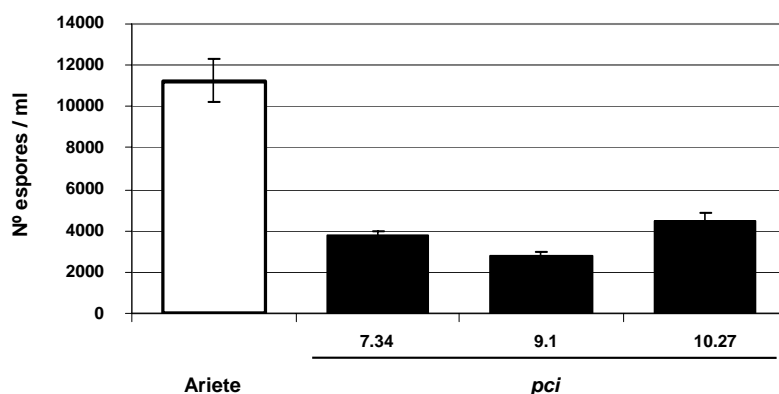


Figura 68. Comptatge d'espores de *M. grisea* en les plantes d'arròs *pci*. Els valors donats són la mitja i l'error estàndard per tres comptatges independents para cada fulla infectada (3 inoculacions per fulla) i tres fulles per cada línia transgènica).

En conjunt, els resultats obtinguts en els assaigs de fulla tallada indicaren que les línies d'arròs que expressen de manera constitutiva el gen *pci* presenten resistència a la infecció per *M. grisea* en diferents nivells. Entre les 5 línies testades, les 7.34, 9.1 i 10.27, foren les que presentaren millor protecció en els diferents assaigs realitzats.

Per tal de verificar els resultats obtinguts en l'experiment de fulla tallada, es van realitzar experiments d'inoculació per espraiat d'espores sobre plantes mantingudes en terra. Per això, es creixeren les línies *pci* i la varietat Ariete control, i es van espraïar amb suspensions d'espores de *M. grisea* (10^4 espores/ml). Després de 3-4 setmanes de la inoculació es van observar ja símptomes de la infecció en les plantes control Ariete però no en les línies transgèniques (resultats no mostrats). De fet, les diferències visuals en l'aspecte entre les plantes control i les línies *pci* eren dràstiques passats 42 dies des de la inoculació amb espores de *M. grisea*. En aquest temps, la major part de les plantes Ariete control havien sofert greument l'atac del fong fitopatogen, i les poques supervivents presentaven un retard en el seu creixement i símptomes molt marcat d'infecció (**Figura 69**). Les línies *pci* en canvi es mantingueren, en general, sanes en els diferents experiments d'infecció. Els resultats d'aquest experiment van confirmar que les plantes transgèniques que expressen el gen *pci* presenten una major resistència a la infecció per *M. grisea*.

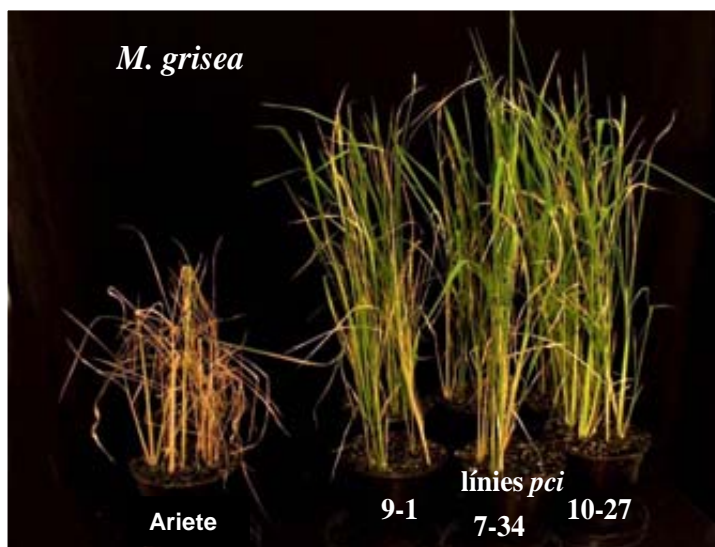


Figura 69. Resistència de les plantes d'arròs *pci* front el fong patògen *M. grisea*. Fenotip de línies d'arròs que expressen *pci* (generació T2) i plantes Ariete control (no transformat), tractades amb *M.grisea*. Les plantes en estat de 3 fulles van ser espraïades amb una suspensió d'espores (10^4 espores/ml). Fotografies realitzades després de 42 dies de la inoculació amb espores.

Un cop obtinguts resultats favorables en la protecció a *M. grisea*, va resultar també interessant analitzar la resistència de línies d'arròs *pci* front el fong *F. verticillioides*, patògen del sòl que afecta a les llavors. Per fer-ho, es van inocular llavors de plantes Ariete control i de línies transgèniques amb suspensions d'espores del fong (10^7 espores/ml) o bé amb aigua estèril, i es van deixar germinar. Els resultats es mostren a la **Figura 70**. El patògen es va mostrar molt virulent i cap, o pràcticament cap, de les llavors de les plantes Ariete control van aconseguir germinar. En canvi, les llavors de les línies *pci* van ser capaces de germinar en presència de *F. verticilloides*. El percentatge de germinació de les diferents línies *pci* fou del 80% (línia 7.34), 65% (línia 2.13) i 60% (línia 9.1).

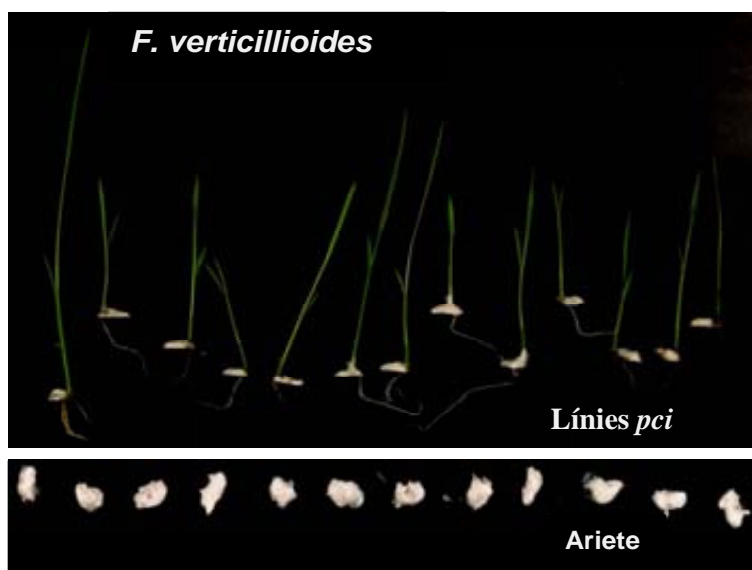


Figura 70. Resistència de les plantes d'arròs *pci* front el fong patògen *F. verticillioides*. Protecció vers l'atac amb *F.verticillioides* de línies transgèniques que expressen *pci*. Llavors de plantes transgèniques i Ariete control, van ser inoculades amb 20 µl d'espores del fong (10^7 espores/ml), i es van deixar germinar durant 9 dies més. Es presenten els resultats obtinguts amb la línia 9.1.

Així doncs, els resultats dels assaigs de resistència vers fongs mostraren que l'expressió constitutiva de *pci* en arròs confereix protecció front ambdós fongs fitopatògens *M. grisea* i *F. verticillioides*.

En alguns estudis, s'ha descrit que l'expressió constitutiva d'alguns transgens pot activar els mecanismes de defensa, els quals normalment són activats durant la patogènesi (Mittler *et al.*, 1995). En aquest sentit, l'expressió de gens de tipus *PRI* ha estat àmpliament emprat com a marcador de la inducció de les respostes de defensa endògen en la planta. Així, per tal d'explorar la possible activació del sistema de defensa de les plantes transgèniques *pci*, es van examinar els nivells d'expressió del gen *PR1b* en aquestes línies. Per fer-ho, es sembraren 12 plantes de cada línia *pci*, així com de la varietat Ariete control. Un cop crescudes als hivernacles durant 15 dies, s'analitzà per RT-PCR els nivells de transcrits del gen *PR1b*. Tal i com es mostra a la **Figura 71**, no es detectà expressió del gen *PR1b* en cap de les línies *pci* analitzades, ni en les plantes Ariete no transformades. Com a control positiu, s'utilitzaren plantes Ariete control crescudes en les mateixes condicions però infectades durant 48h amb espores de *M. grisea* (**Figura 71, Ariete (+)**)

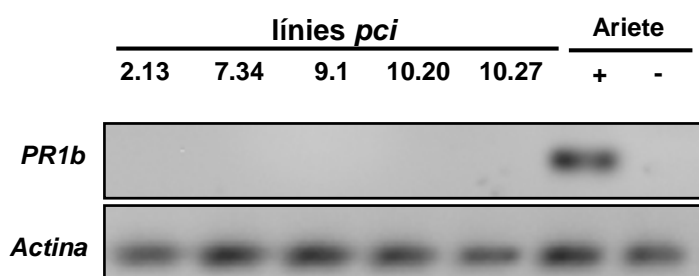


Figura 71. Expressió del gen *PR1b* en plantes transgèniques d'arròs *pci*. Anàlisi RT-PCR de l'expressió del gen *PR1b* d'arròs en les línies *pci*, així com en plantes Ariete control no transformades. Es mostren els resultats obtinguts amb RNAs que provenen de fulles d'Ariete infectades (+) o no infectades (-) amb *M. grisea*. La infecció es va dur a terme en assaig de fulla tallada emprant 10⁶ espores/ml con inòcul i recuperant el material a les 48h. Com a control es determinà, l'expressió del gen d'actina d'arròs en les mateixes mostres de RNA (panell inferior).

A partir d'aquests resultats es pot concloure que l'expressió del gen *pci* en plantes d'arròs no indueix l'expressió del gen *PR1b*, un dels principals marcadors de l'activació del sistema de defensa en plantes. Aquest fet indica que la resistència observada front el patògen *M. grisea* per part de les línies d'arròs transformades amb el gen *pci*, molt probablement no està determinada per una activació basal del sistema de defensa de les plantes d'arròs.

I.B.6 Purificació i caracterització d'una carboxipeptidasa de *M. grisea* subceptible a inhibició per PCI

Es va determinar si l'activitat antifúngica PCI podia estar associada a la seva activitat inhibidora d'alguna carboxipeptidasa de *M. grisea*. Per fer-ho, extractes proteics del miceli de *M. grisea* es van sotmetre a una cromatografia d'afinitat fent servir PCI immobilitzat a una matriu de sefarosa (columna d'afinitat cedida pel grup del Dr. FX Avilés, UAB). Les fraccions recollides de la cromatografia es van assajar per SDS-PAGE, seguida per seqüenciació per espectrometria de masses (**Figura 72**). Una única proteïna de 29 kDa va ser eluïda a pH 9.0 (**Figura 72, carril pH 9,0 i Figura 73**). L'anàlisi per espectrometria de masses va mostrar que aquesta proteïna de 29 kDa era una cadena curta d'una deshidrogenasa identificada en el genoma de *M. grisea* (N^o ac.: MG10909.4). La fracció proteica eluïda de la columna d'afinitat-PCI amb el tampó a pH 11.0 contenia dues proteïnes amb un pes molecular aproximat de 53 kDa (**Figura 68, carril pH 11,0 i Figura 73**).

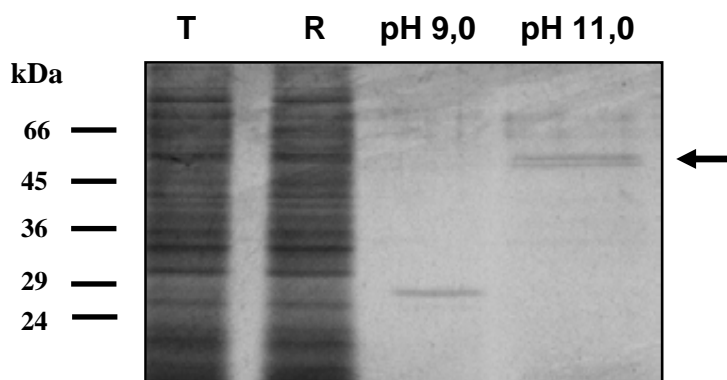


Figura 72. Purificació d'una carboxipeptidasa de *M. grisea* mitjançant cromatografia d'afinitat amb PCI-immobilitzat. SDS-PAGE (12,5%) de les diferents fraccions de la cromatografia d'afinitat. A la Figura 73 es mostren les diferents fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat. Carril T, extractes proteics total del miceli, Carril R, fracció no retinguda a la columna de cromatografia d'afinitat. La carboxipeptidasa fúngica (eluïda emprant el tampó a pH 11,0) s'indica amb una fletxa.

Les proteïnes eluïdes a pH 11,0 van ser recollides i posteriorment analitzades amb MALDI-TOF/TOF-MS. En comparar amb les bases de dades de seqüències proteïques, es va determinar que les masses de 11 pèptids tríptics corresponien perfectament amb fragments interns de la seqüència aminoacídica deduïda per un gen que codifica una metal·locarboxipeptidasa (MgCP) del genoma de *M. grisea* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Núm. Acc.: XP359930) (Dean *et al.*, 2005) (**Taula XI**).

Taula XI. Pèptids identificats per l'anàlisi d'espectrometria de masses de les fraccions eluïdes a pH 11,0 de Figura 72). Tots els pèptids tríptics es corresponen amb pèptids d'una metal·locarboxipeptidasa codificada per un gen de *M. grisea* identificada en el genoma del fong (Núm. Acc.: XP359930).

	Massa ^a (Da)	Massa ^b (Da)	Pèptids
1	1225.48	1225.63	R.GLGTQPVGTDPGK.L
2	2135.11	2135.19	R.GLGTQPVGTDPGKLLSVVEIR.S
3	927.52	927.57	K.LLSVVEIR.S
4	1049.45	1049.55	R.TIFGGAVGGSGK.N
5	1102.51	1102.56	R.AFFNGAIHAR.E
6	1071.49	1071.52	K.HNQGIAYGGR.T
7	1343.64	1343.65	R.NFDLWDFLK.K
8	1243.57	1243.58	R.GLMPDKPEEGR.V
9	1488.58	1488.65	R.VYGEYISSDDWR.D
10	2618.08	2618.18	R.IYDVSASAYLYPTSGASDDYAFSR.H
11	1043.41	1043.50	R.HFSDPSLNK.V

^a Massa experimental dels fragments

^b Valor teòric correlacionat amb el valor experimental de massa

Tots els pèptids mostraven valors de massa que coincidien amb els valors teòrics esperats pels fragments tríptics esperats d'aquesta proteïna. La seqüència aminoacídica completa deduïda del gen d'aquesta carboxipeptidasa de *M. grisea* es mostra a la **Figura 74** (es mostra la seqüència de la forma precursora d'aquest enzim). Cal afegir també, que el genoma de *M. grisea* conté fins a 9 gens que codifiquen hipotètiques metal·locarboxipeptidases (veure més endavant). Tots els pèptids identificats per espectrometria de masses en aquest estudi, estaven presents només en la seqüència aminoacídica deduïda per l'anteriorment citat gen de *M. grisea* (Núm. Acc.: XP359930). En base a aquest resultat, la identificació de la proteïna purificada per afinitat com a metal·locarboxipeptidasa de *M. grisea*, pot ser considerada amb alt grau de confiança.

L'estructura i especificitat de les carboxipeptidases digestives de mamífers i insectes ha estat àmpliament estudiada (Bayés *et al.*, 2005; Bown i Gatehouse, 2004; Vendrell *et al.*, 2000; Christianson i Lipscomb, 1999). Es coneix que les carboxipeptidases es sintetitzen com a molècules precursors o zimògens (anomenades procarboxipeptidases), presentant un prodomini N-terminal (prosegment o segment d'activació) i el domini catalític. La comparació de la seqüència aminoacídica deduïda del gen de la procarboxipeptidasa de *M. grisea*, amb la procarboxipeptidasaA bobina (PCPA_{bob}), que és una de les metal·locarboxipeptidases A més estudiades (Christianson *et al.*, 1989), es mostra a la **Figura 74**. Les regions N-terminal corresponents a la proregió, o segment d'activació, d'ambdues carboxipeptidases mostren una marcada diferència, tant en longitud com en seqüència d'aminoàcids (la fletxa sobre el residu

RESULTATS

Ala de la **Figura 74**, indica el N-terminal de la carboxipeptidasa A bovina madura, CPA bov). En conjunt, la identitat aminoacídica de la carboxipeptidasa de *M. grisea* en relació amb la CPAbov és només del 37% (pel domini catalític de la CPA). Aquest alineament entre la CPAbov i la carboxipeptidasa de *M. grisea* mostra però, la presència d'una sèrie de residus altament conservats, els quals han estat descrits com a residus claus per aquest tipus d'enzims. Així, la seqüència de la carboxipeptidasa de *M. grisea* conté els residus **His⁶⁹**, **Glu⁷²**, i **His¹⁹⁶** (numerats a partir de la CPAbov madura, residus marcats amb ▼ en la **Figura 74**), que es troben altament conservats en llocs catalítics d'unió a Zinc de carboxipeptidases (Christianson *et al.*, 1989). Els residus dels llocs actius (Arg¹²⁷ i Glu²⁷⁰, numerats per la CPAbov, residus marcats amb ∇ en la **Figura 74**) i els aminoàcids d'unió a substrat (**Arg⁷¹**, **Asn¹⁴⁴**, **Arg¹⁴⁵**, **Tyr¹⁹⁸** i **Asp²⁵⁶**, numerats a partir de la CPAbov, residus marcats amb ● en la **Figura 74**) de les carboxipeptidases, estan presents també en la seqüència aminoacídica deduïda de la carboxipeptidasa de *M. grisea*.

Les metal·locarboxipeptidases digestives han estat en general classificades en base a la seva especificitat de substrat. Les carboxipeptidases A tenen una especificitat preferent per aminoàcids o residus hidrofòbics, alifàtics i aromàtics, mentre que les carboxipeptidases B són en general altament específiques vers els residus bàsics de l'extrem C-terminal. L'aminoàcid de l'extrem C-terminal a hidrolitzar en el substrat entra una estructura amb forma de "butxaca", formada en l'enzim, de manera que el residu localitzat en el fons d'aquesta butxaca (residu 255, segons la numeració de la carboxipeptidasa A) defineix l'especificitat de la carboxipeptidasa (Titani *et al.*, 1975). En aquest sentit, la cadena lateral d'aquest residu 255 interacciona amb la cadena lateral de l'aminoàcid del C-terminal del seu substrat. En les carboxipeptidases B, el residu localitzat a la posició 255 és un residu àcid (Asp) per interactuar amb residu bàsic (Lys, Arg) del substrat, mentre que en carboxipeptidases, com la A1 i A2, el residu 255 és isoleucina, per formar interaccions hidrofòbiques amb cadenes laterals neutres. Donat que la carboxipeptidasa identificada en aquest treball té un àcid aspàrtic a la posició 255, es podria predir a partir de l'anàlisi de la seva seqüència aminoacídica que aquesta carboxipeptidasa fúngica podria ser una carboxipeptidasa del tipus B

Per tal de determinar si la proteïna purificada de *M. grisea* era una CPB, es va assajar l'activitat de les proteïnes eluïdes en les diferents fraccions en la cromatografia d'afinitat. Mitjançant l'ús de substrats específics per CPB. Tal i com es mostra a la **Figura 73 (barres grises)** les fraccions proteiques eluïdes a pH 11,0 de la columna d'afinitat- PCI, hidrolitzaven el substrat típic per activitats del tipus CPB, **Hippuryl-Arg** (HA). Es van obtenir els mateixos resultats utilitzant el substrat de CPB **N-furilacriloïl-L-alanil-L-lisina** (FAAK). L'activitat CPB

detectada en les fraccions eluïdes a pH 11,0 era completament inhibida quan es feia una pre-incubació amb PCI prèvia a l'assaig d'activitat CPB (**Figura 73, barres ratllades**). Finalment, es va determinar si el PCI inhibia eficaçment l'activitat CPB present en extractes proteics totals de miceli. Per fer-ho, es van utilitzar 2,5 μM de PCI observant-se una reducció pràcticament total de l'activitat CPB de *M. grisea* (l'activitat residual dels extractes del miceli pre-incubat amb PCI fou del 1,9% de l'activitat CPB present en l'extracte del miceli).

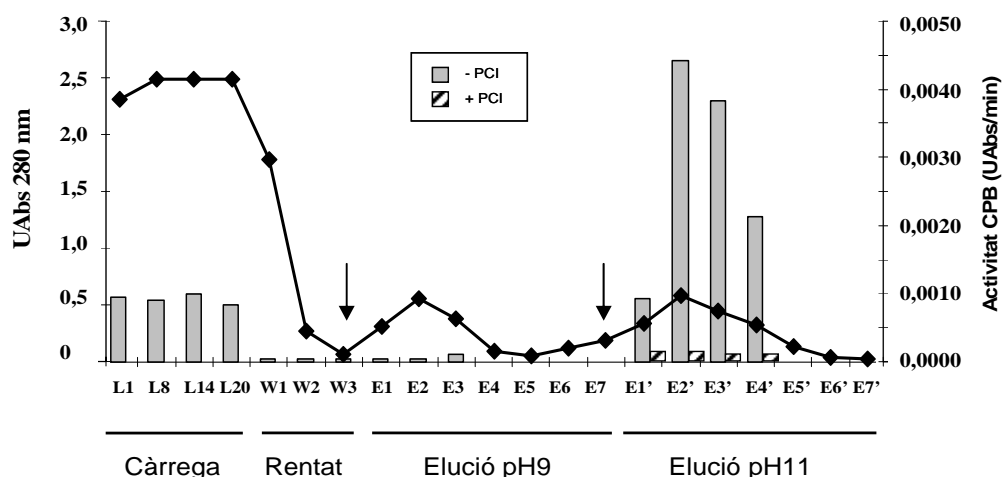


Figura 73. Cromatografia d'afinitat d'extractes de miceli de *M. grisea* amb PCI immobilitzat. Les fraccions van ser analitzades per l'activitat carboxipeptidasa B fent servir *Hippuryl-Arg* com a substrat, en presència o absència de PCI (a una concentració final de 200 nM) (barres grises i de ratlles, respectivament). S'han obtingut resultats similars fent servir el substrat FAAK per carboxipeptidasa B .

Els resultats obtinguts mitjançant cromatografia d'afinitat, demostren que PCI té una alta afinitat per la CPB de *M. grisea* identificada en aquest estudi, i a més a més n'inhibeix completament la seva activitat. La CPB de *M. grisea* trobada en aquest treball ha estat anomenada **MgCPB**.

Es va voler estudiar també, si existien seqüències homòlogues a la proteïna MgCPB en altres fongs. Amb aquest propòsit, i a partir de la seqüència aminoacídica de MgCPB, es va realitzar una cerca en les bases de dades (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), i es trobà un alt grau d'identitat de la carboxipeptidasa de *M. grisea* amb d'altres metalocarboxipeptidases identificades en els genomes d'altres fongs fitopatògens. Així, la MgCPB mostra una gran identitat de seqüència

RESULTATS

amb una metal·locarboxipeptidasa de *Phaeosphaeria nodorum* (anamorf *Stagonospora nodorum*), un important patògen del blat (Núm. Acc.: EAT91098), amb un 50% d'identitat (63% de similitud). També es va trobar una forta identitat amb una metal·locarboxipeptidasa de *Gibberella zeae* (anamorf *Fusarium graminearum*), un fong fitopatògen que infecta diferents cultius de plantes, incloent molts cereals (Núm. Acc.: XP388042), en aquest cas amb un 40% d'identitat (56% similitud). En tots els casos, el pro-pèptid N-terminal no es va tenir en compte per la comparació de seqüències.

És interessant destacar també, que la MgCPB mostrà un important grau d'identitat en la seva seqüència aminoacídica amb carboxipeptidases d'insectes lepidòpters com són *Helicoverpa armigera* i *H. zea*. De la mateixa manera que les carboxipeptidases de mamífers, les carboxipeptidases d'insectes són membres de la família M14 de metal·locarboxipeptidases (MEROPS). El grau d'identitat de la MgCPB amb la CPB de *H. zea* (HzCPB, Núm. Acc.: CAJ30028) i la CPA de *H. armigera* (HaCPA, Núm. Acc.: CAA06418) és del 48% i 42%, respectivament (sense considerar el segment d'activació N-terminal). A la **Figura 74** es mostra l'alineament de les seqüències aminoacídiques de la CPB de *M. grisea*, i les HzCPB i la HaPCPA, juntament amb la anteriorment citada CPA_{bov}, revelant que els residus aminoacídics característics de carboxipeptidases estan altament conservats en totes elles. Per altra part, es va realitzar una predicció de l'estructura secundària de la seqüència aminoacídica deduïda de la MgCPB. Per fer-ho, s'empraren diferents servidors de predicció, enviant-se la seqüència a FUGUE, GenTHREADER i J-PRED. Amb els resultats o prediccions obtingudes es generà un consens per a l'estructura secundària de la MgCPB (**Figura 74; barres: hèlix- α ; fletxes: làmines β**). S'observà una compatibilitat significativa de les estructures secundàries predites per MgCPB respecte a altres carboxipeptidases pel que fa al domini catalític de la carboxipeptidasa. Els millors resultats correspongueren a la procarboxipeptidasa A2 humana (HPCPA2), la procarboxipeptidasa A de *H. armigera* (HaPCPA) i la carboxipeptidasa B de *H. zea* (HzCPB), amb els codis del Protein Data Bank (PDB) 1AYE, 1JQGA i 2C1C, respectivament. La proteïna MgCPB presenta una alta similitud en els diferents elements que formen l'estructura secundària del domini catalític, amb vuit hèlix- α (α_4 - α_{11}) combinades amb vuit làmines- β (β_5 - β_{12}). L'estructura secundària es troba conservada inclòs en aquelles regions en les que la seqüència d'aminoàcids difereix entre les proteïnes (**Figura 74**).

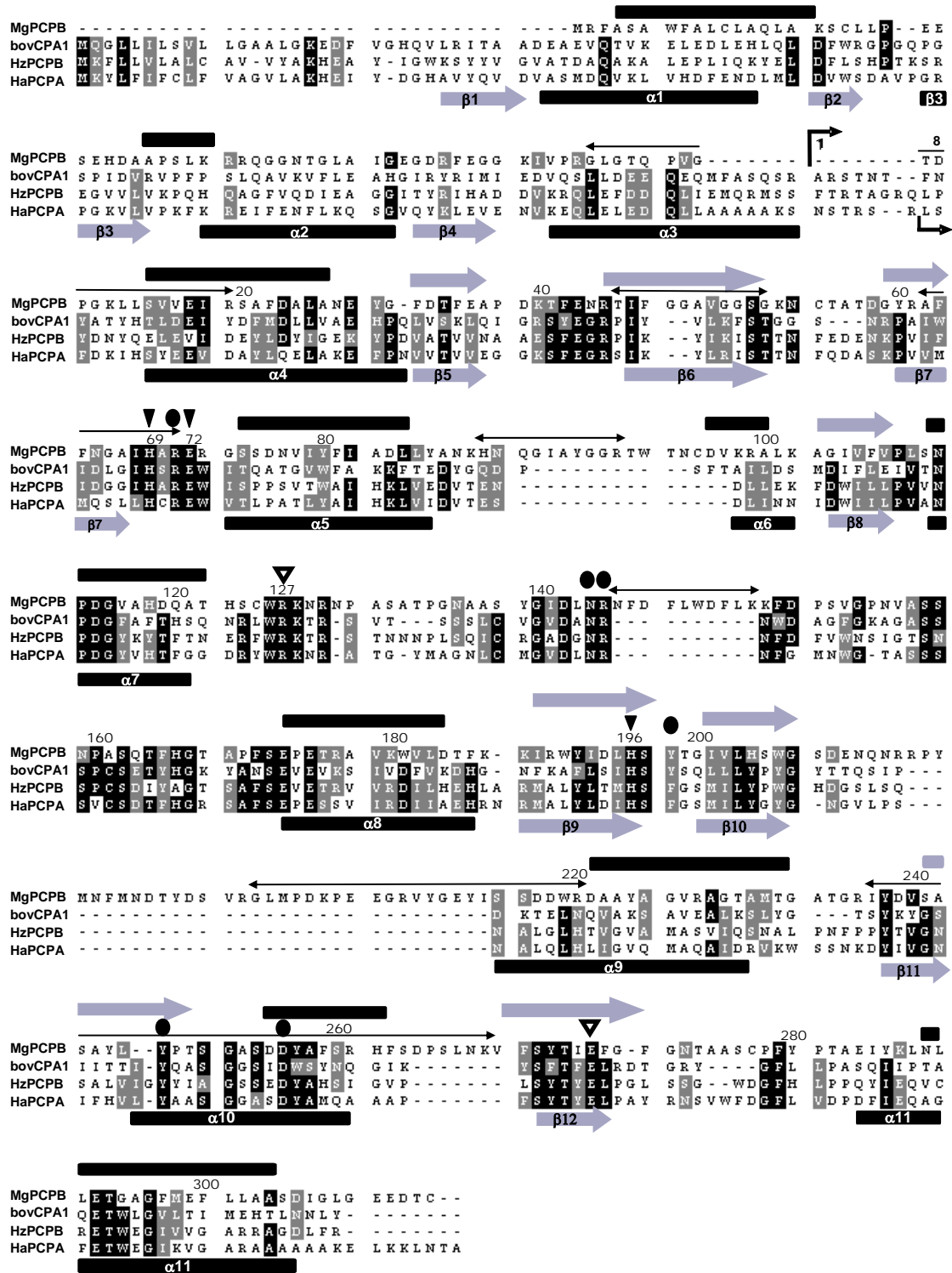


Figura 74. Alineament de les seqüències d'aminoàcids i comparació d'estructura secundària de la procarboxipeptidasa B de *M. grisea* (MgPCPB) amb les procarboxipeptidasas bovina i d'insectes. Procarboxipeptidasa A bovina (PCPA1) (Christianson *et al.*, 1989), Carboxipeptidasa B de *Helicoverpa zea* (HzCPB) (Núm. Acc.: CAJ30028) i Procarboxipeptidasa A de *H. armigera* (HaPCPA) (Núm. Acc.: CAA06418). Les seqüències foren alineades utilitzant el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Els residus estan numerats d'acord a la CPA1 bovina madura. Les fletxes en angle recte indiquen l'extrem N-terminal de l'enzim madur de la CPA1 bovina (Ala 1) i CPA de *H. armigera* (Leu). Els residus aminoacídics idèntics o similars entre tres o més seqüències estan ombrejats en negre o gris

RESULTATS

respectivament. Els símbols mostren residus funcionals importants (▼, residu d'unió a zinc; ▽, residu de lloc actiu; ●, residu d'unió a substrat). Les regions en les que es prediu estructura β (β 1- β 12) i les regions alfa hèlix (α 1- α 11) s'indiquen en fletxes grises i cilindres negres, respectivament. Les regions de la procarboxipeptidasa B de *M. grisea* determinades per espectrometria de masses estan indicats amb fletxes de doble punta negres.

En aquest treball, s'ha realitzat un anàlisi filogenètic basat en les seqüències aminoacídiques deduïdes de gens de carboxipeptidases identificats en el genoma de fongs i insectes (**Figura 75**). Carboxipeptidases d'espècies de mamífers i amfibis, així com de *C. elegans*, s'han inclòs també en l'anàlisi. L'arbre filogenètic revela que les seqüències de carboxipeptidases fúngiques formen varis subgrups (grups I, II i III). Els diferents gens identificats en el genoma de *M. grisea* codificant putatives metal·locarboxipeptidases, es troben distribuïts per tots els grups de carboxipeptidases fúngiques (grups I, II i III). El gen de *M. grisea* (Núm. Acc.: XP363152) s'ha vist que està més allunyat que la resta de carboxipeptidases fúngiques. Aquest anàlisi filogenètic permet identificar una carboxipeptidasa de *M. grisea* (Núm. Acc.: XP367800) que està estretament relacionada amb la carboxipeptidasa MgCPB identificada en aquest treball (Núm. Acc.: XP359939) per la qual també es pot predir una activitat carboxipeptidasa de tipus B (Asp a la posició 255). D'entre els 9 gens que codifiquen carboxipeptidases identificats en el genoma de *M. grisea*, només aquests 2 (XP359930 i XP367800) contenen un residu carregat negativament a la posició 255. Cap dels pèptids tríptics identificats en l'anàlisi per espectrometria de masses de les fraccions eluïdes de la cromatografia d'afinitat es correspon amb cap fragment que provingui de la seqüència d'aminoàcids deduïda d'altres gens de carboxipeptidases de *M. grisea* a part del gen XP359930.

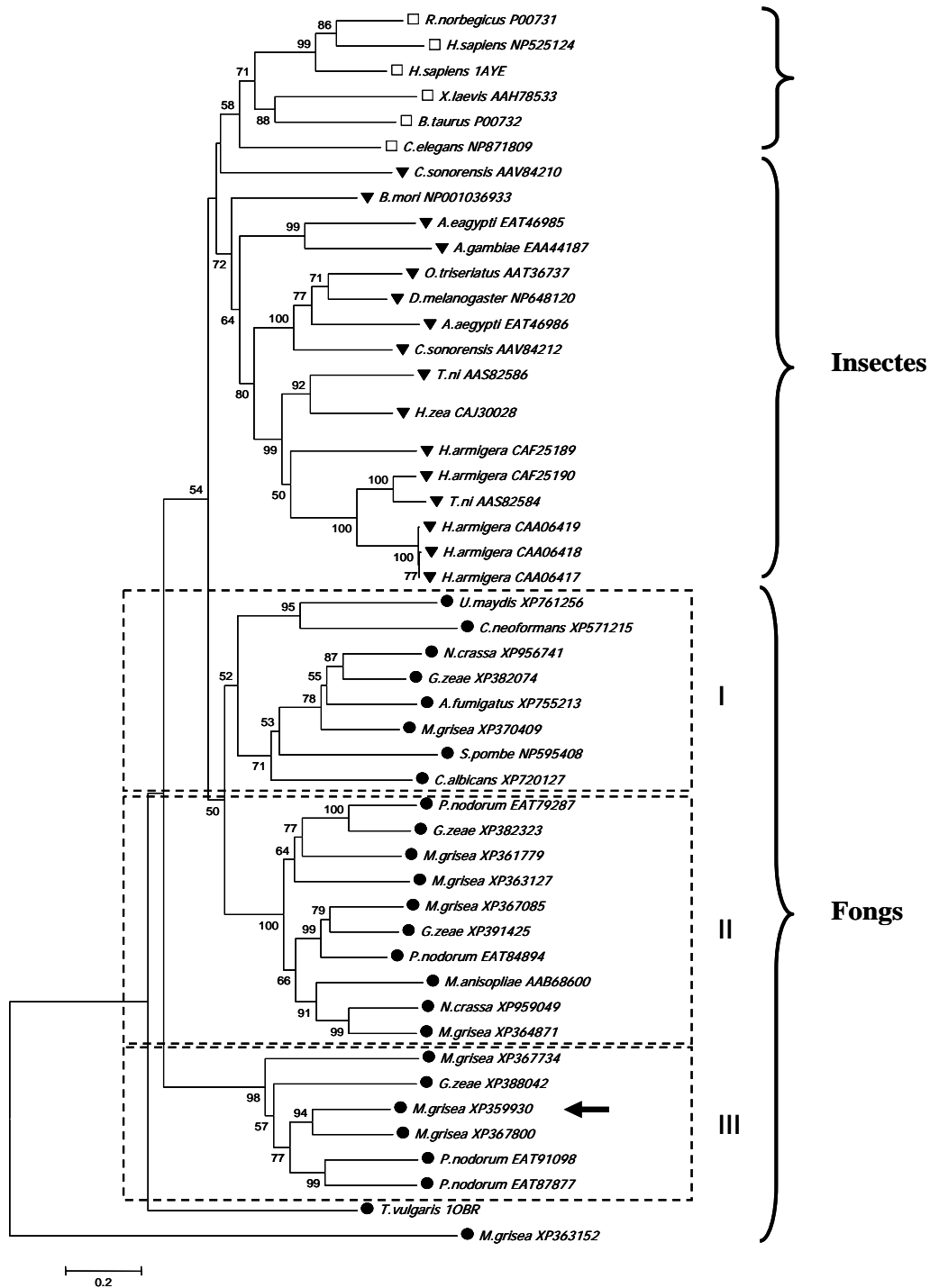


Figura 75. Arbre filogenètic de les seqüències de carboxipeptidases fúngiques i d'insectes. També s'inclouen proteïnes de les subfamílies A/B de carboxipeptidases de *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *X. laevis*, *B. taurus* i *C. elegans*. L'arbre filogenètic de tipus *Neighbour-joining* (Saitou i Nei, 1987), generat amb el software MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Es mostren els valors de bootstrap (per 1000 rèpliques) superiors al 50%. La fletxa indica el gen de *M. grisea* que codifica la carboxipeptidasa B (MgCPB) identificada en aquest treball

I. B. 6 Predicció de l'estructura tridimensional de la carboxipeptidasa B de M. grisea

Actualment, està disponible l'estructura tridimensional d'algunes procarboxipeptidases i carboxipeptidases d'insectes i mamífers (Rees, 1983; García-Saez, 1997; Estebanez-Perpiña *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2005). En aquest treball, s'ha realitzat una predicció de l'estructura tridimensional de la proteïna MgCPB. Per fer-ho, primerament es varen emprar dos servidors de predicció d'estructura de proteïnes, el 3D-PSSM i el PDB-BLAST, amb els paràmetres per defecte en ambdós casos. Conjuntament, els millors resultats o "scores" de compatibilitat observats foren amb la procarboxipeptidasa A2 humana (HPCPA2). D'aquesta manera, la HPCPA2 fou utilitzada com a motlle d'estructura per a la predicció estructural de la MgCPB. El model final de la MgCPB fou generat amb el programa MODELLER (Pieper *et al.*, 2004) amb un "score" de 0,98 (un valor superior al 0,7 indica una viabilitat del model del 95%). Un cop obtingut el model de la MgCPB, aquest fou avaluat i verificat amb el programa Very3D, confirmant l'alta probabilitat del model. A la **Figura 76A** es mostra el model d'estructura 3D finalment obtingut per la MgCPB. S'observa que el domini catalític clàssic de les carboxipeptidases es troba altament conservat, presentant el plegament típic dels membres d'aquesta família de proteases, amb una agrupació de vuit làmines- β envoltada per vuit hèlix- α , formant una proteïna globular α/β (Vendrell *et al.*, 2000). A la **Figura 76B** es mostra una representació de la MgCPB superposada amb la HPCPA2. A excepció del pro-segment N-terminal, el conjunt de l'estructura, principalment el domini catalític, es mostra altament conservat. Comparant amb el motlle de la HPCPA2 amb la MgCPB, per tal d'alinear ambdós estructures, han calgut diferents insercions i delecions localitzades en els girs o "loops" que connecten les diferents elements d'estructures secundàries.

L'estructura 3-D, basada en homologia obtinguda per la MgCPB, també mostra una alta similitud amb les estructures de la carboxipeptidasa B de l'insecte lepidòpter *Helicoverpa zea* (HzCPB, codi PDB: 1JQGA) i de la procarboxipeptidasa A de *H. armigera* (PCPA, codi PDB: 2C1c) dels insectes *H. zea* i, respectivament (**Figura 76C i D**). L'estructura que s'observa en els dominis catalítics de MgCPB i HzCPB (Bayés *et al.*, 2005) és pràcticament idèntica.

A partir d'aquests resultats és pot concloure que el PCI s'uneix i inhibeix una carboxipeptidasa B d'aproximadament 53 kDa de *M. grisea*. S'han pogut determinar similituds i diferències estructurals superposant l'estructura cristal·litzada de la HPCPA2 i el model d'estructura

tridimensional predita per la MgCPB. A més, la topologia de MgCPB indica que es conserva el plegament típic del domini catalític de les carboxipeptidases.

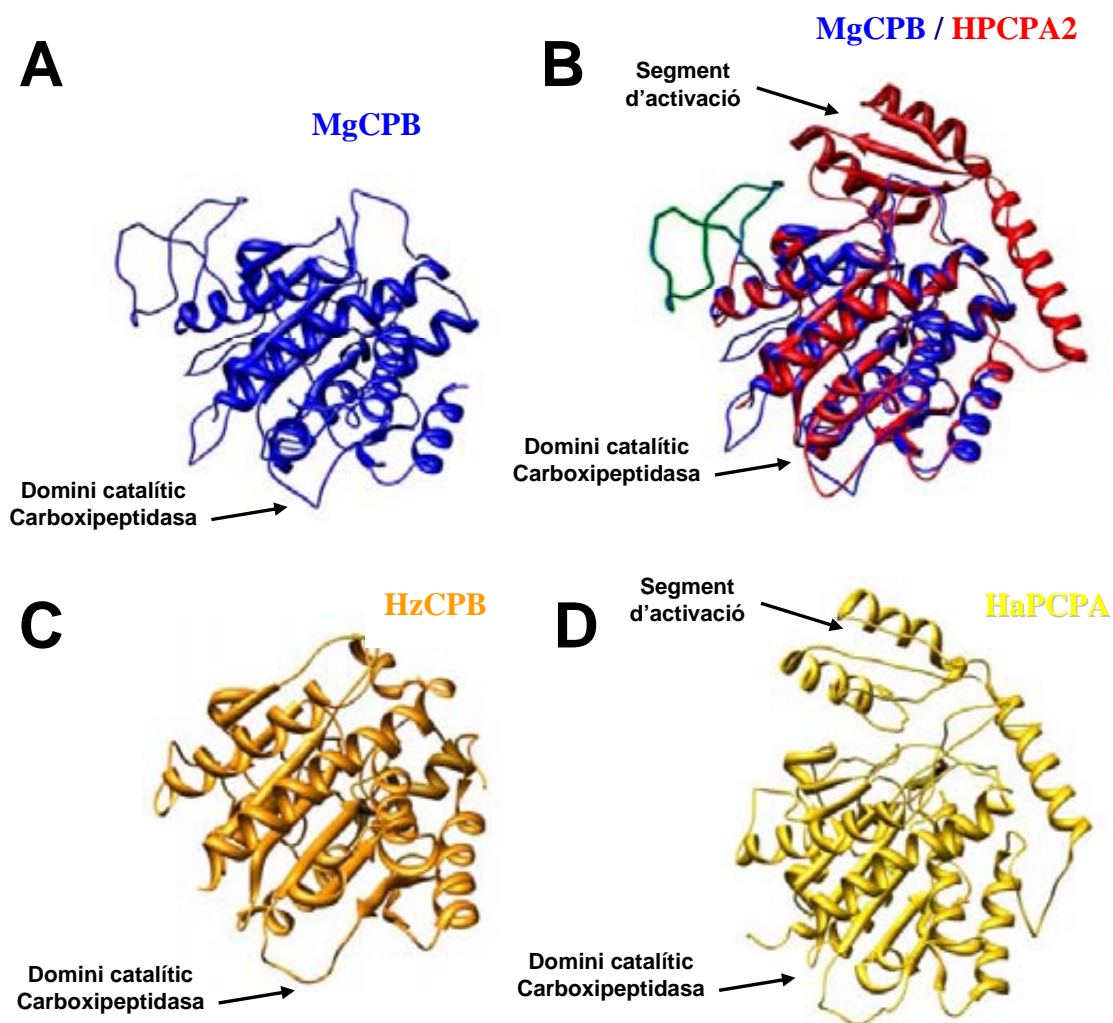


Figura 76. Modelatge molecular de la procarboxipeptidasa B de *M. grisea*. A) Representació esquemàtica de l'estructura predita per la MgCPB basada en modelatge per homologia. El model d'estructura tridimensional per MgCPB s'ha realitzat emprant la Procarboxipeptidasa A2 humana (Codi PDB: 1 AYE) com a model. B) Superposició de les estructures de MgCPB (blau) i HPCPA2 (vermell). Els residus aminoacídics que connecten la $\beta 10$ i l' $\alpha 9$, que es troben en la MgCPB i no en la carboxipeptidasa humana es mostra en verd (veure també Figura 70). C i D) Estructura tridimensional de la carboxipeptidasa B de *H. zea* (C) i de la procarboxipeptidasa A de *H. armigera* (D)

RESULTATS

Com a resum, els resultats obtinguts en aquest treball han mostrat que PCI mostra activitat antifúngica front els fitopatògens d'arròs *M. grisea* i *F. verticillioides*. L'activitat antifúngica de PCI front *M. grisea*, molt probablement, està associada a la capacitat del PCI per inhibir una carboxipeptidasa B del fong. Tenint en compte els resultats obtinguts en els experiments de localització de la proteïna PCI marcada amb Alexa, es pot pensar que el PCI podria inhibir una carboxipeptidasa localitzada a la perifèria de la cèl·lula fúngica (paret o membrana plasmàtica).

A més, s'ha obtingut un model de l'estructura terciària per la carboxipeptidasa B de *M. grisea* (MgCPB). El model predit mostra una elevada similitud amb l'estructura tridimensional determinada mitjançant cristal·lografia per altres carboxipeptidases d'insectes. Això explicaria el fet que el PCI pugui funcionar com a inhibidor de carboxipeptidases tant fúngiques com d'insectes.

II. EXPRESSIÓ DEL GEN *AtNPR1* D'ARABIDOPSIS EN PLANTES D'ARRÒS

A la natura, les plantes es troben exposades a una gran varietat d'organismes que poden esdevenir patògens. D'aquí ve l'interès que es té per l'obtenció de línies d'arròs que mostrin un ampli espectre de resistència. En aquesta direcció, l'objectiu plantejat a l'inici d'aquest treball va ser determinar si la utilització d'un gen regulador clau de la resposta de defensa d'*Arabidopsis thaliana*, el gen *AtNPR1*, com a transgen per la transformació d'arròs, és una estratègia vàlida per a la protecció de la planta d'arròs front a malalties.

II.1 OBTENCIÓ DE PLANTES TRANSGÈNIQUES *AtNPR1*

II. 1. 1 Preparació de construccions per a la transformació d'arròs

El grup de la Dra. Xinnian Dong (Duke University, EEUU) ens va cedir el cDNA del gen *AtNPR1* (2007 pb) (aïllat i caracteritzat en el seu laboratori) clonat en el vector **pKEx4tr**. A partir d'aquesta construcció, mitjançant diferents passos intermediaris, es clonà el gen *AtNPR1* sota control del promotor del gen de la ubiquitina de blat de moro (*ubi*) i el terminador *nos* en el vector pCAMBIA1300. Per dur-ho a terme, primerament es va amplificar mitjançant PCR el fragment codificant per a la *AtNPR1* de 1800 pb, amb els oligonucleòtids NPR1-5' i NPR1-3', afegint en ambdós casos una seqüència diana *BamHI* en cada extrem, per al seu posterior clonatge (**Figura 78A**). Per altra banda, al nostre laboratori es disposa del vector **pAHC17**, que conté el promotor *ubi* i el terminador *nos*, amb un lloc únic de clonatge *BamHI* entre ambdós (**Figura 78A**). A partir d'aquest plàsmid, es va obtenir també per PCR mitjançant els oligonucleòtids UBI-5' i NOS-3' (**Apartat 1.8.1, Material i Mètodes**), el fragment de DNA *ubi-nos* amb la diana *SacI* en ambdós extrems, i mantenint per tant el lloc de clonatge *BamHI* entre ambdues seqüències reguladores. Tant el fragment *BamHI-AtNPR1-BamHI* com el *SacI-ubi-nos-SacI*, van ser clonats independentment en el vector *pGEM-T* i posteriorment seqüenciats (**Figura 78B**). Seguidament es va procedir al subclonatge del gen *AtNPR1*, mitjançant restricció *BamHI* (no present en el lloc de clonatge del *pGEMT*), per tal de ser integrat entre les seqüències reguladores *ubi* i *nos*. Així, es va obtenir el cassette complet *ubi::AtNPR1::nos* en el vector *pGEMT* (**Figura 78C**).

Per digestió amb l'enzim de restricció *SacI*, es va obtenir el cassette sencer *ubi:: AtNPR1::nos*, que posteriorment va ser clonat en el vector de transformació *pCAMBIA1300* (**Figura 78D**).

RESULTATS

Es va seqüenciar l'insert completament, i un cop comprovada l'absència d'errors en la seva seqüència, el plàsmid fou utilitzat per la transformació mitjançant *Agrobacterium*.

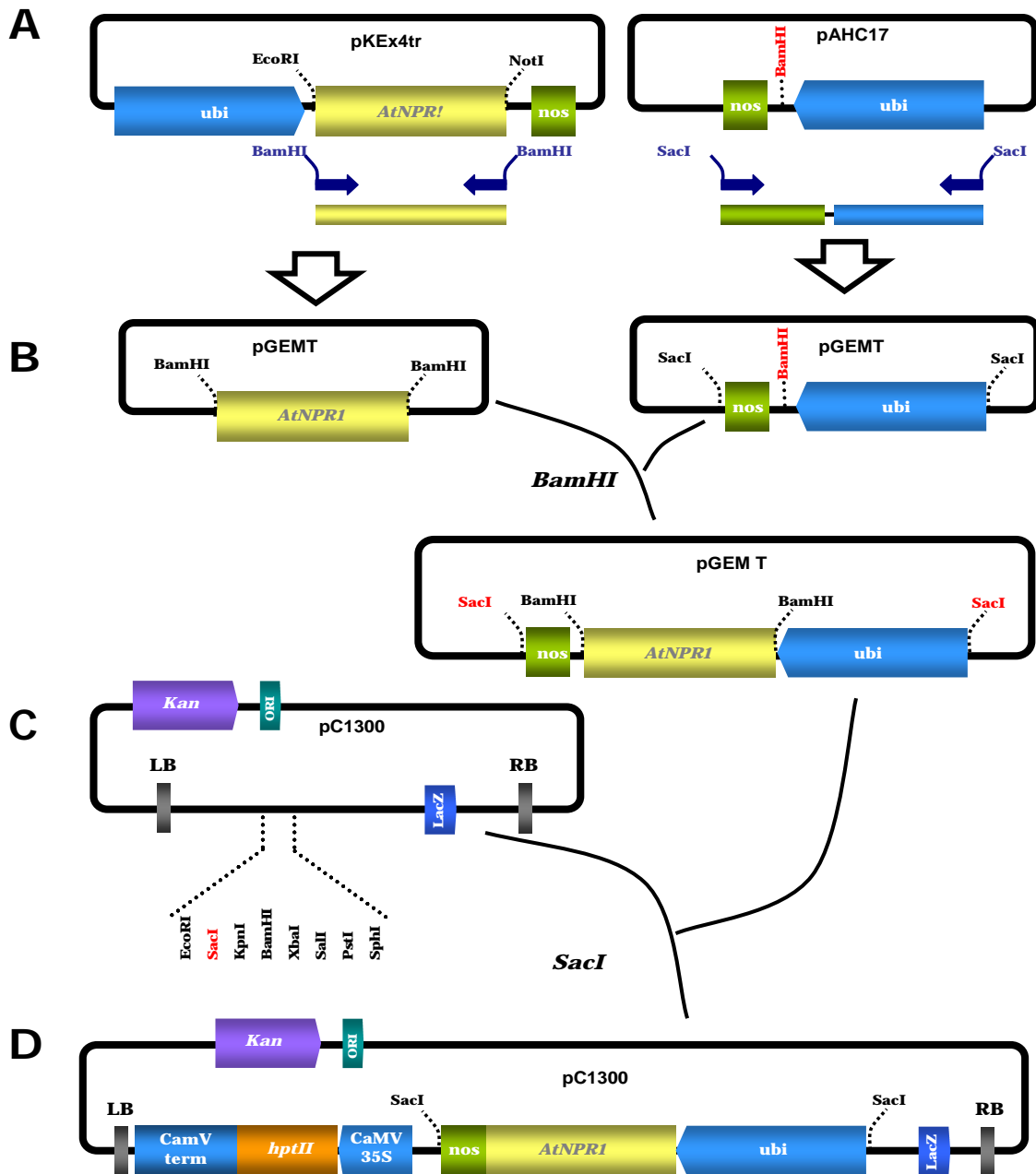


Figura 78. Etapes seguides per la preparació del vector per a la transformació d'arròs portador del gen *AtNPR1* sota el control del promotor del gen de la ubiquitina I de blat de moro (*ubi*) i el terminador *nos* (plàsmid pC1300 *ubi::AtNPR1::nos*). *Kan*, gen de resistència a kamamicina; *hptII*, gen de resistència a higromicina; CaMV 35S, promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor. RB, *right border*. LB, *left border*.

II.1.2 Transformació d'arròs

Es va transformar la varietat Sènia, mitjançant el mètode d'*Agrobacterium tumefaciens* (Soca EHA105) . Aquesta transformació va ser realitzada en el grup de la Dra. Joaquina Messeguer (IRTA, Cabrils). En aquest procés s'obtingueren 27 events de transformació, i un total de 52 plantes que foren transferides a hivernacle.

Per tal de comprovar la integració del gen *AtNPR1* en el genoma de les plantes transgèniques que presentaven resistència a higromicina, es va realitzar un primer anàlisi de les plantes (generació T0), mitjançant PCR amb DNA genòmic obtingut de cadascuna de les plantes . Així, es van analitzar fulles de plantes crescudes un mes als hivernacles després de la transformació. Els oligonucleòtids utilitzats foren l'encebador **NPR1-5'** i el **NPR1-3'** (veure **Figura 78A**) obtenint-se un producte d'amplificació d'aproximadament 1800 pb en aquelles plantes que havien integrat el transgen. A la **Figura 79** es mostren algunes de les línies analitzades.

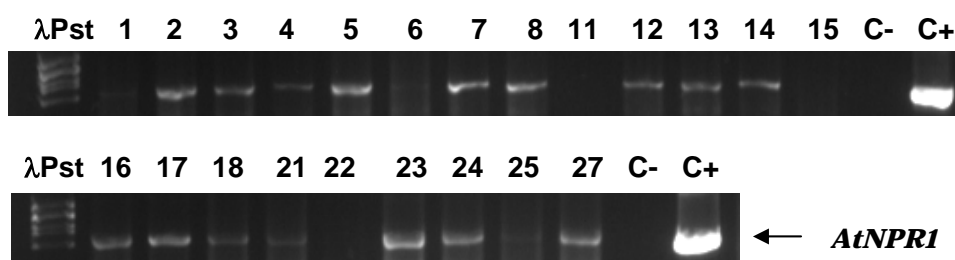


Figura 79. Cribatge de les plantes transgèniques *AtNPR1*. Anàlisi del DNA genòmic mitjançant PCR d'algunes de les línies regenerades (generació T₀) (carrils indicats amb el n° de la línia corresponent). Com a control positiu (C+) es va utilitzar el plàsmid *pC1300::ubi::AtNPR1::nos*. Com a control negatiu DNA genòmic de plantes Sènia no transformades (A). També s'indica el control negatiu de la reacció de PCR, sense DNA (C-).

II. 1. 3 Nivell d'expressió del gen *AtNPR1* en línies d'arròs transgèniques

Les plantes obtingudes (generació T₀) foren crescudes als hivernacles de l'IRTA fins a la recollida del gra. Seguidament es va procedir a l'obtenció de la generacions T₁ i T₂ homozigòtiques (mitjançant selecció amb higromicina), analitzant-se en cada generació el nivell d'expressió del transgen. Per a determinar el grau d'expressió de mRNA de les línies transformades, es va el mètode *Northen-blot*. Com a sonda es va emprar la zona codificant, obtinguda a partir del plàsmid pKEx4tr mitjançant PCR amb els oligonucleòtids NPR1-int' i

RESULTATS

NPR1- 3' (**Apartat 1.8.1, Material i Mètodes**). Per dur a terme l'anàlisi, es va extreure RNA total de les fulles de les línies obtingudes (generacions T₀, T₁ i T₂). A la **Figura 80** es mostra els nivells de transcrits que es detecten en les línies que van ser seleccionades en la segona generació (T₂), i que posteriorment van ser utilitzades en els assaigs de resistència front a fongs fitopatògens i insectes.

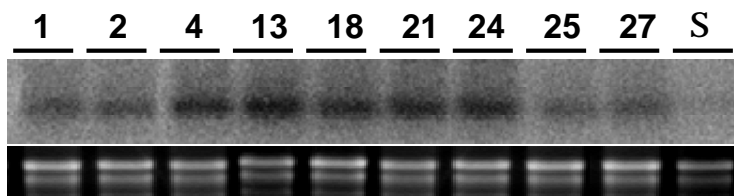


Figura 80. Northern-blot de les línies transgèniques d'arròs *AtNPR1* (generació T₂) i plantes Sènia control no transformades (S). El RNA total (20 µg) fou hibridat amb la sonda de cDNA de *AtNPR1*. El pannel inferior mostra la tinció amb bromur etidi de les mostres de RNA analitzades.

II. 2. RESISTÈNCIA DE LES PLANTES D'ARRÒS *ATNPR1* FRONT PATÒGENS

II.2.1 Resistència de les plantes d'arròs *AtNPR1* davant fongs

Per tal determinar si l'expressió del gen *AtNPR1* en plantes d'arròs confereix protecció front la infecció fúngica, es van portar a terme infeccions de les plantes transgèniques i plantes control, amb els fongs *M. grisea* i *F. verticillioides*. Així, s'analitzaren 5 línies homozigòtiques independents (generació T₂) que presentaven diferents nivells d'expressió del transgen (línies 1, 2, 13, 24, 27) (veure **Figura 80**).

Pel que fa als estudis de resistència a *M. grisea*, es va fer servir inicialment l'assaig de fulla tallada. Per fer-ho, fulles de plantes *AtNPR1* i plantes Sènia control no transformades, van ser inoculades amb dosis creixents d'espores de *M. grisea*, i es va anar fent un seguiment del desenvolupament dels símptomes de la infecció al llarg del temps. Tal i com es mostra a la **Figura 81A**, a la concentració de 10⁶ espores/ml, apareixien lesions a les plantes control als 2-3 dies després de la inoculació (dpi), mentre que, sota les mateixes condicions experimentals, no

es detectaven símptomes en les fulles de línies *AtNPR1*. A les plantes control, les lesions es desenvolupaven activament. Així, als 6 dpi, les fulles de les plantes control estaven visiblement danyades.

A les línies *AtNPR1*, apareixien petites lesions a dosis més elevades d'inòcul, però aquestes no s'estenien tant com en les plantes control. Es van analitzar les diferències en l'àrea de les lesions de la fulla infectada, mitjançant el software *Scion Image* (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm), comparant les plantes control amb les línies transgèniques. L'àrea de la lesió observada depenia de la dosi d'inòcul de fong utilitzat. Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 81B**. Per a un inòcul de 10^6 espores/ml i als 6 dies després de la inoculació, les plantes Sènia control presentaven lesions d'un tamany mitjà de $1,4 \text{ cm}_2$, mentre que les línies *AtNPR1* presentaven tamanyes de lesions de $0,22 \text{ cm}_2$ (línia 1); $0,27 \text{ cm}_2$ (línia 13) i $0,41 \text{ cm}_2$ (línia 24).

A més, en analitzar mitjançant microscòpia fulles d'arròs infectades amb *M. grisea* i tenyides amb blau de "trypan", s'observa una extensa colonització fúngica en el teixit foliar de les plantes Sènia control, així com una esporulació significativa. Per contra, sota les mateixes condicions experimentals, s'observa una reduïda colonització del fong en les fulles de plantes *AtNPR1* (línies 1, 13 i 24) (**Figura 81A, pannell dret**).

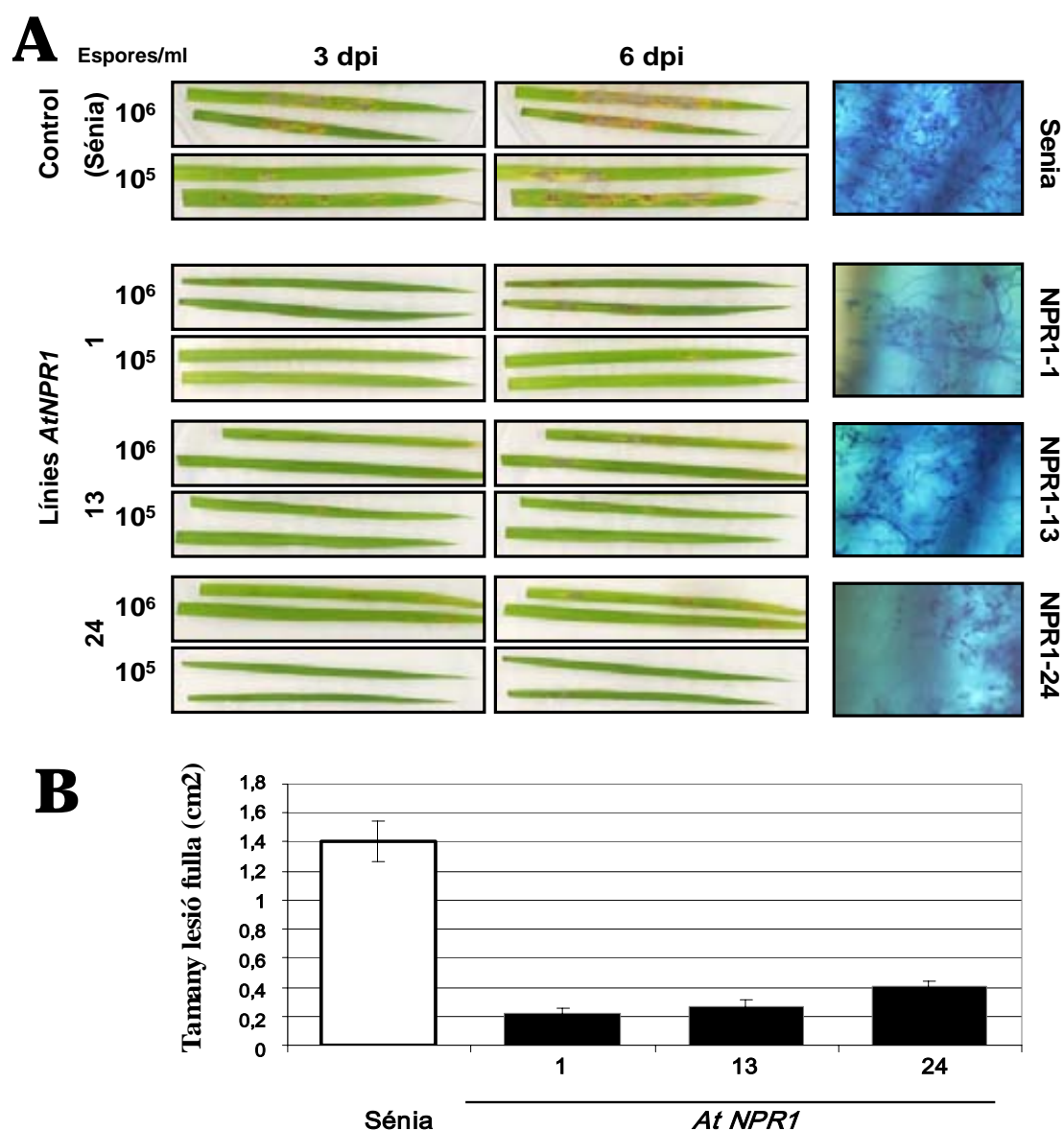


Figura 81. Assaigs de resistència a *M. grisea* de plantes transgèniques d'arròs que expressen el gen *AtNPR1*, en experiments de fulla tallada. **A)** Fulles de plantes Sénia no transformades i línies d'arròs *AtNPR1* (generació T2, línies 1, 13 i 24) inoculades localment amb espores de *M. grisea* (20 µl 10⁵/10⁶ espores/ml). Es mostren els símptomes passats 3 i 6 dies després de la inoculació (dpi), d'un dels 3 experiments realitzats amb resultats similars. A la columna de la dreta, es mostra la tinció representativa amb "blau de tripan" de fulles inoculades amb 10⁶ espores/ml, als 9 dies de la inoculació amb el fong. **B)** Tamany de les lesions (cm²) produïdes en les fulles de plantes control Sénia i plantes transgèniques *AtNPR1* passats 6 dies de la infecció amb *M. grisea*. A la inoculació es van fer servir 20 µl de la suspensió d'espores a 1.10⁶ espores/ml. Es va determinar l'àrea mitja de la lesió per cada infecció (tres inoculacions per fulla, tres fulles per planta i tres plantes per línia; columnes ± ESM).

Es va realitzar també el comptatge del nombre d'espores produïdes en les fulles infectades de plantes control vers les transgèniques. Als 6 dies dpi, el nombre mig d'espores recollides de fulles infectades de plantes Sènia control va ser de 19.230 ± 1.350 espores/ml, mentre que per les plantes transgèniques *AtNPR1* va ser de 4.580 ± 320 espores/ml per la línia 1, de 3.660 ± 280 espores/ml per la línia 13 i de 6.330 ± 520 espores/ml per la línia 24 (**Figura 82**). Per tant, els resultats obtinguts indicaven que efectivament l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs inhibia el creixement del fong *M. grisea* en les plantes transformades.

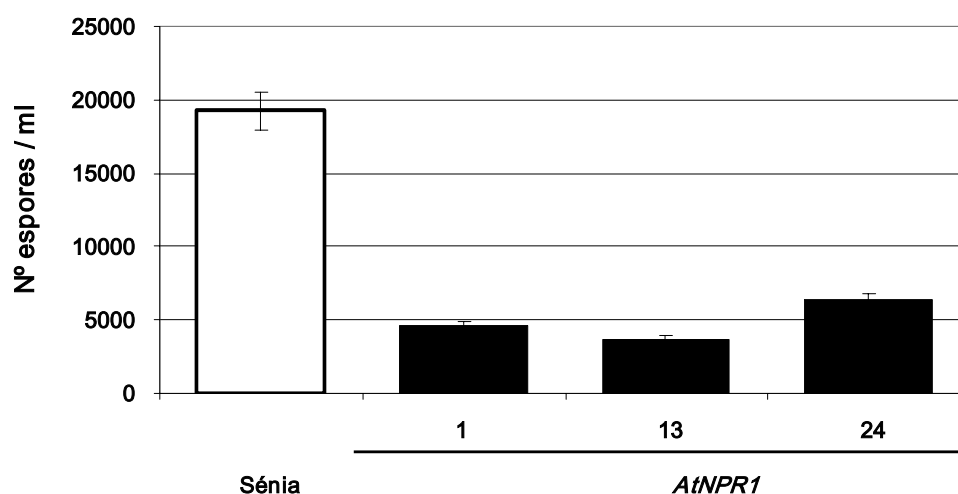


Figura 82. Comptatge d'espores de *M. grisea* en les plantes d'arròs *AtNPR1*. Els valors donats són la mitja i l'error estàndard per tres comptatges independents para cada fulla infectada i tres fulles per cada línia transgènica).

Seguidament es va provar si aquestes mateixes línies *AtNPR1* mostraven també resistència front el fong *Fusarium verticillioides*. Per dur a terme aquest assaig, es varen inocular llavors de la segona generació homozigòtica (T2), així com llavors de la varietat Sènia control. Tal i com es mostra a la **Figura 83**, les llavors de les línies *AtNPR1* -1 i 13 foren capaces de germinar en presència de *F. verticillioides*. Per contra, el fong va colonitzar les llavors control i no van poder germinar. Resultats similars es van obtenir amb les línies *AtNPR1* 2, 24 i 27 (resultats no mostrats). Per tant, aquests resultats indicaven que l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs confereix protecció front el fong *F. verticillioides*.



Figura 83. Resistència front la infecció per *Fusarium verticillioides* de plantes d'arròs que expressen el gen *AtNPR1*. Fenotips de les llavors transgèniques *AtNPR1*, línies 1 i 13, infectades amb *F. verticillioides*, i línies Sénia control. Per cada línia, les llavors germinades 24h, es van inocular amb 50 µl de la suspensió d'espores a 10⁷ espores/ml o amb aigua estèril, i es va permetre continuar amb la germinació. Les fotografies es van realitzar als 9 dies post-inoculació. Es van obtenir resultats similars als presentats en 3 assaigs independents.

II.2.2 Resistència de les plantes d'arròs *AtNPR1* front el bacteri *Erwinia chrysanthemi*

Es va determinar, si les línies *AtNPR1* a més de mostrar resistència front a infeccions per fongs, presentaven també resistència front altres tipus de patògens. Per fer-ho, es van infectar plàntules de 2 dies amb *Erwinia chrysanthemi*, un patògen bacterià que causa la podridura de les arrels a l'arròs (Goto, 1979). Deu dies després de la infecció, les plantes no transformades presentaven ja els símptomes típics de la infecció per *E. chrysanthemi*. Les arrels es mostraven danyades amb el teixit enfosquit, a més de ser significativament més curtes i molt poques ramificacions secundàries (**Figura 84A**). Les línies transgèniques en canvi, presentaven arrels més desenvolupades i desenvolupaven ramificacions secundàries.

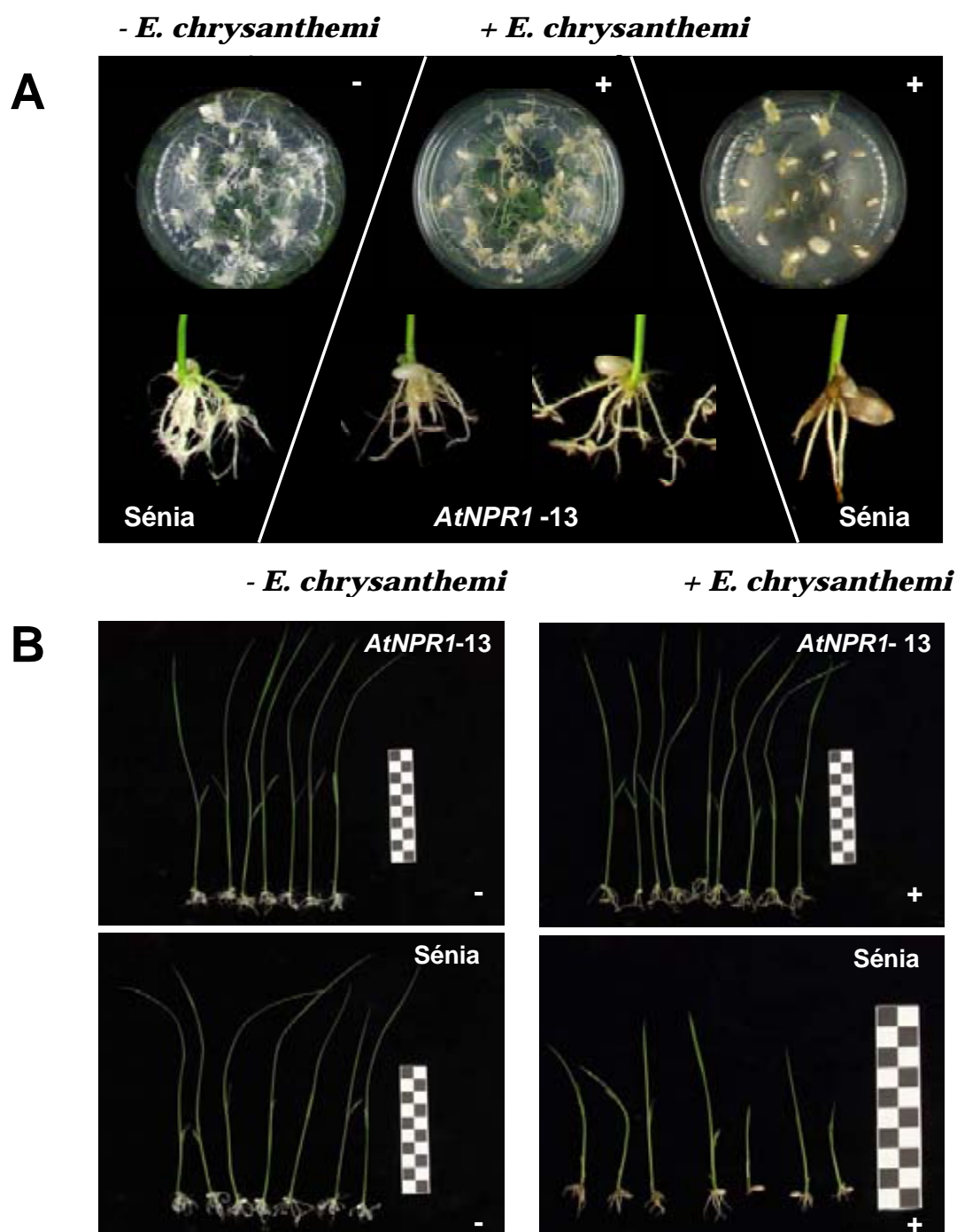


Figura 84. Resistència de plantes d'arròs que expressen el gen *AtNPR1* front la infecció pel bacteri *E. chrysanthemi*. **A)** Síntomes en arrel. Les llavors germinades durant 48h, es van infiltrar amb buit amb cultiu bacterià (10^6 CFU) i es va continuar amb la germinació. Les fotografies es van realitzar als 10 dies després de la infiltració. **B)** Síntomes en plàntules de 10 dies. Fenotip de les plàntules d'arròs inoculades amb *E. chrysanthemi*, sota les mateixes condicions explicades anteriorment. Els assaigs de resistència es van realitzar com a mínim dos cops per línia, i amb tres línies *AtNPR1* independents (1, 13 i 24) i plantes d'arròs Sévia control. (-) plantes no infectades; (+) plantes infectades.

A més dels símptomes evidents en les arrels i característic d'aquesta malaltia, les plantes transgèniques *AtNPR1* creixien molt més verdes i vigoroses que les plantes de la varietat Sévia

RESULTATS

control. Entre les línies transgèniques analitzades (1, 13 i 24), fou la línia 13 la que presentava un millor aspecte (**Figura 84B**).

Junts aquests resultats demostren que l'expressió de *AtNPR1* en arròs confereix una resistència d'ampli espectre efectiva front patògens fúngics i bacterians.

II.2.3 Susceptibilitat de les plantes d'arròs *AtNPR1* front el virus *RYMV*

Un cop comprovada la resistència de les plantes transgèniques d'arròs que expressaven constitutivament el gen *AtNPR1* front els fitopatògens fúngics *Magnaporthe grisea* i *Fusarium verticillioides*, i el bacterià *Erwinia chrysanthemi*, es va comprovar el comportament d'aquestes plantes front a un tipus de patògen completament diferent, els virus. Així, es va triar un patògen important de l'arròs, el virus *RYMV* (*Rice yellow mottle virus*).

En aquest assaig, es van sembrar les llavors de cada línia d'arròs individualment en dispositius independents, a raó de 100 plantes per cada línia transgènica i plantes control no transformades. Per cada línia (en el nostre cas 5 línies *NPR1*) es van inocular 70 plantes en estadi de 2 fulles amb *RYMV*, deixant 30 plantes no inoculades com a control. A la **Figura 85** es mostra un esquema de l'organització d'aquest bioassaig, realitzat en col·laboració amb el Dr. Christophe Brugidou, als hivernacles S2 del centre IRD (Montpeller, França).

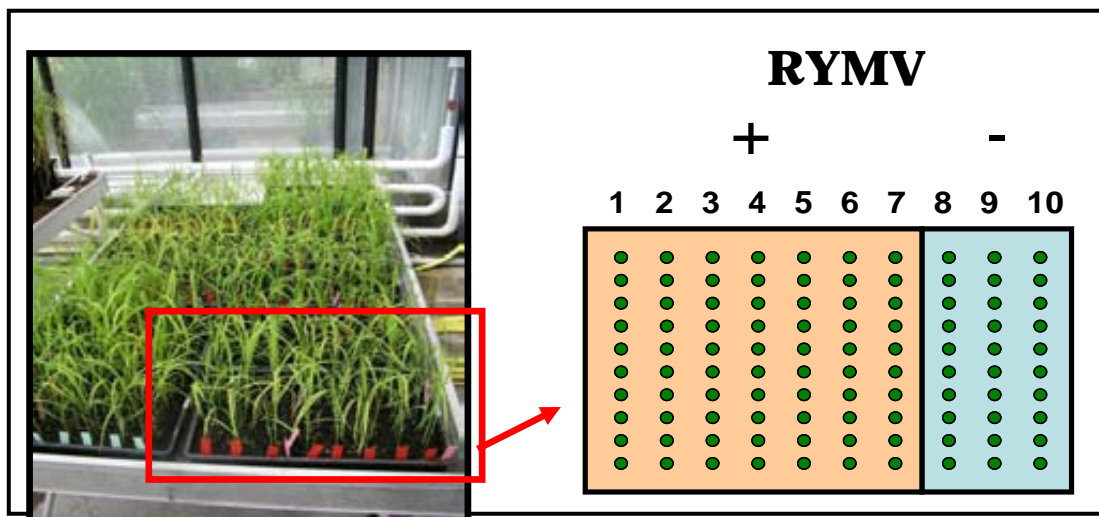


Figura 85. Assaig d'infecció de les plantes transgèniques d'arròs *AtNPR1* amb el virus *RYMV* d'arròs. En el segment taronja de l'esquema es mostren les plantes inoculades amb el *RYMV*, mentre que en el segment blau es presenten les plantes control no infectades. Aquest dispositiu es va repetir per totes les línies transgèniques, el control no transformat Sènia i la resta de varietats control (*Gigante*, *Azucena*, *Nipponbare* i *IR64*).

Així, es varen assajar les 5 línies independents d'arròs *AtNPR1* (1, 2, 13, 24 i 27), la varietat control no transformada Sènia, i com a referència s'utilitzaren les varietats **Gigante** (resistent), **Azucena** (parcialment resistent), **Nipponbare** (parcialment tolerant) i **IR64** (susceptible).

Es va realitzar un seguiment dels símptomes a partir del tercer dia post inoculació (3 dpi), i s'inicià la recollida del material als 7 dies del tractament, per tal de determinar la tasa de multiplicació i la càrrega viral de les fulles inoculades. També es van prendre mostres als 10, 14, 21 i 28 dies (dpi) de fulles sistèmiques de les plantes inoculades.

En la **Figura 86** es mostra un seguiment de l'evolució dels símptomes en el transcurs de l'assaig (dies 7, 10, 14 i 21 post-inoculació)

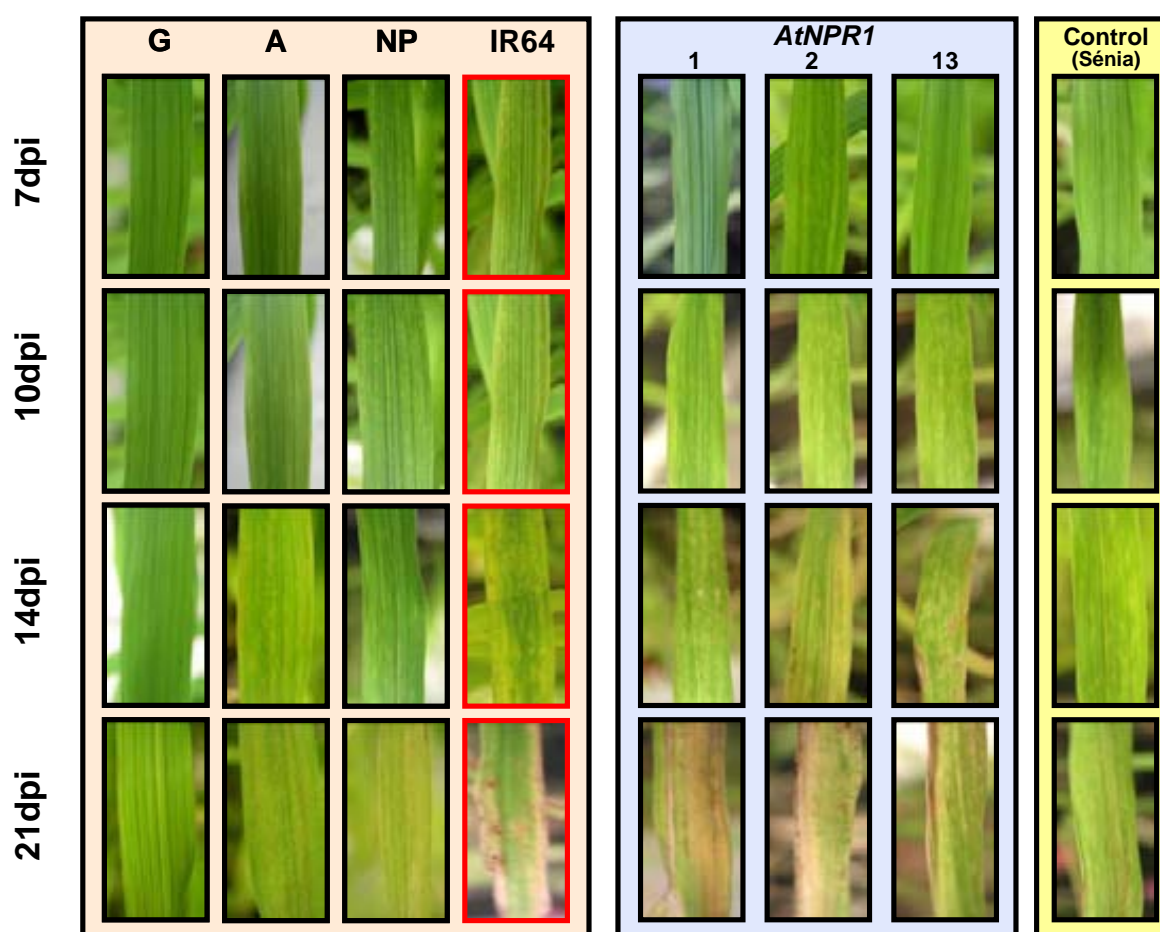


Figura 86. Síntomatologia de les plantes d'arròs *AtNPR1* després de la infecció amb el virus RYMV d'arròs. G: Gigante (resistent); A: Azucena (parcialment resistent), NP: Nipponbare (parcialment tolerant); IR64 (sensible); Control, Sènia no transformada. Es mostren 3 línies independents *AtNPR1* (1, 2, 13). A l'esquerra s'indica el temps transcorregut des de la inoculació amb el virus, 7, 10, 14 i 21 dies post-inoculació (dpi).

RESULTATS

A partir del setè dia, van començar a aparèixer els primers símptomes, principalment a la varietat susceptible IR64, utilitzada com a control. Als 10 dpi, els símptomes eren visibles a les línies *AtNPR1*, i de manera més feble a les varietats Sènia no transformada i Nipponbare. Als 14 dpi el fenotip sensible era tant acusat en les línies *AtNPR1* com a la varietat susceptible IR64, mentre que Sènia i Nipponbare presentaven un fenotip més tolerant a la malaltia. En aquest mateix temps, la varietat Azucena mostrà una simptomatologia molt lleu (resistència parcial), mentre que la varietat Gigante no mostrà cap símptoma de la infecció. Al final del assaig (28 dpi) les línies *AtNPR1* estaven lleugerament menys danyades que la varietat sensible IR64, però amb símptomes d'infecció més acusats que en el cas de les plantes control Sènia i Nipponbare (**Figura 87**). La varietat Azucena presentà al final de l'assaig una lleu afectació fenotípica causada pel virus, mentre que la varietat Gigante no mostrava cap símptoma. En la **Figura 87** es mostra un resum dels símptomes observats al final de l'assaig (28 dpi), a les plantes emprades en els bioassaigs amb el virus RYMV.

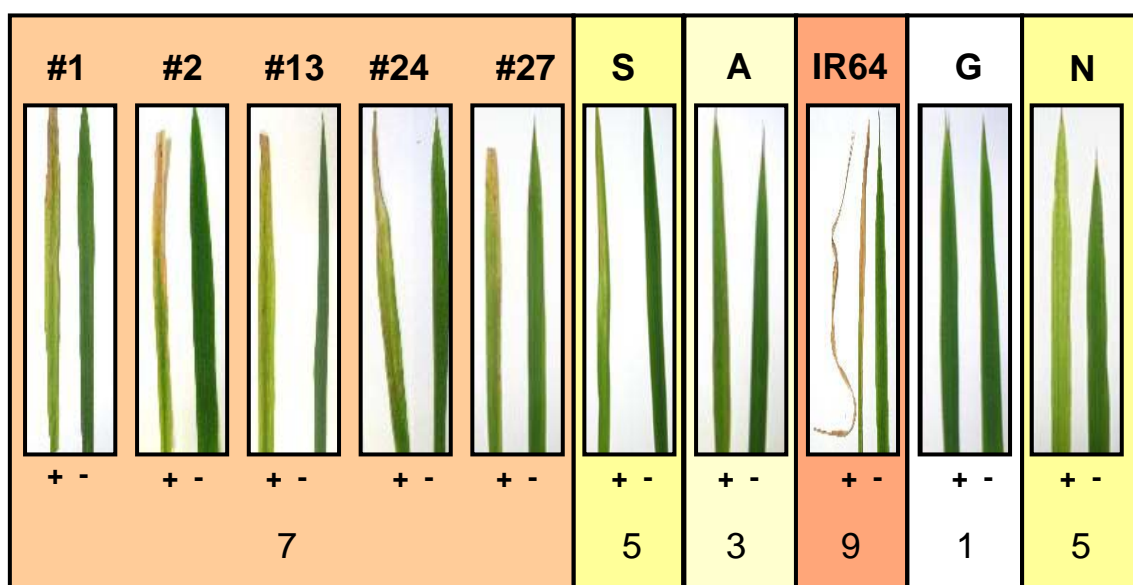


Figura 87 Síntomes observats en les plantes infectades amb el virus RYMV (28 dpi). A: Azucena (parcialment resistent); S: Sènia no transformada; IR64 (subceptible); G: Gigante (resistent); NP: Nipponbare (parcialment tolerant). Es mostren 5 línies independents *AtNPR1* (1, 2, 13, 24 i 27). Plantes inoculades (+) i no inoculades (-). A la part inferior es mostren els valors de simptomatologia definits en base als criteris del Sistema d'Avaluació Estàndard de l'arròs (<http://www.knowledgebank.irri.org/ses/SES.htm>) (Taula XII).

A la part inferior de la Figura 87 s'indica el grau d'infecció per RYMV en les diferents línies analitzades en base als criteris definits en el Sistema per l'Avaluació Estàndard de l'arròs

(<http://www.knowledgebank.irri.org/ses/SES.htm>) (SES, *Standard Evaluation System for Rice*), criteris que es mostren a la **Taula XII**.

Taula XII. Escala emprada per determinar-ne els símptomes (SES, *Standard Evaluation System for Rice*) (<http://www.knowledgebank.irri.org/ses/SES.htm>).

Escala (adaptat d'assaigs de camp) RYMV	Símptomatologia
1	No s'observen símptomes
3	Fulles verdes però amb puntejats o ratlles clares, pèrdua de pes menor del 5%
5	Fulles verdes o de color verd pàl·lid amb motejat, pèrdua de pes del 6%-25%, floració lleugerament tardana
7	Fulles de color groc pàl·lid o groc, reducció de pes del 26-75%, floració tardana
9	Fulles grogues o taronges, reducció de pes superior al 75%, no hi ha floració, algunes plantes moren

Basant-nos en els criteris indicats a la Taula XII per a l'avaluació de les propietats de resistència/susceptibilitat de les plantes inoculades amb el virus RYMV, es conclou que la varietat Sènia mostra un fenotip similar al de Nipponbare (parcialment tolerant). Les plantes Sènia que expressen constitutivament el gen *AtNPR1* són però, més susceptibles a la infecció per RYMV que les plantes no transgèniques. Les línies transgèniques no són tan susceptibles a la infecció per RYMV com ho són les plantes IR64.

A continuació es va avaluar la quantitat de partícules víriques presents en les fulles a cada línia transgènica, i es comparà amb les plantes de les varietats controls. Per fer-ho, es va procedir a la detecció del virus mitjançant DAS-Elisa (DAS, *Double Antibody Sandwich*) (Plant virus diagnostics, DSMZ), tant de les fulles inoculades (7 dpi) com de les fulles sistèmiques (10, 14 i 21 dpi). Com anticòs s'utilitzà un de preparat contra la proteïna de la càpsida (CP) del virus (anticòs RYMV- Mg). En cada mostreig, i per cada varietat o línia transgènica, es prengueren 10 fulles al atzar d'entre les plantes inoculades, i 6 fulles no inoculades. Per cada línia s'utilitzaren 200 µg de material per l'extracció i el posterior anàlisi Elisa. Es van fer tres dilucions per extracció de cada mostra (1/10, 1/100 i 1/1000), i dues rèpliques per cadascuna. En la **Figura 88** es mostra el nivell d'acumulació de les partícules virals per els diferents mostres i temps analitzats durant el bioassaig.

RESULTATS

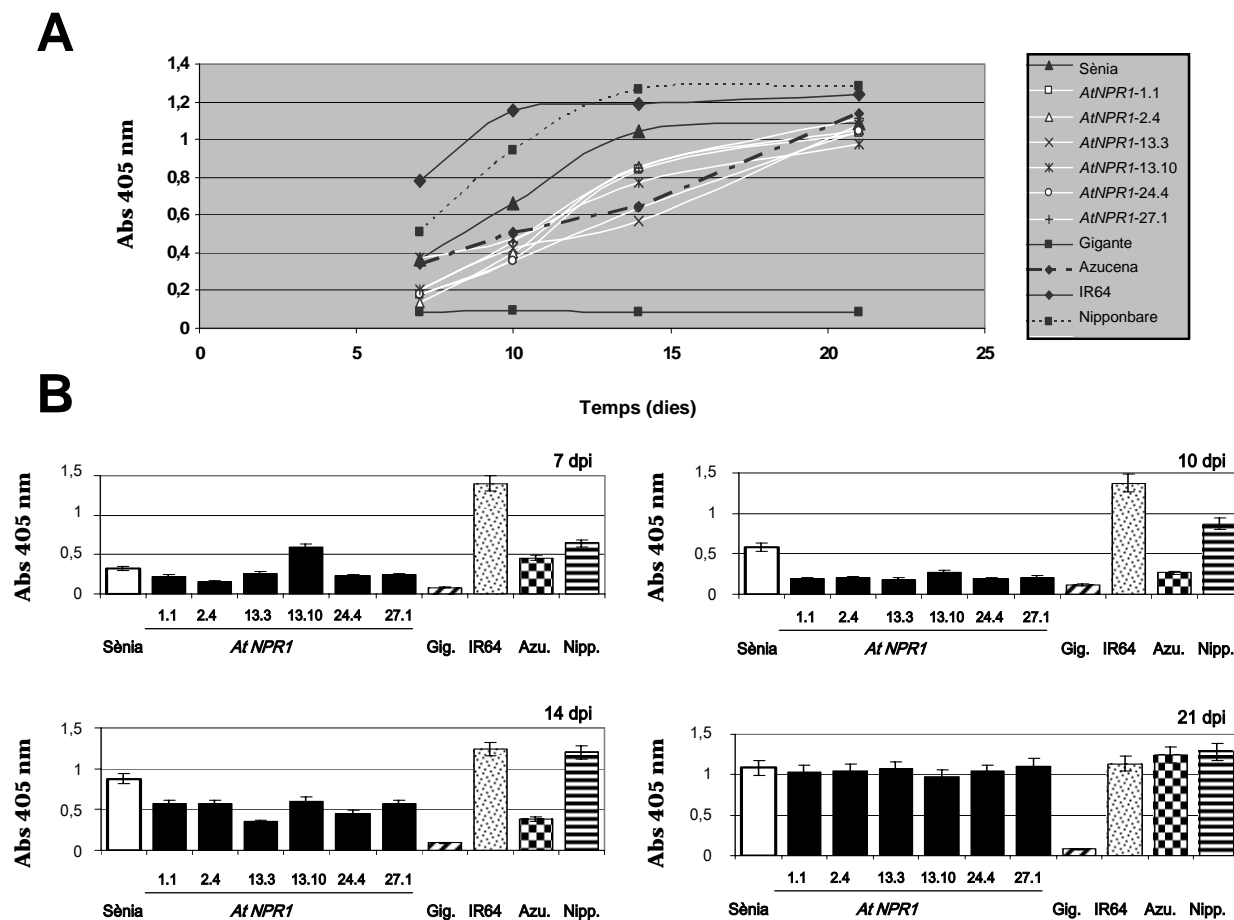


Figura 88. Determinació de la quantitat de partícules virals en fulles de les diferents línies d'arròs inoculades amb el virus RYMV. A) S'indica en la llegenda de la figura les línies transgèniques assajades: Gigante (resistent), Azucena (parcialment resistent), Nipponbare (parcialment tolerant), IR64 (sensible), Control, Sènia no transformada. En l'eix X s'indica el temps transcorregut en dies a partir de l'inoculació, i en l'eix Y el valor obtingut en el test ELISA. B) Histograma comparatiu dels nivells d'acumulació de partícules virals (resultats mostrats en A.) entre les diferents línies *AtNPR1* i les varietats controls, pels dies indicats a cada panell.

La varietat susceptible IR64 (-◆-) acumulen alts nivells de RYMV tant en fulles locals com sistèmiques ja en els primers temps analitzats, conseqüentment amb l'aparició dels símptomes vírics. Per contra, la varietat resistent Gigante (-■-) acumulen RYMV a nivells molt baixos en totes les mostres analitzades. Als 7 dpi, el nivell d'acumulació del virus en les fulles inoculades localment de les línies transgèniques *AtNPR1* és menor que en les plantes Sènia (-▲-) o Azucena (-◆-) (exceptuant en el cas de la línia 13.10). L'acumulació del virus en les fulles sistèmiques als 10 dpi, és significativament menor en totes les línies *AtNPR1* que en Sènia control. No obstant, cal puntualitzar que la severitat dels símptomes als 10 dpi és major en les fulles sistèmiques de les plantes transgèniques *AtNPR1* que de les plantes Sènia control (veure **Figura**

86). Així, no s'observa correlació entre el contingut víric i la simptomatologia en les fulles sistèmiques de les plantes *AtNPR1*, si les comparem amb les plantes Sénia als 10dpi. El contingut en RYMV de les plantes transgèniques *AtNPR1* s'incrementa progressivament als 14 i 21 dpi, fins arribar a nivells similars als detectats en fulles de plantes Sénia control (**Figura 88, 14 i 21 dpi**). Així, als 21 dpi, el nivell d'acumulació de RYMV detectat és similar en plantes *AtNPR1*, Sénia i Azucena. Però, tot i que el contingut víric és similar entre aquestes plantes, la simptomatologia que desenvolupen les plantes *AtNPR1* front la infecció per RYMV és més severa que la que desenvolupen Sénia o Azucena (veure **Figura 86**). Als 28 dpi, excepte en la varietat resistent Gigante, l'acumulació de RYMV en fulles sistèmiques de totes les demás línies és molt similar (transgèniques *AtNPR1*, control Sénia, IR64, Azucena i Nipponbare). No es va detectar RYMV en plantes no inoculades de cap dels genotips testats. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'expressió constitutiva de *AtNPR1* en plantes transgèniques d'arròs provoca una major susceptibilitat a RYMV. A més, de l'anàlisi conjunt de càrrega viral i simptomatologia realitzada en el període de temps que va des dels 7 als 21 dpi, es dedueix que no hi ha una correlació directa entre nivell d'acumulació de partícules virals i simptomatologia observada en les fulles sistèmiques de les plantes transgèniques en relació a la càrrega viral i la simptomatologia observades en les plantes control Sénia no transformades. Així, els símptomes d'infecció en fulles sistèmiques són més severs en les línies *AtNPR1* que en plantes no transformades, tot i que la càrrega viral en les mateixes és menor. Podria pensar-se que l'expressió de *AtNPR1* desencadena mecanismes endògens en teixits sistèmics que fa que aquest teixits siguin més sensibles a la presència del virus, i que per tant manifestin símptomes d'infecció més acusats.

II.3 EXPRESSIÓ DE GENS DE DEFENSA EN LES PLANTES D'ARRÒS *AtNPR1*

En *Arabidopsis*, el gen *AtNPR1* és un regulador clau de les respostes de defensa front patògens mediades per l'àcid salicílic (SA). Se sap que *AtNPR1* regula l'expressió de gens PR (*Pathogenesis Related*) d'*Arabidopsis*. Per tal de determinar si la sobreexpressió del gen *AtNPR1* en arròs, regula l'expressió dels gens endògens de defensa de la planta d'arròs, es va analitzar el patró d'expressió de determinats gens de defensa d'arròs en plantes transgèniques i plantes control no transformades. En ambdós casos es va estudiar la seva expressió també en situació d'infecció per *M. grisea*.

Primerament, es seleccionà un conjunt de gens d'arròs, com són els gens *PR1b* (Agrawal *et al.*, 2001), *PR5* (TLP, *thaumatin like protein*) (Velazhahan *et al.*, 1998), *PBZ* (Midoh i Iwata, 1996), *PR10* (Nº Acc.: AF416504). Es va realitzar una cinètica d'infecció amb *M. grisea* sobre fulles d'arròs de la varietat Sènia control i 4 línies independents *AtNPR1* (línies 1, 2, 13 i 24). Es prengueren mostres de les fulles infectades a les 3, 6, 12 i 24 hores després de la inoculació amb espores de *M. grisea*, així com a temps 0h (mostres no inoculades). No hi ha expressió dels gens endògens en fulles no infectades amb *M. grisea* (-), ni en plantes Sènia ni en plantes *AtNPR1* a T0.

En analitzar l'expressió dels gens de l'estudi per RT-PCR en plantes d'arròs de la varietat Sènia control i de les línies *AtNPR1*, s'observà que aquestes últimes presentaven una expressió més forta i/o més temprana en resposta a la infecció, dels gens *PR-1b*, *PR5* (TLP), *PBZ* i *PR-10* (**Figura 89**). En el cas dels gens *PR1b*, *PR5* i *PR10*, s'observa una inducció de la seva expressió en plantes transgèniques ja abans de les 6-12h post-inoculació. Així, el gen *PR1b* presenta un nivell d'expressió important a les 6 i 12h després de la inoculació en les plantes *AtNPR1*. Els transcrits del gen *PR5* (TLP), es detecten en plantes Sènia control només 24h després de la inoculació, mentre que en les plantes *AtNPR1*, *M. grisea* indueix l'acumulació de transcrits de *PR5* ja a les 3h post-inoculació. Pel que fa el gen *PR10*, aquest mostrà un patró amb una inducció temprana (3h post-inoculació) en plantes transgèniques (12h en plantes control Sènia). En aquest cas però, els nivells de transcrits es mostraren similars a les 12 i 24 hores post-inoculació, respecte els controls Sènia. En plantes Sènia no inoculades s'observen també transcrits de *PR10* (12 i 24 hores post-inoculació). Finalment, el gen *PBZ* s'expressa ja fortament a les 12h després de la inoculació en les plantes transgèniques, mentre que en plantes control no es detecta la seva expressió fins les 24h post-inoculació.

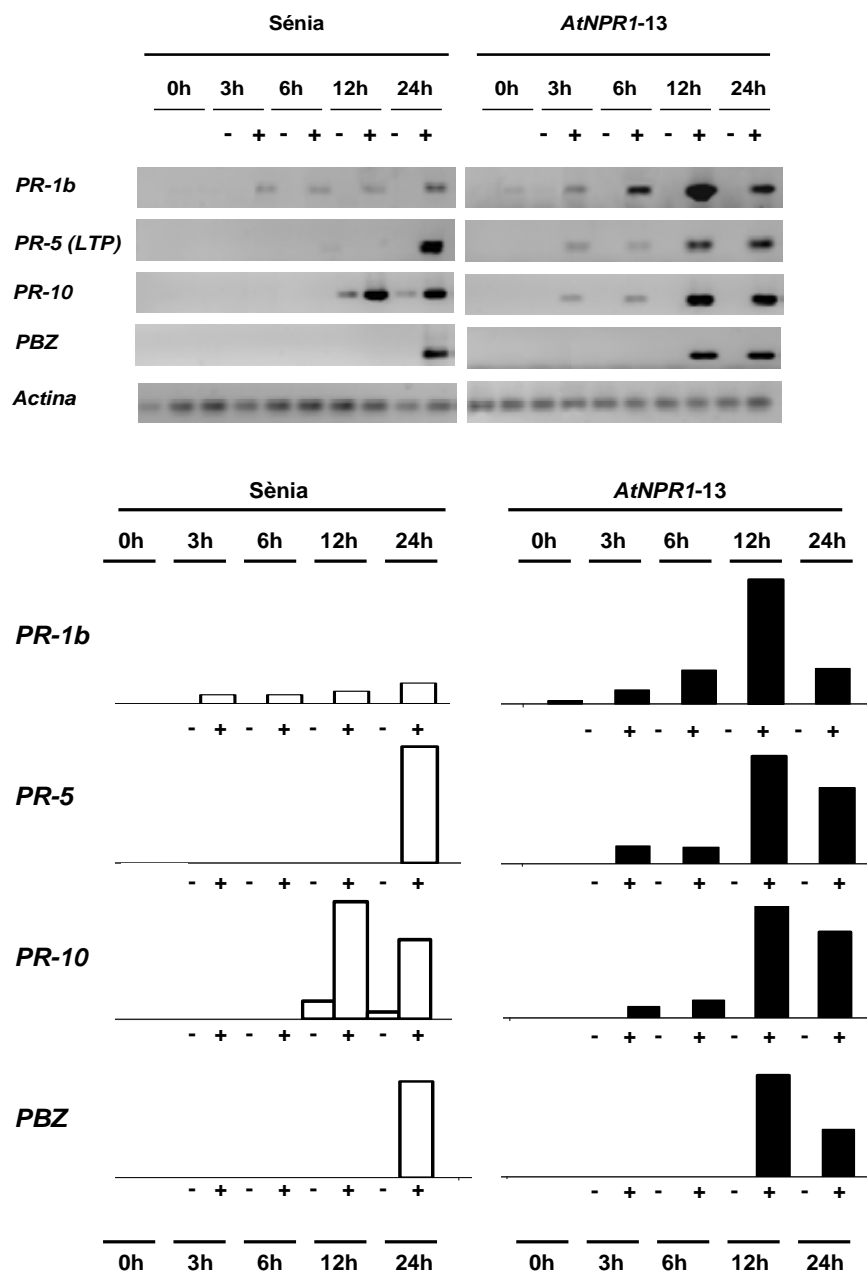


Figura 89. Cinètica d'expressió dels gens *PR1b*, *PR5 (TLP)*, *PBZ* i *PR10* en fulles d'arròs *AtNPR1* infectades amb *M. grisea*. Es realitzà l'assaig de fulla tallada inoculant-se 20 µl d'una suspensió de 10⁶ espores/ml de *M. grisea* per fulla. Es mostra l'expressió dels diferents gens analitzats per RT-PCR a partir de 2 µg de RNA total. S'indiquen els diferents temps (0, 3, 6, 12 i 24 h) així com si les mostres són no inoculades (-) o inoculades (+). Els histogrames indiquen l'expressió relativa obtinguda per cada gen normalitzada amb l'expressió del gen d'actina d'arròs.

RESULTATS

Per altra banda, en aquest treball es va realitzar una búsqueda de gens amb homologia al gen *AtNPR1* d'Arabidopsis en el genoma de l'arròs. Per fer-ho, es va utilitzar el programa *BLAST-protein* (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTP). Seguidament es va realitzar una comparació de les seqüències aminoacídiques deduïdes a partir dels gens identificats en el genoma d'arròs mitjançant els programes *ClustalW* (www.ebi.ac.uk/clustalw/) i *BioEdit* (Hall, 1999). A la **Figura 90** es mostra la comparació de les seqüències d'aminoàcids de *AtNPR1* d'Arabidopsis amb les seqüències deduïdes dels gens ortòlegs identificats a l'arròs a la varietat *indica* (Chern *et al.*, 2005) i *japonica* (Nº Acc.: AY323485). S'inclou en la comparació la seqüència d'un gen de tabac *NtNPR1* (Nº Acc.: DQ837218)

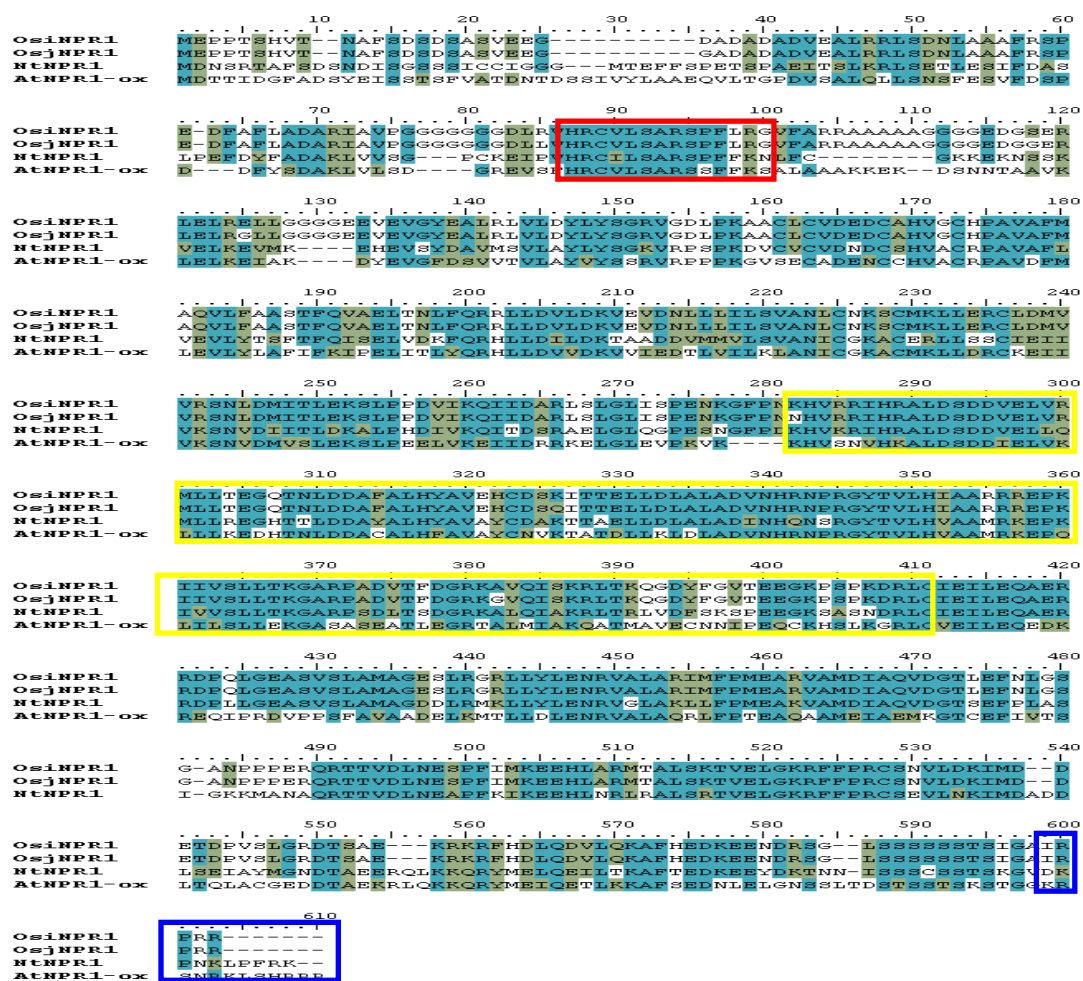


Figura 90. Comparació de les seqüències d'aminoàcids deduïdes dels gens de la *AtNPR1* d'Arabidopsis i de gens d'arròs de la varietat *indica* (*OsjNPR1*, Nº Acc.: AY923983) i de la varietat *japónica* (*OsjNPR1*, Nº Acc.: AY323485) i tabac (*NtNPR1*, Nº Acc.: DQ837218). Es mostren els aminoàcids que pertanyen al motiu anquirina (recuadre grog), el domini BTB (recuadre vermell) i el domini NLS (recuadre blau).

A partir d'aquest alineament, s'observa que existeix un elevat grau d'homologia del gen *NPR1* entre diferents espècies de plantes incloent monocotiledònies (com dos varietats d'arròs, *indica* i *japònica*) i dicotiledònies (com el tabac). Així doncs va resultar també interessant determinar si existia algun efecte degut a l'expressió en transgènia del gen *AtNPR1* sobre l'expressió del gen endogen en arròs (en el nostre cas *OsjNPR1*, també descrit en la literatura com el gen *OsNHI*) (Chern *et al.*, 2005). Es va comprovar així, que el gen *OsNHI* presenta un patró d'expressió en resposta a infecció per *M. grisea*, amb una inducció a les 6 hores, tant en les línies d'arròs *AtNPR1* com en els controls Sénia. De manera interessant però, aquesta resposta a la infecció es veu reduïda significativament a partir de les 24 hores en les plantes de les línies d'arròs *AtNPR1* en comparació amb Sénia control. Aquestes observacions suggereixen que l'expressió transgènica de *AtNPR1* interfereix negativament amb l'expressió del gen endogen *OsNHI*

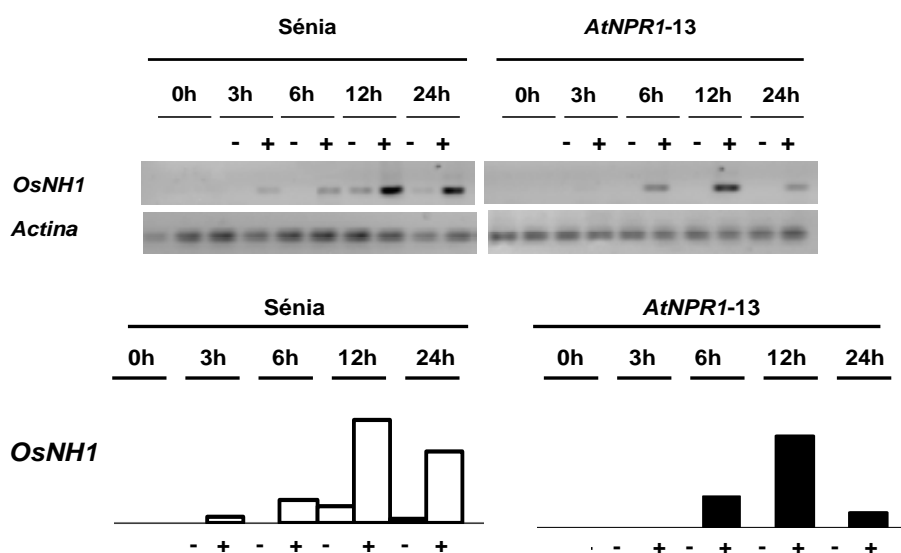


Figura 91. Cinètica d'expressió del gen *OsNHI* en fulles d'arròs *AtNPR1* infectades amb *M. grisea*. Es realitzà l'assaig de fulla tallada inoculant-se 20 µl d'una suspensió de 10⁶ espores/ml de *M. grisea* per fulla. Es mostra l'expressió del gen analitzat per RT-PCR (2 µg de RNA total). S'indiquen els diferents temps (0, 3, 6, 12 i 24 h) així com si les mostres són no inoculades (-) o inoculades (+). Els histogrames indiquen l'expressió relativa obtinguda per cada gen normalitzada amb l'expressió del gen d'actina d'arròs

Per altra banda, va resultar també interessant, cercar gens d'arròs ortòlegs d'altres gens reguladors i efectors implicats en defensa descrits en *Arabidopsis*, per tal de analitzar-ne també la seva expressió en les línies *AtNPR1* d'arròs. En aquest sentit, es varen seleccionar i cercar a les bases de dades d'arròs mitjançant *Blast-nucleotide* (BLASTN 2.2.15, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) gens candidats i homòlegs a *TGA2* i *PAL*. S'ha descrit que *AtNPR1* interactua en *Arabidopsis* amb membres de la família TGA de factors de transcripció,

RESULTATS

particularment de TGA2.1 (Chern *et al.*, 2001). De la mateixa manera es coneix que els factors de transcripció tipus TGA2.1 d'arròs interactuen amb *AtNPR1* de manera similar a com ho fan els TGA2 d'*Arabidopsis* (Chern *et al.*, 2001). Tal i com es mostra a la **Figura 92**, el factor de transcripció *TGA2* d'arròs s'expressa a les 12 hores post-inoculació, tant a les línies *AtNPR1* com a les control Sènia. A les 24 hores però, no es detecta expressió en les línies *AtNPR1* mentre que segueix mantenint-se en les plantes no transformades de la varietat Sènia. Els resultats obtinguts en l'expressió induïda per *M. grisea* del gen endògen *TGA2* en plantes d'arròs indiquen que, al igual que s'havia observat en el cas del gen *OsNHI*, l'expressió transgènica de *AtNPR1* també interfereix negativament amb l'expressió del gen endogen *TGA2*. Mitjançant seqüenciació es confirmà que el producte de l'amplificació obtingut corresponia efectivament al gen *TGA2* (Nº Acc.: AB051294). En el cas del gen *OsPal*, enzim implicat en la biosíntesi de fenilpropanoides, aquest mostrà en les diferents línies *AtNPR1* un patró d'expressió i resposta a la infecció similar a l'observada en la varietat Sènia control no transformada (**Figura 92**). L'expressió d'aquest gen però, sembla lleugerament més feble en el cas de les línies *AtNPR1* respecte el control Sènia.

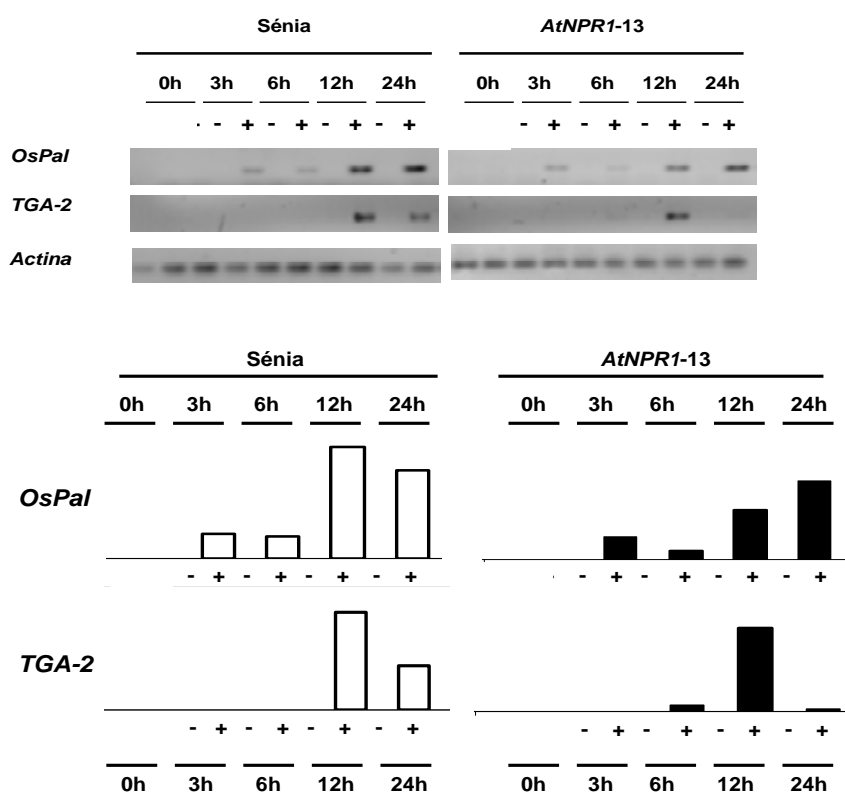


Figura 92. Cinètica d'expressió dels gens *OsPal* i *TGA2* en fulles d'arròs *AtNPR1* infectades amb *M. grisea*. Es realitzà l'assaig de fulla tallada inoculant-se 20 µl d'una suspensió de 10⁶ espores/ml de *M. grisea* per fulla. Es mostra l'expressió dels diferents gens analitzats per RT-PCR (2 µg de RNA total). S'indiquen els diferents temps (0, 3, 6, 12 i 24 h) així com si les mostres són no inoculades (-) o inoculades (+). Els histogrames indiquen l'expressió relativa obtinguda per cada gen normalitzada amb l'expressió del gen d'actina d'arròs

Finalment, s'estudià l'expressió del gen *Sci1*, membre de la família PR6 que codifica l'inhibidor de proteases (homòleg al gen *mpi* de blat de moro) (**Figura 93**). Al igual que s'havia vist pel gen *PR10*, s'observa una expressió basal del gen *Sci1* (*PR6*) en plantes Sénia control, però no en plantes *AtNPR1*, en absència d'infecció per *M. grisea* (12 i 24 h post-inoculació). En les línies *AtNPR1*, en el cas de les fulles no infectades no es detecta expressió, la qual sí es present en les fulles infectades amb el fong. De fet, aquesta expressió s'inicia a temps més avançats (6h post-inoculació) que en les fulles Sénia infectades (12h post-inoculació).

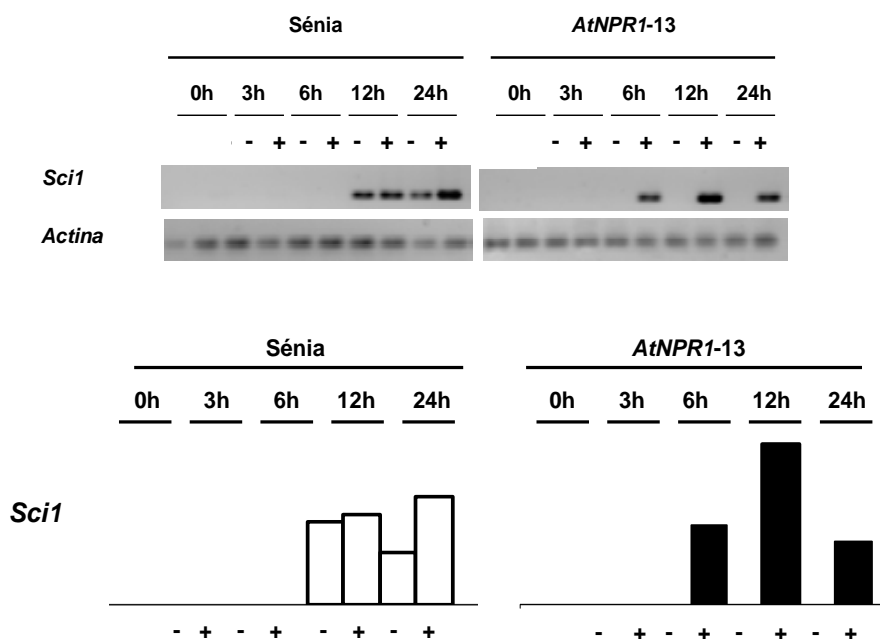


Figura 93. Cinètica d'expressió del gen *Sci1* en fulles d'arròs *AtNPR1* infectades amb *M. grisea*. Es realitzà l'assaig de fulla tallada inoculant-se 20 µl d'una suspensió de 10⁶ espores/ml de *M. grisea* per fulla. Es mostra l'expressió del gen analitzat per RT-PCR (2 µg de RNA total). S'indiquen els diferents temps (0, 3, 6, 12 i 24 h) així com si les mostres són no inoculades (-) o inoculades (+). Els histogrammes indiquen l'expressió relativa obtinguda per cada gen normalitzada amb l'expressió del gen d'actina d'arròs

Resumint, aquests estudis d'expressió de gens endògens d'arròs revelen que els gens *PR1b*, *PBZ1*, *PR10* i *Sci1* (*PR6*) presenten una activació ràpida i forta induïda per l'atac de patògens. En el cas dels gens reguladors *TGA2* i *OsNHI*, l'expressió en arròs del gen *AtNPR1* sembla que no interfereix amb la resposta inicial d'activació de la seva expressió en teixits infectats, si bé aquests gens es mantenen en un estat "induït" durant un temps més curt que l'observat en plantes control Sénia infectades. Les 5 línies independents de *AtNPR1* testades en aquest treball presenten els mateixos resultats. L'expressió augmentada de gens de defensa estaria positivament correlacionada amb una major resistència de les plantes *AtNPR1* a malalties fúngiques i bacterianes.

II. 4 FORMACIÓ DE LESIONS ESPONTÀNIES EN PLANTES D'ARRÒS *AtNPR1*

En el transcurs d'aquest treball, es publica el treball realitzat per Fitzgerald i col·laboradors (2004), en el que es descriu l'expressió del gen *AtNPR1* d'*Arabidopsis* en arròs (cultivar Taipei 309). Aquests autors mostren que les plantes d'arròs *AtNPR1* presenten un fenotip del tipus "lesió espontània per mort cel·lular" (LMD, *Lesion Mimic Cell-Death*) en ambients on els règims de llum estan alterats. Les plantes d'arròs *AtNPR1* (Sénia) crescudes en els nostres hivernacles no mostraven aquests tipus de lesions en cap moment del desenvolupament. Per tal de demostrar si les línies obtingudes en aquest treball, que expressen de manera constitutiva el gen *AtNPR1* desenvolupaven fenotips amb lesions, es van fer créixer plantes transgèniques (línies 1, 2, 13, 24 i 25) i així com de la varietat Sénia control, durant 3 setmanes a l'hivernacle, i posteriorment es van transferir a una cambra de creixement (**Figura 94**). Com a control, plantes de les mateixes línies *AtNPR1* i Sénia es van deixar créixer en l'hivernacle. Als 3 dies després de transferir-les a les cambres de creixement, les plantes *AtNPR1* presentaven lesions, tant a les fulles noves com a les velles

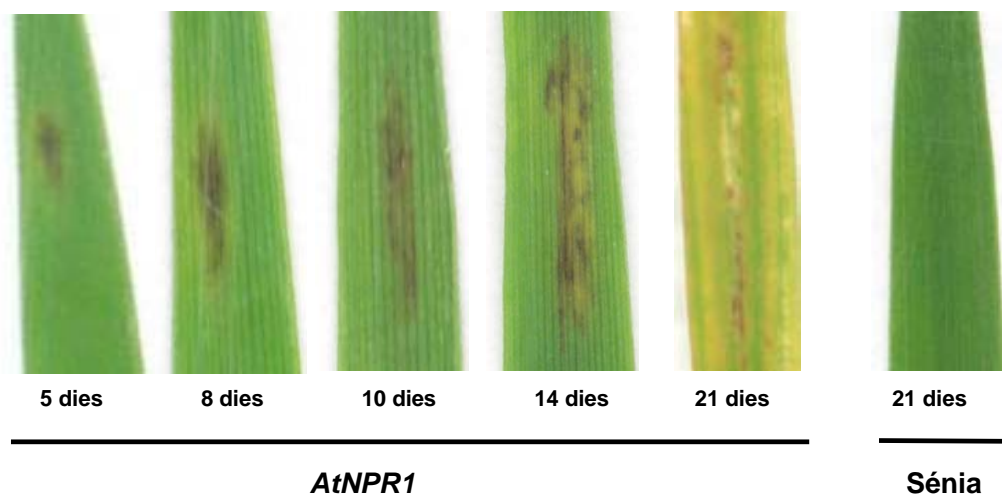


Figura 94. Lesions espontànies en plantes *AtNPR1* d'arròs. Es mostra el desenvolupament de les lesions al llarg del temps de les plantes *AtNPR1* crescudes en hivernacle durant 3 setmanes (intensitat llum: 12,000-20000 lux) i posteriorment mantingudes en cambres de creixement (fotoperíode 16h/8h, intensitat llum:6000-8000 lux) durant el temps indicat. Les plantes control Sénia foren crescudes en les mateixes condicions que les plantes transgèniques. S'obtingueren els mateixos resultats per les línies 1, 13 i 24.

Les lesions eren únicament aparents després de créixer les plantes a la cambra de creixement com a mínim 3 dies. Aproximadament el 70 % de les plantes *AtNPR1* desenvolupaven lesions després de passar 1 setmana a la cambra de creixement, però aquesta proporció incrementava fins el 100% si les plantes es mantenien a la cambra fins a 3-4 setmanes. Les línies 13 i 24 desenvolupaven unes lesions particularment àmplies, i són precisament aquestes dues línies transgèniques les que mostraren una major resistència vers *M. grisea* i *F. verticillioides*, així com una expressió més forta del transgen *AtNPR1*. A més, en aquestes plantes *AtNPR1*, les fulles més antigues presentaven assecament, clorosi i una forta necrosi que s'iniciava a l'àpex de la fulla. Hi ha per tant una correlació entre el temps d'aparició i mida de les lesions amb el nivell d'acumulació de transcrits de *AtNPR1*. Es va fer servir el mètode de tinció amb "blau de trypan", que tenyeix selectivament cèl·lules mortes, per analitzar la formació de lesions espontànies en plantes d'arròs *AtNPR1* (resultats no mostrats). La majoria de lesions comprenien agrupacions de cèl·lules del mesòfil i/o epiteli, amb alguns centenars de cèl·lules mortes per lesió. Les lesions s'anaven estenent-se amb el temps. Aquest fenotip es donava específicament a les plantes *AtNPR1* i no es va observar mai a les plantes Sènia control, crescudes sota les mateixes condicions a la cambra de creixement. En les plantes de les mateixes línies *AtNPR1* que es van deixar créixer en l'hivernacle, no s'observà aquest clar fenotip de lesions, però aquestes plantes *AtNPR1* sí presentaven puntualment un major assecament i clorosi al comparar-les amb les plantes de la varietat Sènia control, també crescudes en hivernacle.

Aquestes observacions indiquen que efectivament les plantes d'arròs *AtNPR1* són més sensibles a les condicions de creixement de la cambra de creixement que les de l'hivernacle. La principal diferència entre aquests dos ambients és l'abundància i qualitat de llum que les plantes perceben. La cambra de creixement es troba sota un règim de fotoperíode, amb un cicle de 16h de llum i 8h de fosc, i rep llum de baixa intensitat. La intensitat de llum total és 2-3 cops superior a l'hivernacle (12000-20000 lux) que a la cambra de creixement (6000-8000 lux). Així, aquests resultats coincideixen amb el anteriorment publicat per Fitzgerald et al. (2004) pel cultivar Taipei 309 d'arròs.

Un dels primers esdeveniments que es desencadenen en la resposta HR, és una explosió oxidativa que porta a la generació del ió superòxid (O_2^-) i la subseqüent acumulació de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (Lamb i Dixon, 1997). De fet, la formació de lesions i la mort cel·lular descrita en molts mutants amb la resposta de defensa alterada, presenten també acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Takahashi et al., 1999). Així, es va decidir determinar la presència d'aquests compostos concretament de O_2^- , mitjançant la tinció específica amb NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). Tal i com es mostra a la **Figura 95**, l'observació de les fulles de plantes *AtNPR1* crescudes durant 4 dies a la cambra de germinació, revela una

RESULTATS

forta acumulació del radical lliure O_2^- en els teixits adjacents a les lesions. No es va detectar acumulació de superòxid en fulles de plantes Sénia control crescudes en les mateixes condicions.

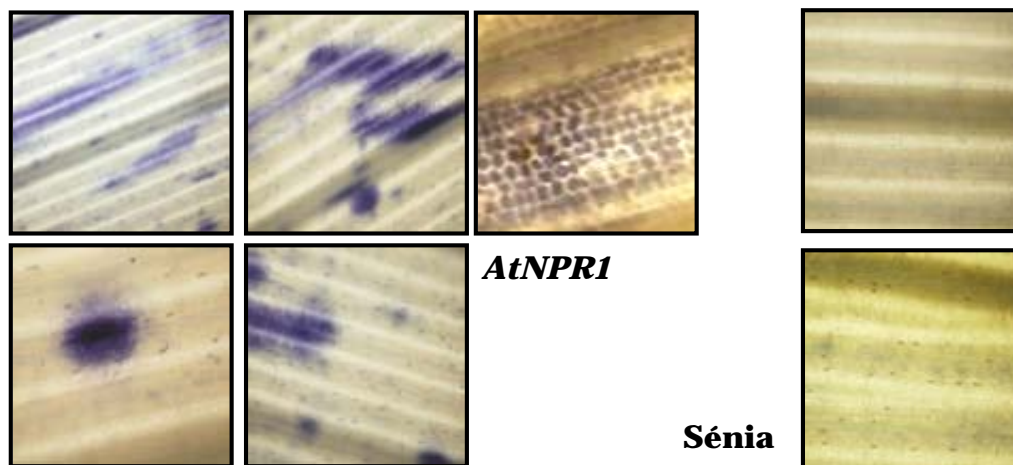


Figura 95. Acumulació de superòxid en fulles de plantes transgèniques d'arròs *AtNPR1*. Les plantes foren crescudes tal i com s'indica a la Figura 94. Les fulles es van sotmetre a tinció amb NBT (veure Apartat 10.1 de Material i Mètodes).

L'acumulació d'autofluorescència és també un marcador cel·lular ben establert observat en la formació de lesions espontànies i durant la resposta HR (Hammond-Kosack i Jones, 1996). Tal i com es mostra a la **Figura 96**, les plantes transgèniques *AtNPR1* crescudes en la cambra de creixement durant 5 dies, mostraven acumulació de material autofluorescent en les parets cel·lulars al voltant de les lesions. Aquesta autofluorescència es va detectar en les cèl·lules foliars de les 5 línies d'arròs *AtNPR1* analitzades en aquest treball (línies 1, 2, 13, 24 i 25). En canvi, no es va detectar autofluorescència en les plantes Sénia crescudes en les cambres de creixement. S'ha vist que l'acumulació d'aquesta autofluorescència no es dona durant la mort cel·lular en resposta a ferida (Mittler, 1995) suggerint que les lesions mediades per *AtNPR1* no són simplement resultat del dany cel·lular, sinó que són resultat d'una activació dels mecanismes de defensa similar al que passa durant la mort cel·lular programada en la resposta HR.

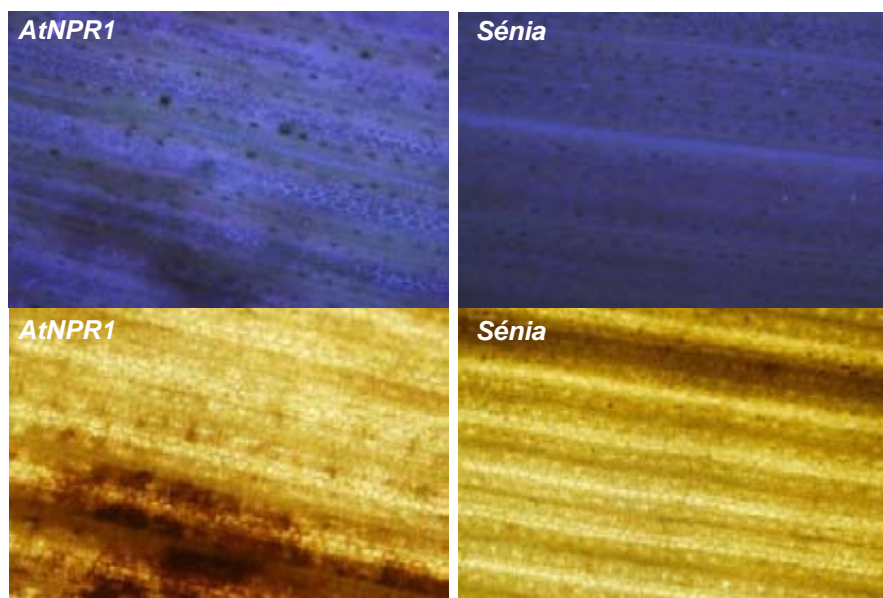


Figura 96. Detecció d'autofluorescència en fulles de plantes *AtNPR1*. Les plantes foren crescudes tal i com s'indica a la Figura 94. L'observació de les fulles es realitzà en un microscopi Axiophot (veure Apartat 10.2 de Material i Mètodes).

L'observació de que les plantes d'arròs *AtNPR1* desenvolupaven lesions espontànies en condicions de creixement subòptimes, ens va portar a analitzar l'expressió de gens de defensa en arròs en aquestes plantes. En aquest sentit, cal comentar que en mutants d'arròs que desenvolupen lesions espontànies, com els mutants *spl* (*spotted leaf 1*) i el *cdr* (*cell death and resistance*), l'expressió dels gens *PR-1* i *PBZ/PR-10* augmenta de manera significativa coincidint amb el desenvolupament de les lesions necròtiques (Midoh i Iwata, 1996; Takahashi *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2004; Agrawal *et al.*, 2000; McGee *et al.*, 2001). Així, es va determinar si la formació de lesions en plantes arròs *AtNPR1* va acompanyada de l'expressió de gens *PRs* endògens. Per aquest motiu, es varen créixer durant 2 setmanes als hivernacles plantes d'arròs *AtNPR1* i de la varietat *Sénia* no transformada. Es tallaren les fulles 1 i 2 d'aquestes plantes, i es disposaren en plaques de quinetina de la mateixa manera que s'explica pels assaigs de fulla tallada amb *M. grisea*, i es van mantenir en la cambra de creixement (baixa intensitat de llum: 6000-8000 lux). Passats 7 dies, les fulles de les plantes *AtNPR1*, però no les fulles de plantes control no transgèniques, havien desenvolupat lesions necròtiques. Es va analitzar mitjançant RT-PCR el patró d'expressió dels gens *PR-1b*, *PR-5*, *PR-10* i *PBZ*, en fulles *AtNPR1* amb lesions visibles, i de fulles de plantes *Sénia* control. Tal i com es mostra a la **Figura 97**, en el material recollit de les línies *AtNPR1* amb lesions, es detecta expressió dels gens *PR-1b*, *PBZ* i *PR-10*, a diferència de les fulles *Sénia* on no es detecta expressió de cap d'aquests gens (**Figura 97 A, B**). L'anàlisi paral·lel de fulles de plantes d'arròs

RESULTATS

AtNPR1 mantingudes en les mateixes condicions però en un estadi en el que encara no s'observava la formació de lesions espontànies no va revelar expressió dels gens PRs sota estudi en aquests teixits (**Figura 97C**).

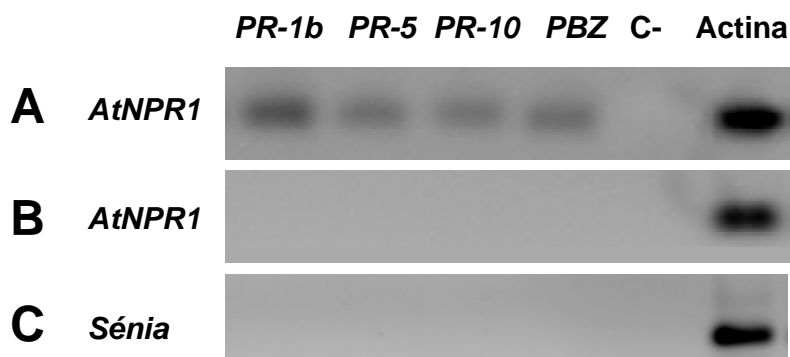


Figura 97. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió dels gens *PR-1b*, *PR-5*, *PR-10* i *PBZ* en fulles de plantes *AtNPR1* amb lesions visibles (A), de plantes *Sénia* no transformades (C) o de plantes *AtNPR1* sense lesions aparents (B). Les plantes foren crescudes tal i com s'indica a la Figura 94. Com a control positiu es mostra l'amplificació de l'actina. El control negatiu (C-) és RNA sense pas de retrotranscripció previ a la PCR.

Aquests resultats indiquen que la formació de lesions espontànies en les fulles de les plantes d'arròs *AtNPR1* mantingudes en condicions de llum subòptimes, va acompanyada d'una expressió de gens de defensa endògens, al menys de l'expressió dels gens *PR-1b*, *PR-5*, *PR-10* i *PBZ*.

II.5 EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DEL GEN *AtNPR1* SOBRE EL CREIXEMENT VEGETATIU I LA PRODUCTIVITAT DE PLANTES D'ARRÒS

Molts dels mutants d'*Arabidopsis* que expressen respostes defensives de manera constitutiva, presenten fenotip nan (Bowling *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1999). Els resultats obtinguts per Cao i col·laboradors (1997) en la sobreexpressió del gen *AtNPR1* en *Arabidopsis*, indicaven que les plantes d'*Arabidopsis* no mostraven canvis fenotípics aparents en el seu creixement (Cao *et al.*, 1997).

Durant el transcurs d'aquest treball, es va decidir estudiar les conseqüències de l'expressió constitutiva del gen *AtNPR1* d'arròs (Sénia) sobre el creixement de les plantes d'arròs *AtNPR1*. Així, durant el creixement en els hivernacles de les diferents línies homozigòtiques *AtNPR1* utilitzades en aquest treball, es varen anar analitzant paràmetres com l'alçada i la producció de gra per planta.

Tal i com es mostra a la **Figura 98** la major part de les línies d'arròs *AtNPR1*, mostraven un creixement menor quan es mantenien sota les mateixes condicions de creixement que les plantes de la varietat control Sénia (hivernacle). En tots els casos eren plantes crescudes a partir de llavors recollides al mateix temps i crescudes en paral·lel a l'hivernacle. Així, a les 3 setmanes de creixement en hivernacle, la reducció en alçada oscil·la entre el 6 % i 42 % depenent de la línia analitzada. Per la línia 27.4, la reducció no va ser tan acusada sent aquesta línia la que mostrava els nivells d'expressió del transgen més baixos (veure **Figura 80**).

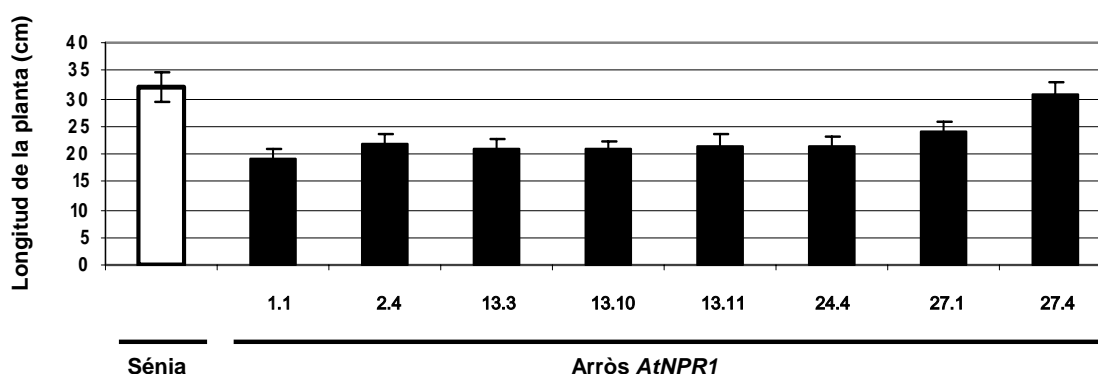


Figura 98. Fenotip (alçada en cm) de diferents línies d'arròs *AtNPR1* i plantes control Sénia, crescudes durant 3 setmanes en hivernacle

Tot i aquest creixement menor de les línies *AtNPR1* d'arròs en comparació amb la varietat Sénia no transformada, el moment de floració sí es presentava sincronitzat en totes les plantes. Per tal d'avaluar la productivitat de les plantes transgèniques *AtNPR1* d'arròs, un cop recollit el gra (espigues) de cada planta. Es van pesar 200 llavors de cada línia transgènica, així com de les plantes Sénia control, crescudes en les mateixes condicions a l'hivernacle. A la **Figura 99** es mostra el pes promig per llavor, de cada línia analitzada. S'observà que el pes de les llavors de les línies *AtNPR1*, fou significativament inferior al de les plantes de la varietat Sénia control no transformada.

RESULTATS

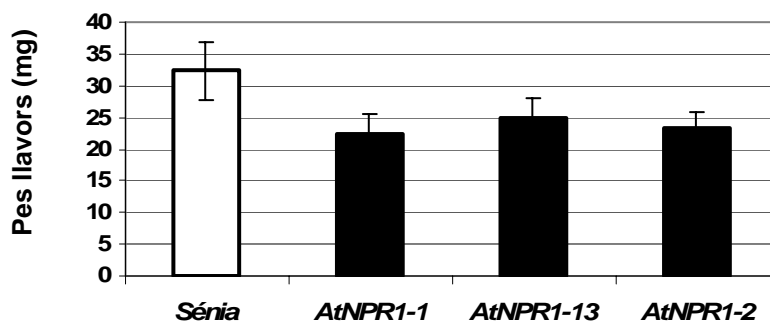


Figura 99. Pes de les llavors de les plantes transgèniques *AtNPR1* i les plantes control Sénia. Es mostra el pes promig calculat a partir del pes de 200 llavors per cada línia

Per altra banda, es va voler avaluar l'efecte del tractament amb fitohormones SA, hormones amb funció reguladora en les respostes de defensa en plantes. Les plantes foren crescudes *in vitro* i tractades amb SA. El primer que s'aprecia és que el creixement amb SA no afecta d'una manera important el creixement de les plantes d'arròs Sénia (**Figura 100**). En créixer les plantes en presència de SA, s'observa una reducció important en el creixement de les plantes transgèniques respecte les plantes control no transformades. Així als 12 dies, les plantes *AtNPR1* mostraven una reducció en l'alçada de fins i tot el 50%, depenent de la línia analitzada.

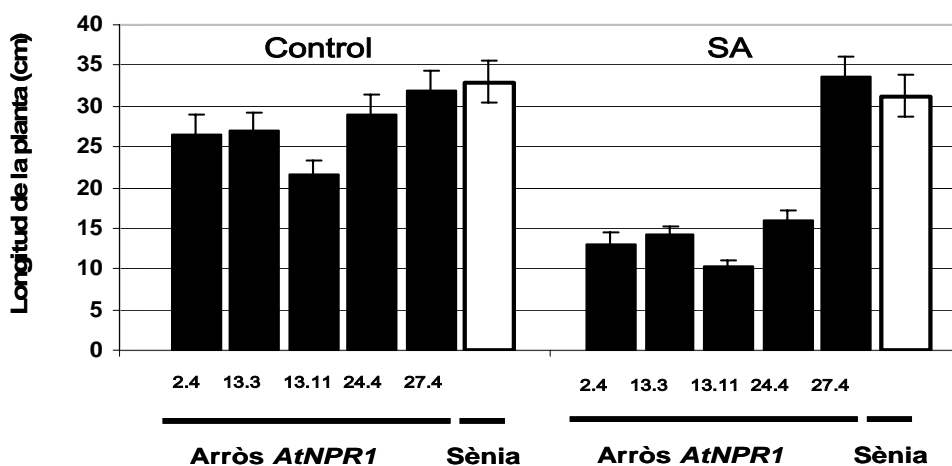


Figura 100. Efecte del tractament amb fitohormones SA sobre el creixement (longitud en cm) de les plantes d'arròs Sénia i les plantes transgèniques *AtNPR1*. Les plantes foren crescudes *in vitro* (medi MS) i tractades amb SA

II.6 EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DEL GEN *AtNPR1* EN PLANTES D'ARRÒS SOBRE LA TOLERÀNCIA A SEQUERA I SALINITAT

Es va examinar, el comportament de les plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *AtNPR1* en situacions d'estrès abiòtic, concretament en situacions d'elevada salinitat i de sequera. Per analitzar la tolerància a aquests estressos es va determinar el percentatge de plantes que aconseguien sobreviure després d'un període de tractament amb diferents concentracions de sal (NaCl) o de sequera (plantes sense rec). Així, en el cas de la sequera, es varen creixer les plantes als hivernacles durant 17 dies, i posteriorment es deixaren sense regar durant 9 dies. Pel que fa a la salinitat, es varen créixer també durant 17 dies, mantenint-les a continuació submergides en una solució amb diferents concentracions de sal (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM i 200 mM de NaCl) durant 5 dies. Un cop finalitzats ambdós tractaments, es varen mantenir les plantes amb rec normal durant dues setmanes, i es va seguir el seu desenvolupament. Les plantes control (Sénia) no transformades es van sotmetre als mateixos tractaments que els plantes transgèniques.

Tal i com es mostra a la **Figura 101** les línies *AtNPR1* presentaven una menor tolerància a la salinitat i sequera. En els assaigs de salinitat, les diferències fenotípiques entre les plantes control i les transgèniques eren ja evidents en les condicions de només 50 mM NaCl.

Amb aquest resultat es pot concloure que l'expressió del gen *AtNPR1* en plantes d'arròs provoca un augment en la susceptibilitat als estressos hídric i salí. Aquest efecte es va observar en totes les línies transgèniques independents analitzades, per tant no pot ser atribuïble a un efecte de lloc d'inserció del transgen o un altre event mutagènic relacionat amb la transgènia.

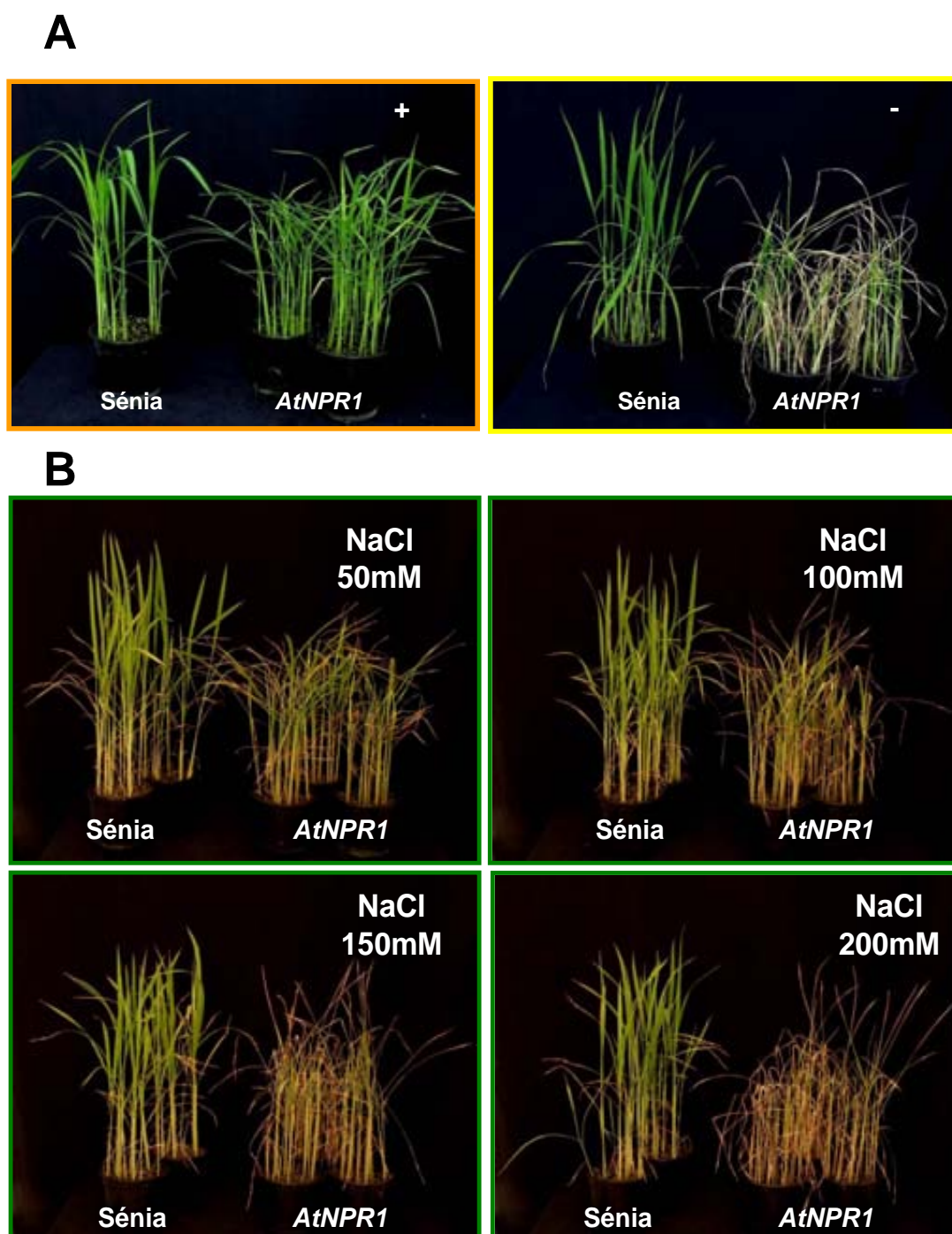


Figura 101. Efecte fenotípic de les plantes *AtNPR1* i plantes control Sénia en resposta a estressos abiòtics. A) Estrès per sequera. Les plantes es varen créixer als hivernacles durant 17 dies, posteriorment es regaren (+) o no (-) durant 9 dies, i finalment es mantingueren amb rec normal durant 2 setmanes més. B) Estrès per salinitat. Les plantes es varen créixer durant 17 dies, mantenint-les a continuació submergides en una solució amb diferents concentracions de sal (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM i 200 mM de NaCl) durant 5 dies, finalment es mantingueren amb rec normal durant 2 setmanes més.

DISCUSIÓ GENERAL

La població mundial actual supera els 6000 milions de persones, i es creu que cap al 2025 aquesta xifra pot augmentar fins els 8500 milions. Aquest fet, portarà a la necessitat de produir més recursos alimentaris per cobrir les necessitats de tota la població mundial. Una de les principals fonts d'alimentació vindrà determinada sens dubte, per l'ús de varietats més eficients i productives dels cultius més importants. Probablement d'entre ells, l'arròs és en importància el principal cultiu per cobrir les necessitats nutricionals més bàsiques a nivell mundial. Històricament, la producció total d'arròs ha augmentat dels 25 milions de tones el 1966 fins als 608 milions de tones el 2004 (www.fao.org/rice2005). Malgrat aquest important augment, i els nombrosos esforços per a la millora de la producció de l'arròs, els costos que es generen per al control de malalties d'aquest cultiu continuen sent enormes.

En general, es calcula que entre un 30-50% de les pèrdues en les collites dels cultius més importants a nivell mundial, són degudes als fitopatògens i als insectes plaga. Així, l'ús de pesticides i fungicides químics, sovint proporciona beneficis baixos en els cultius, donat el alt cost dels tractaments fitosanitaris. A més, alguns d'aquests tractaments químics comporten riscos tant per a la salut humana (tant agricultors com consumidors), com per al medi ambient (aplicació massiva, poca especificitat front l'insecte problema, abocament de residus químics d'alta resistència al medi ambient, contaminació de zones limítrofes i aquífers, ...).

Cal afegir també que, a part dels elevats costos i els problemes ambientals generats per l'ús massiu o repetitiu de pesticides i fungicides químics, en alguns casos la mala aplicació d'aquests pot portar a ràpides resistències per part dels insectes o els fongs, afavorint així la conseqüent dispersió d'algunes d'aquestes plagues i malalties.

Actualment, el principal repte és poder incrementar i mantenir la productivitat dels cultius amb un menor ús d'agents químics. Fins la darrera dècada, s'han desenvolupat varietats resistents a insectes i fongs mitjançant l'aplicació de mètodes convencionals, com poden ser els encreuaments de varietats. Actualment, els avenços observats en el camp de la biologia molecular, han obert noves alternatives principalment en l'ús de la biotecnologia vegetal aplicada a l'obtenció de plantes transgèniques amb noves característiques fenotípiques. Així, els cultius modificats genèticament es presenten com una nova estratègia que pot contribuir als programes de control integrat de plagues i malalties. En concret, la biotecnologia vegetal dirigida a la millora en la resistència contra els insectes plaga, ha estat un dels avenços més importants observats en aquest camp. El 2004, l'àrea global de cultiu transgènic comercial havia arribat a 81 milions d'hectàrees, de les quals, el 28% eren de cultius *Bt* (22,5 milions d'hectàrees) (James, 2005).

DISCUSIÓ

Tot i que alguns autors han hipotetitzat que l'ús de cultius modificats genèticament pot exercir un impacte negatiu sobre la biodiversitat genètica de les espècies agrícoles, cal tenir en compte que l'ús de cultius transgènics resistents a insectes, que expressen transgens codificant proteïnes insecticides específiques, representa una oportunitat per substituir l'ús d'insecticides d'ampli espectre. Per exemple, en el cas de les proteïnes insecticides expressades en cultius *Bt*, com en blat de moro o cotó, aquestes proteïnes mostren una elevada especificitat pel que fa a la seva acció sobre organismes diana. A més, actualment es pot aconseguir que les proteïnes insecticides (tant *Bt*, inhibidors de proteases, lectines...) s'expressin únicament en els teixits d'interès en les plantes transgèniques, minimitzant l'exposició cap a animals que no s'alimenten d'aquests teixits. Així, i considerant l'elevat número d'assaigs de camp que s'estan portant a terme, s'han observat poques o nul·les diferències en l'estructura, tant de la comunitat d'espècies com de les espècies individuals, en els camps de cultius *Bt* en comparació amb camps de cultius convencionals no tractats amb insecticides, i en els casos en què s'han calculat, els índexs de diversitat d'espècies no són significativament diferents entre els camps de cultius *Bt* i els convencionals no tractats (Lozzia 1999; Lozzia *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999; Riddick *et al.*, 2002; Naranjo *et al.*, 2005; Naranjo i Ellsworth, 2005; Fit i Wilson, 2003). Les úniques espècies que s'ha observat que són, d'una manera significativa i consistent, menys abundants en els camps de cultiu *Bt* en comparació als camps convencionals, són les plagues diana i en alguns casos els seus paràsits específics.

Per altra banda, fins a l'actualitat, cap insecte plaga ha desenvolupat resistència en camp front cultius *Bt*. Aquest fet és degut segurament en part, a les bones estratègies de control de plagues emprades fins el moment (Bates *et al.*, 2005). De fet, també és cert que existeix la possibilitat de que la forta pressió de selecció sobre els insectes plaga en presència de *Bt* pugui generar, a mig-llarg termini, poblacions d'insectes resistents. S'ha observat però que alguns insectes han desenvolupat resistència a les proteïnes *Bt* en condicions de laboratori i/o hivernacle (McGaughey 1985; Hama *et al.*, 1992; Gould *et al.*, 1994; Sayyed *et al.*, 2000; Ferré i Van Rie 2002; Kain *et al.*, 2004). Així, cada cop és més evident que cal un ús racionalitzat de cultius transgènics, al mateix temps que noves estratègies pel control de plagues, que siguin complementàries i duradores i no posin en perill els beneficis derivats de l'ús de cultius transgènics. L'ús de plantes que contenen dos o més toxines *Bt* diferents, en lloc d'una única toxina, és una estratègia que redueix potencialment l'aparició de les possibles resistències, ja que implicaria el desenvolupament per part de l'insecte de vàries resistències simultànies. Un dels requeriments d'aquesta estratègia però, és que les diferents toxines emprades tinguin diferents modes d'acció. Tot i que és coneixen una gran quantitat de toxines *Bt* (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), només una petita part s'utilitzen de manera habitual per desenvolupar cultius transgènics en el control de les plagues d'insectes. Els

gens *Bt* més utilitzats són *Cry1Ab* i *Cry1Ac* (Fujimoto *et al.*, 1993; Nayak *et al.*, 1996; Wünn *et al.*, 1996; Ghareyazie *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1998; Alam *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Resultats d'estudis amb vesícules de membrana en intestins d'insectes, indiquen que les toxines *Cry1Aa*, *Cry1Ab* i *Cry1Ac* comparteixen llocs d'unió comuns (Escrive *et al.*, 1997; Ballester *et al.*, 1999; Karim i Dean 2000). Així doncs, deurien utilitzar-se combinacions de gens *Cry1A* amb altres tipus de gens *Bt* per tal de prevenir l'aparició de resistències.

L'expressió de gens que codifiquen proteïnes insecticides d'altres orígens, i amb diferents mecanismes d'acció ja sigui sols o conjuntament amb gens *Bt*, també podria reduir la probabilitat a desenvolupar resistències a aquest tipus de toxines en les poblacions d'insectes plaga. Entre les estratègies alternatives als gens *Bt*, troben alguns gens bacterians, com els que codifiquen toxines de *Photorhabdus*, les quals proporcionen un ampli espectre de resistència front diferents insectes (Chattopadhyay *et al.*, 2005). Una estratègia diferent, es basa amb l'ús de gens d'origen vegetal, com són els inhibidors de proteases i les lectines (Tinjauangjun *et al.*, 2000; Loc *et al.*, 2002; Rahbe *et al.*, 2003). En el cas de les lectines però, la seva aplicabilitat ha estat en els darrers anys posada en dubte, donat que han estat detectats casos de certa toxicitat en mamífers o altres insectes (Down *et al.*, 2000).

Entre aquestes estratègies, l'expressió de gens que codifiquen inhibidors de proteases vegetals, presenta entre d'altres un clar avantatge, donat que aquestes proteïnes es troben de forma natural a l'aliment destinat al consum humà o animal. Així, les plantes transgèniques amb expressió de gens d'origen vegetal es presenten com a una estratègia complementària a les estratègies basades en l'ús de gens *Cry* de *B. thuringiensis*. Si el mecanisme d'acció de les proteïnes *Cry* es basa en el reconeixement per part de receptors específics localitzats en la membrana epitelial digestiva de l'insecte, en el cas dels inhibidors de proteases es tracta d'un efecte sobre el sistema proteolític digestiu dels insectes. En aquest cas, es requereix per tant un temps d'exposició major per part de l'insecte al inhibidor perquè aquest pugui tenir un efecte insecticida. També és cert que l'efecte que els inhibidors de proteases exerceixen, presenta una menor activitat insecticida comparada amb la que s'observa amb les proteïnes *Cry*. En el cas dels inhibidors de proteases, quan són expressats en plantes transgèniques no s'observa una mortalitat de les larves de l'insecte diana tan important com en el cas de les plantes *Bt* (tal i com mostren els resultats obtinguts en aquest treball en els bioassaigs amb *C. suppressalis* en les línies d'arròs que expressen un gen *Cry* de *B. thuringiensis*). L'efecte dels inhibidors de proteases sobre la població d'insectes diana, es produeix a més llarg termini ja que el seu efecte principal resideix en una reducció progressiva de la població: reducció del creixement de les larves acompanyat d'una disminució en la formació de crisàlides. Per intentar millorar les propietats insecticides dels inhibidors de proteases vegetals, el present treball ha centrat el seu

DISCUSIÓ

interès en la cerca d'estratègies per a l'expressió simultània de gens d'inhibidors de proteases, totes elles dirigides a combatre el barrinador de l'arròs, *C. suppressalis*. De fet, una de les principals problemàtiques en la lluita amb pesticides químics contra insectes barrinadors rau en la seva ineficàcia front aquest tipus d'insectes plaga. Així, els agents químics són d'aplicació externa, i els barrinadors en canvi es desenvolupen a l'interior de les tiges, quedant per tant protegits del tractaments químics externs.

Així doncs, el control de plagues a l'agricultura moderna per força ha de passar per una nova "revolució" enfocada cap a la substitució dels pesticides exògens vers unes pràctiques més sostenibles i benignes cap al medi ambient. En aquest sentit, els estudis de camp amb plantes transgèniques, com per exemple els realitzats amb gens insecticides (Breitler *et al.*, 2004, Eizaguirre *et al.*, 2006), són imprescindibles com a part del procés general per crear i utilitzar plantes transgèniques que es puguin desenvolupar de manera sostenible.

Si bé la introducció de gens exògens en plantes per conferir resistència front insectes ha estat un dels majors avenços pel que fa la protecció de cultius, es necessari però, assegurar que el control de plagues d'insectes no està compromès pel desenvolupament de resistències en la població plaga. La nova generació de plantes transgèniques resistents a insectes o fongs han de dissenyar-se de manera que retardin o evitin l'aparició de resistències. L'ús de promotors induïbles, o promotors amb expressió específica de teixit, pot ser de gran ajuda en aquesta direcció.

Aconseguir múltiples resistències en els cultius és un altre dels objectius de l'agricultura biotecnològica. Això es pot aconseguir mitjançant l'explotació de les respostes de defensa induïdes, que "a priori" es podria aconseguir amb l'ús de gens reguladors de la resposta de defensa de les plantes. En aquest treball s'ha expressat el gen *AtNPR1* d'*Arabidopsis* en plantes d'arròs. Els resultats obtinguts en aquest estudi demostren clarament que si es pretén induir les respostes endògenes de una planta com mecanisme de protecció cal aconseguir primer un major coneixement de les complexes vies de regulació de les respostes de defensa de les plantes.

De manera general, cal afegir que tot i que existeix una imatge social negativa dels cultius transgènics, hi ha força aspectes positius que sovint són desconeguts. Així, per exemple, la preservació de la diversitat genètica dels cultius, és actualment una de les necessitats més importants que es porten a terme a partir de diferents programes públics i privats. La biotecnologia, pot ser en aquest sentit una eina de gran valor per la introducció de nous gens (aliens o no) en espècies de cultius en desús. A més, el desenvolupament i introducció de cultius modificats genèticament no representa un risc més gran per la diversitat genètica dels cultius que els programes de millora associats a l'agricultura convencional (agricultura intensiva).

Després de tot, el rendiment general d'una planta, i la quantitat i qualitat del seu producte, és el resultat de milers de gens, i el fons genètic és òbviament més important que un simple transgen.

En línia amb totes aquestes consideracions, a continuació es comenten els resultats obtinguts en el transcurs d'aquest treball primer, en el que es refereix a l'ús de inhibidors de proteases com agents insecticides o antifúngics i després en els avantatges i desavantatges associats a l'expressió del gen regulador *AtNPR1* d'*Arabidopsis* en plantes d'arròs transgèniques.

En el capítol relacionat amb els inhibidors de proteases, anteriorment en el nostre laboratori, s'havia demostrat que del gen *mpi* expressat constitutivament en plantes d'arròs confereix protecció parcial a la planta transgènica front el lepidòpter plaga *Chilo suppressalis* (Vila *et al.*, 2005). Així mateix, en plantes d'arròs que expressen el gen informador *gus* sota control del promotor *mpi*, s'havia comprovat la inductibilitat per ferida del promotor del gen *mpi* (Moreno *et al.*, 2005). Cal afegir que l'anàlisi histoquímic de l'activitat GUS d'aquestes plantes va mostrar també una ràpida i intensa inducció del gen per ferida, no només en fulla sinó també en tija (Vila, 2003). Com a primer punt, es va voler analitzar si les plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* sencer, és a dir el gen sota control de les seves pròpies seqüències reguladores (promotor i terminador), acumulen el seu propi producte gènic, la proteïna MPI en condicions de inducibilitat per ferida. Si bé les plantes discriminen entre la ferida mecànica i el dany produït per insectes herbívors, la informació obtinguda en aquest anàlisi (comparada amb les dades anteriors en plantes que expressen aquest mateix gen de manera constitutiva), era indicativa de la utilitat del promotor *mpi* per a dirigir l'expressió d'un gen fusió de dos inhibidors de proteases (excloent aquí els aspectes relacionats amb l'estabilitat de les proteïnes). S'ha determinat que l'expressió del gen *mpi* induïda per ferida dóna nivells d'acumulació de proteïna MPI comparables amb els aconseguits en plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* de manera constitutiva. Entre elles, les línies transgèniques que expressen la versió curta (*C1mpi*) i la versió llarga (*2Kmpi*) d'aquest promotor, dirigeixen nivells d'acumulació de l'inhibidor MPI similars entre ells, en condicions d'inductibilitat. En el cas però, de la línia *2Kmpi*, existia una inducció més forta donat que en condicions de no inducció per ferida els nivells de MPI són pràcticament indetectables en aquesta línia. Per confirmar si el fragment del promotor 2k mostra una regulació més precisa del gen *mpi* seria necessari analitzar un major número de línies transgèniques independents *2Kmpi*. El promotor del gen *mpi*, pot fer-se servir eventualment per dirigir l'expressió induïble no només de gens d'inhibidors de proteases, sinó també d'altres gens insecticides, com poden ser els gens *Bt*, en plantes transgèniques. En línia

DISCUSIÓ

amb això, estudis del nostre grup han permès descriure que l'expressió del gen *Cry1B* sota control del fragment *CI* protegeix plantes transgèniques d'arròs contra l'atac de *C. suppressalis* (Breitler *et al.*, 2001).

A més, els resultats de l'anàlisi d'immunodetecció en teixits de llavor de línies *CImpi* i *2Kmpi*, mostraren que la proteïna MPI no s'acumula en l'endosperm de les llavors d'arròs. Així, un benefici addicional de l'expressió induïble per ferida del gen *mpi* en plantes transgèniques és, que l'acumulació del transgen no es dona en l'endosperm de la llavor d'arròs, que és la part de la planta destinada al consum humà. Tots els resultats anteriorment comentats, fan del promotor del gen *mpi* un candidat idoni per a l'expressió de gens insecticides per a la millora de la resistència de les plantes davant l'atac per insectes. El patró d'expressió en tija i fulla (Vila *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005), el fan a més especialment adequat per a la lluita contra insectes barrinadors.

Així mateix, en aquest treball s'ha estudiat l'efecte de la ingestió de la proteïna MPI, en ser expressat en línies d'arròs transgèniques, sobre les proteases digestives de les larves de *C. suppressalis*. Com pas previ a aquest estudi, es van portar a terme estudis "in vitro" per caracteritzar el perfil d'activitats proteolítiques digestives tant de *C. suppressalis*, així com d'un altre lepidòpter plaga important, *Spodoptera littoralis*, que ataca una gran varietat de cultius comercialment importants com són el cotó, l'arròs, el blat de moro o llegums. Per tant, mentre que *C. suppressalis* és un insecte especialista o monòfag d'arròs, *Spodoptera littoralis*, és un insecte polífag. Fent servir inhibidors específics dels diferents tipus de proteases, s'ha demostrat que les serina proteases (tripsines, quimotripsines, i menor grau, elastases) són majoritàries en el sistema digestiu d'ambdós lepidòpters (veure **Figura 25**). En menor grau, la sensibilitat dels extractes intestinals de *C. suppressalis* i *S. littoralis* a inhibidors d'altres tipus de proteases, també revelen la presència d'activitats de tipus cisteïna, i de les exopeptidases, carboxipeptidasa i leucina aminopeptidasa. En conjunt, l'activitat proteolítica digestiva determinada per *C. suppressalis* i *S. littoralis* és consistent amb les dades publicades per altres insectes lepidòpters, ja que mostren una activitat proteolítica màxima a pH alcalí (pH 9-11) que està basada principalment en serina proteases (Ortego *et al.*, 1996; Novillo *et al.*, 1997, 1999; De Leo *et al.*, 1998, 2001; Abdeen *et al.*, 2005).

La informació obtinguda sobre el tipus de proteases que participen en el sistema digestiu de *C. suppressalis* va reforçar l'interès en desenvolupar estratègies d'expressió dels inhibidors de proteases MPI i PCI en plantes transgèniques d'arròs. Cal recordar en aquest punt, que el MPI és un inhibidor bifuncional de proteases digestives d'insectes amb una especificitat d'inhibició vers quimotripsines i elastases. L'inhibidor PCI, per la seva part, és un inhibidor de

carboxipeptidases de tipus A i B. Així doncs, els diferents tipus de proteases susceptibles d'inhibició per MPI o PCI es trobaven presents en el sistema digestiu de *C. suppressalis*.

Posteriorment, es va determinar l'efecte de la producció de l'inhibidor MPI per la planta d'arròs sobre les proteases digestives de les larves alimentades en plantes transgèniques. Així, es va observar que l'alimentació de larves de *C. suppressalis* en línies d'arròs *mpi* provoca un increment en la seva activitat proteolítica total del sistema digestiu. A més, fent servir substrats sintètics específics, s'ha determinat que la ingestió de MPI provoca un increment en l'activitat de diferents tipus de proteases digestives de *C. suppressalis*, tant endoproteases com exoproteases. Les activitats de serina (principalment del tipus tripsina) i cisteïna endoproteases, així com les d'exopeptidases leucina aminopeptidases i carboxipeptidases A i B, augmenten significativament quan les larves han estat alimentades en plantes transgèniques. Aquests resultats recolzen la idea de mecanismes reguladors compensatoris induïts en resposta a la ingestió d'inhibidors de proteases en el sistema digestiu d'insectes, i en particular en el cas de la ingestió de MPI en el sistema digestiu de les larves de *C. suppressalis*. La inducció de noves proteases després d'una dieta amb presència d'inhibidors de proteases, és un fenomen que ha estat descrit en diferents estudis (Broadway, 1996; Jongasma i Bolter, 1997; De Leo *et al.*, 1998, 2001). En aquesta línia, altres estudis estableixen que, quan els escarabats "Colorado" de patata eren alimentats amb fulles de plantes transgèniques de patatera amb el gen *oryzacistatina-I* (OCI) o el gen del inhibidor *cathepsin D*, aquests insectes compensaven aquest fet mitjançant un increment en el consum foliar, que anava acompanyat d'una sobreproducció de proteases insensibles al OCI (Cloutier *et al.*, 2000; Brunelle *et al.*, 2004). De manera similar, en un altre treball on s'alimentaven larves de *Spodoptera exigua* amb plantes de tabac transformades amb el gen de l'inhibidor de tripsines d'ordi, demostraven que l'adaptació d'aquest insecte anava acompanyada per una inducció significativa d'activitats del tipus leucina aminopeptidasa i carboxipeptidasa A, mentre que les activitats quimotripsines, elastasa i carboxipeptidasa B, no es veien afectades (Lara *et al.*, 2000). Per altra banda, en assaigs amb *Spodoptera littoralis*, va ser descrit que les noves proteases induïdes a partir de la presència de l'inhibidor de tripsina de mostassa (*mustard trypsin inhibitor*, MTI-2) en altes concentracions, eren també sensibles a aquest inhibidor, sent per tant aquest fet el responsable dels efectes negatius observats en el creixement i la mortalitat de les larves (De Leo *et al.*, 2001). L'increment observat en l'activitat proteolítica digestiva en les larves de *C. suppressalis* alimentades en plantes *mpi* pot reflexar, com a mínim en part, un increment en proteases del tipus serina proteases, elastases i quimotripsines, insensibles al MPI.

Tenint en compte que l'expressió del gen *mpi* en plantes d'arròs resulta en una protecció parcial front a *C. suppressalis*, es va dissenyar una nova estratègia per tal de cercar un augment en el nivell de protecció dintre de la línia de la utilització de gens d'inhibidors de proteases. Per

DISCUSIÓ

aquesta raó, es va iniciar l'estudi amb l'expressió simultània del gen *mpi* de blat de moro juntament amb el gen *pci* de patata (PCI). Així, l'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar l'efecte de l'expressió dels gens *mpi* i *pci* en plantes d'arròs, en ser expressats en una única unitat transcripcional i sota control d'un únic promotor induïble, el promotor del gen *mpi*, sobre la principal plaga d'insectes que afecta als cultius d'arròs, el barrinador de l'arròs (*C. suppressalis*).

Amb aquesta finalitat, es van produir plantes transgèniques de dos varietats d'arròs cultivades a la conca mediterrània (Sénia i Ariete) que són altament susceptibles al barrinador de l'arròs. Com a estratègies per a l'expressió simultània dels gens d'ambdós inhibidors en forma d'una proteïna fusió, es van emprar dues seqüències d'unió entre ambdós gens. En la primera, s'assajà el potencial biotecnològic de la seqüència 2A del virus FMDV. Es tracta d'una seqüència de 16-18 aminoàcids per la qual s'havia descrit prèviament una capacitat d'autoprocessament en el seu extrem C-terminal (Halpin *et al.*, 1999). En la segona, s'ha emprat una seqüència del precursor de la proteïna CryIB de *Bacillus thuringiensis* que es troba entorn al lloc de processament del precursor Cry1B, regió en la que es produeix el processament de la pro-proteïna per generar la proteïna madura activa per tripsines del tracte digestiu del insecte (Honée *et al.*, 1990; Van der Salm *et al.*, 1994). Es tracta per tant, d'una seqüència dissenyada per a processar dos proteïnes d'interès en el tracte digestiu de l'insecte que s'alimenta de la planta transgènica (i no en la pròpia planta com en el cas anterior). La seqüència seleccionada en aquest treball per a actuar com a seqüència d'unió dels dos inhibidors de proteases consta de 28 aminoàcids. En ambdues estratègies, la proteïna PCI es troba a la regió C-terminal de la proteïna fusió, ja que l'extremo C-terminal de la proteïna PCI es fonamental per a la seva activitat inhibidora les carboxipeptidases.

Aquestes estratègies presenten varis avantatges. Primerament, l'expressió del gen fusió es dirigeix amb un únic promotor, evitant la necessitat d'utilitzar dos promotors diferents per dirigir l'expressió de cadascun dels gens, o l'efecte silenciador sovint observat al introduir dos "cassettes" d'expressió amb el mateix promotor. Per aquests motius es va pensar assajar l'expressió d'ambdós inhibidors utilitzant el propi promotor del gen *mpi*. En segon lloc, és d'esperar que generen nivells similars del producte gènic de cadascun dels dos gens, suposant que la proteïna fusió es processa correctament i que l'estabilitat de ambdues proteïnes és similar. Cal dir que en el cas dels inhibidors MPI i PCI, ambdues proteïnes són molt estables i molt resistents a la degradació proteolítica. A més, el procés requereix un temps considerablement menor al que es necessita per introduir dos gens de manera seqüencial.

En general, aconseguir coordinar un nivell alt i estable d'expressió de diferents transgens en plantes, ha estat, i és, sovint una tasca difícil. Aquest fet és degut principalment, a diferents factors que actuen de manera independent en l'expressió de transgens que es troben en loci

diferents, i que poden provocar-ne el seu silenciament per diferents mecanismes. El fet d'unir proteïnes en una mateixa pauta de lectura, com és el cas de les emprades en aquest treball (*mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci*) és una estratègia que utilitzen alguns organismes, com és el cas dels virus, amb la finalitat d'optimitzar la informació continguda en el seu genoma. En el cas de la seqüència d'unió 2A, ja ha estat utilitzada amb èxit en diferents sistemes eucariotes, entre ells en plantes de tabac (Halpin *et al.*, 1999; Ma i Mitra, 2002; El Armani *et al.*, 2004; François *et al.*, 2004). Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que els gens fusió *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci* s'expressen correctament en la planta d'arròs. Els assaigs d'immunodetecció en extractes proteics de fulles d'arròs transgèniques, han permès determinar que les proteïnes fusió MPI-2A-PCI i MPI-C-PCI s'acumulen després d'inducció per ferida en aquests teixits. El patró de processament però, es mostra tal i com era d'esperar diferent en els dos casos. Així, mentre que la proteïna fusió MPI-C-PCI es manté en forma de poliproteïna en el teixit foliar d'arròs, la proteïna fusió MPI-2A-PCI es presenta parcialment processada. En la línia 38.1, aproximadament un 35% de la proteïna MPI-2A-PCI que s'extrau de les fulles de plantes d'arròs transgèniques es recupera sense processar. Les raons per les quals la proteïna MPI-2A-PCI es processa només parcialment resten encara per determinar.

Les plantes transgèniques que expressen un gen fusió *mpi-pci*, han estat avaluades pel que fa el seu efecte sobre el creixement de les larves de *C. suppressalis*. S'han realitzat bioassaigs on les larves de *C. suppressalis* eren alimentades en línies d'arròs transgèniques. Les línies transgèniques utilitzades en els bioassaigs foren originalment seleccionades en funció del nivell d'expressió del transgen en condicions d'inductivitat per ferida mecànica (veure **Figura 41**). D'aquesta manera es van seleccionar línies amb diferents nivells d'expressió. No obstant, els anàlisis d'expressió realitzats sobre aquestes línies en els bioassaigs, mostraven una expressió generalitzada i sense grans diferències d'expressió entre les diferents línies transgèniques (veure **Figura 46**). Aquesta observació recolza la idea de que la planta discrimina entre ferida mecànica i atac per insectes fitòfags, i reacciona front aquests estímuls amb respostes adequades a cadascun d'ells. En situació d'herbivoria, la larva exerceix un estímulo continuat mentre s'està alimentant de la planta, i per tant és més perllongat que en el cas de la ferida mecànica. Això pot afavorir la inducció de l'expressió del transgen tant a nivell local com sistèmic. A més, tot i que és un aspecte que no s'ha estudiat en *C. suppressalis*, es coneix que en la saliva de *S. littoralis* (Reymond *et al.*, 2004) es troben components que poden també afectar a la resposta de la planta. Tot i que en aquest sentit, seria realment negatiu per l'insecte estimular l'expressió de gens insecticides per part de la planta, potser en el procés de coevolució planta-insecte, les plantes han adquirit aquest tipus de resposta en el seu propi benefici.

Els resultats obtinguts amb *C. suppressalis* mostraren que catorze dies després de la infestació, les larves recuperades de les diferents línies transgèniques presentaven una reducció

DISCUSIÓ

significativa del seu pes (**Figura 50 i Taula X**), indicant que l'expressió simultània d'ambdós inhibidors en les línies transgèniques té un important efecte anti-nutricional i afecta negativament el creixement de les larves de *C. suppressalis*. Cal destacar que en general, aquest efecte negatiu en les larves de *C. suppressalis* ha estat més fort en aquelles que han estat alimentades en plantes d'arròs *mpi-C-pci*, que en les larves alimentades en plantes MPI-2A-PCI, indicant que probablement l'estratègia de processament de la proteïna fusió en l'insecte resulta ser més eficaç. Tenint en compte els efectes observats en les larves, es pot postular que la proteïna fusió ha pogut ser eficientment processada en el tracte digestiu de les larves de *C. suppressalis*. La confirmació definitiva d'aquest aspecte requereix no obstant, realitzar estudis per comprovar la presència d'ambdues proteïnes MPI i PCI en el sistema digestiu de les larves (estudis en curs). L'observació de que la proteïna fusió MPI-2A-PCI es processa parcialment en la planta d'arròs també podria explicar que aquesta estratègia resulti en un menor efecte en el creixement de les larves.

En el cas de les plantes *mpi-2A-pci* i *mpi-C-pci*, la utilització del promotor induïble del gen *mpi* permet aconseguir nivells d'expressió del transgen suficients com per conferir protecció a la planta. A partir dels anàlisis mitjançant immunotransferència amb l'anticòs anti-MPI dels extractes proteics que provenen de les plantes *mpi-2A-pci*, es va poder estimar que el nivell d'acumulació de la fracció corresponent a la proteïna MPI processada a partir de la proteïna fusió es troba entre el 0,10% i el 0,25% del total de proteïnes solubilitzades. Es tracta per tant d'uns nivells d'acumulació inferiors als que es poden trobar en plantes que expressen el gen *mpi* de manera induïble (plantes *2Kmpi*, **Figura 33, carril 10**) on es detectava una acumulació de MPI del 0,5% del total de proteïnes solubilitzades.

Per una altra part, en aquest treball no s'ha pogut detectar, i per tant tampoc quantificar, el nivell d'acumulació de proteïna PCI que prové del processament de la proteïna fusió en les plantes transgèniques *mpi-2A-pci*. En aquest respecte, cal comentar que es van realitzar diverses immunitzacions, tant de conill com de gallina, per tal de disposar d'anticossos policlonals contra la proteïna PCI. Mitjançant immunotransferència de membranes en les que s'havien inclòs rectes de calibratge amb quantitats variables de proteïna PCI pura, es va aconseguir detectar proteïna PCI únicament en quantitats analitzades de 5-10 µg de proteïna. Aquesta sensibilitat tan baixa, deguda bé a que el PCI es una proteïna poc immunogènica o bé a que aquesta proteïna es transfereix/fixa de una manera poc eficient a la membrana en el procés d'immunotransferència, explicaria els resultats negatius obtinguts en l'anàlisi mitjançant immunotransferència amb l'anticòs anti-MPI dels extractes proteics obtinguts de les fulles de plantes d'arròs *mpi-2A-pci*. Tampoc es va poder determinar mitjançant immunotransferència el nivell d'acumulació de la proteïna PCI en les plantes d'arròs que expressen de manera individual

el gen *pci*, si bé en aquest cas es va obtenir una estimació del nivell de proteïna funcional acumulada *in planta* en base a la seva activitat inhibidora de la carboxipeptidasa A bovina.

En qualsevol cas, l'eficàcia de l'estratègia d'expressió d'un gen fusió de dos inhibidors de proteases ve determinada per l'efecte combinat d'ambdós inhibidors contra les proteases digestives de l'insecte diana. En aquest sentit, cal tenir en compte que l'eficàcia d'un inhibidor de proteases expressat en plantes depèn no només del seu nivell d'acumulació sinó també del seu mode d'acció, és a dir, de la seva especificitat d'inhibició d'un tipus o un altre de proteasa digestiva de l'insecte. Cal dir que tant el MPI com el PCI són inhibidors bifuncionals, podent inhibir eficientment proteases d'insectes de tipus elastasa o quimotripsina en el cas del primer, o carboxipeptidases A i B en el cas del segon. L'efectivitat d'aquests dos inhibidors per tant, recau en la seva habilitat per inhibir simultàniament fins a 4 tipus diferents de proteases intestinals de l'insecte, sense necessitar alts nivells d'acumulació de cada inhibidor per aconseguir l'efecte protector en les plantes transgèniques. Serà així mateix interessant, estudiar si la proteïna fusió, bé la proteïna MPI-2A-PCI o bé la proteïna MPI-C-PCI té activitat inhibidora per a les proteases contra les que actuen cadascun dels seus components, l'inhibidor MPI i l'inhibidor PCI, en definitiva, si la proteïna fusió es comporta com un inhibidor multifuncional.

Per altra part, els estudis d'expressió per *Northern-blot* de les diferents línies transgèniques que expressen un gen fusió mostraren que, en general, es poden trobar línies que acumulen transcrits del transgen a nivells més elevats entre les plantes *mpi-C-pci* que entre les línies *mpi-2A-pci* (anàlisi de RNAs d'una selecció de línies *mpi-C-pci* i *mpi-2A-pci* separats electroforèticament, transferits a una única membrana, i hibridats amb una mateixa sonda, resultats no mostrats). D'acord amb això, els nivells de proteïna fusió MPI-C-PCI estimats en l'anàlisi d'extractes proteics mitjançant immunotransferència també van ser, en general, superiors als trobats per la proteïna fusió MPI-2A-PCI (tenint en compte la proporció de la proteïna fusió que era processada). Podria pensar-se doncs, que bé el transgen *mpi-C-pci* s'expressa de manera més eficient, o bé que els transcrits *mpi-C-pci* són més estables que els transcrits *mpi-2A-pci* en la cèl·lula vegetal. En qualsevol cas, els altres elements del *cassette* d'expressió d'ambdós gens fusió, promotor i terminador, eren idèntics. Aquests aspectes queden pendents per d'aclarir.

Apart de les consideracions anteriors relacionades bé amb el nivell d'expressió de cada transgen, *mpi-2A-pci* o *mpi-C-pci*, bé amb el nivell d'acumulació dels seus respectius productes gènics, els resultats obtinguts en els bioassaigs amb les plantes transgèniques demostren que, independentment de l'estratègia utilitzada, l'expressió d'un gen fusió confereix resistència a les plantes front a la infestació per *C. suppressalis* (**Figura 51**).

DISCUSIÓ

En el transcurs d'aquest treball, va resultar interessant determinar també els efectes de la ingestió de PCI sobre el creixement de larves d'insectes plaga, per tal de completar així l'estudi realitzat amb les plantes *mpi* i amb les plantes *mpi-pci*. Primerament, es determinà, que la proteïna PCI inhibeix les activitats carboxipeptidases presents en els extractes intestinals obtinguts d'aquests dos lepidòpters, recolzant la presència de carboxipeptidases actives susceptibles de inhibició per PCI en els intestins d'aquests dos insectes. En la literatura, els estudis sobre les proteases digestives dels insectes s'han centrat principalment en les activitats endoproteases (tripsina i quimotripsina). Se sap que la inhibició de proteases digestives per part d'inhibidors d'endoproteases de plantes, provoca deficiències aminoacídiques, i conseqüentment retard en el desenvolupament o mortalitat. Però, hi ha molt pocs estudis que es centrin en l'efecte dels inhibidors de carboxipeptidases de plantes sobre les carboxipeptidases d'insectes. A més de les endoproteases, les carboxipeptidases juguen un important paper en la digestió de proteïnes, ja que els pèptids i proteïnes s'han de convertir en aminoàcids simples per tal de ser aprofitats en la digestió. Històricament, l'activitat carboxipeptidasa es va detectar originàriament en extractes intestinals de larves d'insectes lepidòpters i coleòpters (Ferreira *et al.*, 1990, 1994). També s'ha descrit la caracterització molecular d'aquests enzims a partir de la identificació dels seus cDNAs (Bown *et al.*, 1997; Bown i Gatehouse, 2004; Ote *et al.*, 2005). Igualment s'ha descrit la caracterització bioquímica, les propietats funcionals, així com també l'estructura cristal·logràfica de metal·locarboxipeptidases A i B, o dels seus proenzims corresponents, en els insectes lepidòpters *Helicoverpa armigera* i *H. zea* (Estébanez-Perpina *et al.*, 2001). Així, les carboxipeptidases identificades en els intestins d'insectes són membres de la superfamília A/B de carboxipeptidases digestives.

Els resultats obtinguts en els bioassaigs amb *C. suppressalis* i *S. littoralis* revelen que, mentre que l'expressió bé del gen fusió *mpi-pci*, bé del gen *mpi* expressat de manera individual, resulta en un retard del creixement de les larves alimentades en plantes, en expressar de manera individual el gen *pci* s'observa l'efecte contrari. Així, el pes observat en les larves d'insectes lepidòpters *C. suppressalis* i *S. littoralis* alimentades en plantes d'arròs *pci*, era significativament major que el pes que aconseguixen les larves alimentades en plantes d'arròs control no transgèniques durant el mateix període de temps. En el cas de *S. littoralis* aquest va acompanyat d'un major consum foliar i en última instància, d'un dany més sever a la planta.

L'efecte d'increment de pes de les larves alimentades en fulles de plantes transgèniques que expressen un inhibidor de proteases ha estat prèviament descrit. En aquest sentit, es coneix que el lepidòpter *Thysanoplusia orichalcea* mostra un augment en el seu creixement al ser alimentat amb plantes de tabac que expressen un inhibidor de quimotripsines (McManun *et al.*, 1994). En un altre estudi, va ser demostrat que el coleòpter *Psylliodes chrysocephala* presentava un

augment de pes significatiu en ser alimentat en plantes de colza que expressaven l'inhibidor de cisteïna proteasa OCI (Girard *et al.*, 1998).

En altres estudis, s'ha descrit que un factor determinant en el fenotip de les larves és el nivell d'acumulació de l'inhibidor present en el teixit foliar (De Leo *et al.*, 2001; Abdeen *et al.*, 2005). Així, es podria parlar d'un llinar determinat pel nivell d'expressió de l'inhibidor de proteases, el qual portaria efectes nocius si no és superat mitjançant la producció de noves proteases digestives. En un estudi més recent, s'ha caracteritzat l'efecte de l'expressió combinada de dos inhibidors de proteases de patata, com són l'inhibidor de tripsines/quimotripsines PI-II i el propi PCI emprat en aquest treball, en plantes transgèniques de tomàquet, les quals foren testades front dos dels principals lepidòpters plaga d'aquest cultiu, *Heliothis obsoleta* i *Liriomyza trifolii* (Abdeen *et al.*, 2005). Els resultats obtinguts en aquest estudi demostraren que la sobreexpressió d'aquests dos inhibidors proporcionava resistència davant aquests dos insectes. De manera interessant però, en aquest estudi va ser demostrat que, les línies heterozigòtiques amb un nivell baix d'acumulació dels inhibidors, causaven un efecte contrari sobre les mateixes larves, provocant un augment de pes acompanyat d'un major consum foliar. En el present treball, s'han analitzat línies transgèniques d'arròs *pci* amb diferents nivells d'expressió del transgen, observant-se resultats similars en totes elles, el que suggereix que l'efecte observat seria més aviat conseqüència del mode d'acció de l'inhibidor PCI més que pel nivell d'acumulació de PCI en la planta transgènica.

Els resultats obtinguts en relació als nivells d'acumulació de PCI en les diferents línies transgèniques d'arròs, en base a l'activitat inhibidora de la carboxipeptidasa A bovina, indiquen que aquests nivells oscil·len entre el 0,25% i el 0,55% de les proteïnes totals solubilitzades (resultats obtinguts per les línies que presentaven una menor i una major activitat inhibidora de CPA, respectivament). Aquests nivells d'acumulació són similars als observats en altres estudis en els que s'expressen inhibidors de proteases en plantes transgèniques (Hilder *et al.*, 1987; Mcmanus *et al.*, 1994; Lepté *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997; Vila, 2003; Abdeen *et al.*, 2005). Nivells d'acumulació comparables es troben també en plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* (Vila *et al.*, 2005, i **Figura 33**). En tots els casos, i a diferència del que s'observa en les plantes d'arròs *pci*, es va demostrar un efecte de reducció en el pes de les larves alimentades en les plantes transgèniques. Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquestes diferents respostes estan possiblement relacionats amb els canvis observats en el perfil proteolític del tracte digestiu de *C. suppressalis* com a conseqüència de l'efecte del transgen. Els mecanismes específics pels quals es produeix un augment en la producció de proteases, i en molts casos també en l'increment en el consum per part de l'insecte, no han estat fins al moment totalment establertes. En uns primers estudis, es va observar la sobreproducció de proteases associada a la reducció de pes en insectes alimentats en dietes

DISCUSIÓ

artificials complementades amb inhibidors de proteases (Jongsma i Bolter, 1997). Aquest efecte deleteri causat pels inhibidors de proteases està relacionat amb la sobreproducció de proteases degut a un intent per part de l'insecte per compensar la inhibició proteolítica soferta, la qual porta a una manca d'alguns aminoàcids essencials. Aquest mecanisme compensatori podria explicar els resultats obtinguts en les plantes transgèniques d'arròs PCI. Així, l'augment en la superfície consumida per les larves de *S. littoralis* en les línies *pci* podria ser conseqüència d'una disminució en la qualitat de la dieta, deguda a la presència de l'inhibidor i/o l'augment en la capacitat proteolítica de la larva, provocada per la presència de l'inhibidor. D'aquesta manera, l'augment en la capacitat proteolítica podria contrarestar l'efecte de l'inhibidor, com a mínim en part. En qualsevol cas, l'aparent efecte en el guany de pes de les larves alimentades en les plantes transgèniques suggereix un mecanisme adaptatiu induït per la proteïna PCI, per tal de compensar l'efecte del inhibidor en el sistema digestiu. Així, a diferència de l'efecte observat en el cas de l'inhibidor MPI sobre *C. suppressalis*, les larves d'aquest insectes podrien ser capaces d'adaptar-se a la presència del PCI reemplaçant les carboxipeptidases inhibides per d'altres insensibles al PCI, desenvolupant-se millor que les larves alimentades en plantes control. Seran necessaris però, més estudis per tal de determinar la naturalesa bioquímica i funció de les carboxipeptidases digestives de *C. suppressalis* i *Spodoptera littoralis* sensibles a la inhibició per PCI.

En general, per a la interpretació dels resultats obtinguts en aquest treball pel que fa l'efecte dels inhibidors de proteases, cal tenir en compte que, tal i com s'ha comentat abans, *C. suppressalis* és un insecte fitòfag especialista d'arròs. Aquest fet, implica que aquest lepidòpter i l'arròs han co-evolucionat durant centenars d'anys, de manera que *C. suppressalis* ha anat adaptant el seu conjunt de proteases digestives per obtenir el màxim benefici nutricional dels teixits de la planta d'arròs. Aquest fet, ajuda a entendre que, tot i que el sistema proteolític de *C. suppressalis* reacciona a la ingestió d'un inhibidor de proteases, tant de MPI com de MPI+PCI incrementant el seu conjunt d'enzims proteolítics digestius, això no és suficient per evitar efectes deleteris en el creixement larvari sota la l'acció del inhibidor. Presumiblement, els inhibidors interfereixen amb el sistema proteolític digestiu de *C. suppressalis* reduint la seva habilitat per digerir l'aliment, fent així que els teixits de les plantes d'arròs *mpi-pci* siguin pitjor font nutritiva per les larves, que no pas els teixits de plantes d'arròs control no transformades.

Un dels objectius a llarg termini és el desenvolupament de noves estratègies per a la millora de la qualitat de l'arròs mitjançant la transformació genètica, fent servir una aproximació on diferents gens insecticides, amb diferents modes d'acció, siguin produïts en plantes d'arròs per protegir-les contra el barrinador de l'arròs. En arròs, s'han obtingut ja plantes transgèniques

que expressen de manera constitutiva gens *Bt* i que presenten resistència front *C. suppressalis*, per les varietats *japonica* i *indica* (Bano-Maqbool *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Breitler *et al.*, 2001; Khanna i Raina, 2002; Breitler *et al.* 2004). Tal i com s'ha comentat anteriorment, un problema associat a l'ús extensiu de plantes transgèniques *Bt* resistents a insectes, és la possible generació de resistències en les poblacions plaga (Ferrè i Van Rie, 2002). Així, en el cas de l'ús combinat de dos gens *Cry*, és necessari que aquests tinguin modes d'acció diferents (diferents receptors) per tal de potenciar un efecte sinèrgic i minimitzar la possibilitat d'adaptacions per part dels insectes. Donat que el mode d'acció de les toxines *Cry1Aa* i *Cry1B* és diferent en aquest treball s'ha volgut avaluar l'efecte de l'expressió conjunta d'aquests dos gens *Bt* front el lepidòpter *Chilo suppressalis*. Els resultats obtinguts en els bioassaigs realitzats amb les plantes obtingudes per creuaments que expressen *Cry1Aa* i *Cry1B* (assaigs realitzats en paral·lel a les línies *mpi-pci*) permeten predir nivells de protecció lleugerament més efectius comparats amb les línies d'expressió única d'ambdós gens, a jutjar pel percentatge de recuperació i mortalitat de larves trobades després de 15 dies de ser alimentades en les línies *Cry* (**Figura 56**). Tot i que caldria avaluar de forma més completa aquests resultats, determinant el nivell d'acumulació de cadascuna de les proteïnes *Cry* acumulades en cada línia transgènica. En general aquests resultats demostren que l'ús d'aquest tipus de proteïnes insecticides, les proteïnes *Cry* de *B. Thuringiensis*, resulta en un efecte dràsticament més fort sobre les larves de *C. suppressalis* que l'ús dels inhibidors de proteases.

Per altra banda, s'han proposat diferents estratègies per tal de retardar o prevenir la aparició de resistències a les proteïnes *Cry* en poblacions d'insectes, incloent l'ús de refugis, l'ús de proteïnes insecticides menys eficients i/o complementàries (com els inhibidors de proteases), i la producció de las proteïnes *Cry* restringida a certs teixits de les plantes (fent servir promotors específics de teixit) o als teixits susceptibles de ser atacats pels insectes (fent servir promotors induïbles) (Brattsten 1991; Datta *et al.*, 1998; Breitler *et al.*, 2001). A més d'aprendre més sobre com es refinan les estratègies de resistència de les plantes *Bt* disponibles, és també important desenvolupar altres estratègies per implementar en un futur pròxim la protecció de l'arròs front plagues d'insectes. El mecanisme d'acció dels inhibidors de proteases és clarament diferent al de les proteïnes *Bt*. Les δ -endotoxines són proteïnes que formen porus a les membranes de les cèl·lules epitelials intestinals, provocant lisi i mort cel·lular (Whalen i Wingerd, 2003). Així, poques molècules de δ -endotoxines poden ser suficients per afectar la integritat osmòtica de les cèl·lules epitelials. En contra, la unió dels inhibidors de proteases a les seves proteases diana no provoca directament mort cel·lular, i els fluids intestinals són una font de múltiples llocs d'unió als inhibidors de proteases. Conseqüentment, és necessària una major quantitat d'aquest tipus de proteïnes (inhibidors de proteases) o una llarga exposició crònica a les mateixes, perquè es puguin manifestar les propietats insecticides. Tot i que l'expressió transgènica en plantes

DISCUSIÓ

d'inhibidors de proteases té una activitat insecticida menor que els transgens *Bt*, no provoquen pressió evolutiva tan alta sobre la població d'insectes en comparar-la amb altres aproximacions de control de plagues, incloses les toxines *Bt*. A més, donat que els inhibidors de proteases són un component comú dels aliments derivats de plantes utilitzades pel consum humà i animal, la introducció de gens de inhibidors de proteases en espècies cultivables pot ser considerada com a una estratègia pel control d'insectes més fàcilment acceptada per la societat actual.

Junts, els resultats presentats en aquesta part del treball, suggereixen que l'arròs *mpi-pci* pot ser considerat com a una alternativa útil i complementària a l'ús d'altres gens insecticides per protegir les plantes front el barrinador de l'arròs (*C. suppressalis*), minimitzant així la possibilitat que la població d'insectes desenvolupi resistències. L'expressió d'altres inhibidors de proteases en arròs, concretament de dos inhibidors de tripsina, han demostrat conferir resistència a *C. suppressalis* (Xu *et al.*, 1996; Mochizuki *et al.*, 1999). Fent servir dos gens insecticides amb diferent mode d'acció sobre la mateixa plaga i en la mateixa planta, com són els gens *Bt* i els inhibidors de proteases, o fent servir combinacions de gens de inhibidors de proteases amb diferent especificitat d'inhibició front diferents tipus de proteases digestives, junt amb l'ús d'estratègies de rotació de cultius, es pot aconseguir que la probabilitat de que la població de *C. suppressalis* desenvolupi resistències o adaptacions, es redueixi substancialment. Donat que les dues varietats d'arròs utilitzades en aquest treball per a la seva transformació, són importants cultivars mediterranis (Sénia i Ariete), les línies homozigòtiques estables poden incorporar-se dins d'un programa de millora per produir nous cultivars més resistents d'arròs. En aquest treball s'ha demostrat també, que el desenvolupament de noves estratègies pel control d'insectes plaga mitjançant l'ús d'inhibidors de proteases exigeix un estudi individualitzat de cada transgen i cada insecte problema. Així, els resultats aquí mostrats en relació a l'expressió individual del gen *pci* en plantes d'arròs indiquen que aquest inhibidor, en lloc de conferir resistència front el barrinador de l'arròs *C. suppressalis*, resulta en efectes adversos no desitjats. D'aquí la importància de portar a terme estudis cas per cas en aquest tema.

Per altra banda, en la literatura es troben exemples de la inducció de l'expressió d'alguns inhibidors de proteases vegetals en teixits que es troben infectats per patògens. Aquest fet, ha estat descrit per exemple pels inhibidors de tripsina i quimotripsina en tomaquera i patatera, en ambdós casos infectades amb l'oomicet *P. infestans* (Peng, 1996; Valueva, 1998, 2003), i per l'inhibidor cistatina en meló infectat amb *Colletotrichum lagenarium* (Roby, 1987). En monocotiledònies, també s'ha descrit en algun cas la inducció de l'expressió de gens que codifiquen per inhibidors de proteases per infecció per microorganismes patògens. Així, en el nostre laboratori, es va demostrar que blat de moro germinat en presència del fong patògen *F.*

verticillioides induïa l'inhibidor de serina proteases MPI, tot i que, probablement en aquest cas, la inducció observada per l'atac d'aquest patògen, es deguda a les ferides causades en el procés d'invasió i colonització del teixit més que a un reconeixement molecular del patògen (Cordero *et al.*, 1994) .

En altres estudis, s'ha descrit una activitat antifúngica *in vitro* per part d'inhibidors de proteases, majoritàriament d'endoproteases (Benken, 1976; Chen, 1999; Dunaevsky, 1996; Valueva, 1998, 2003), un inhibidor d'una cisteïna proteasa (Pernas, 1999) i un inhibidor d'una aspàrtic proteasa (Christeller, 1998), quedant encara per elucidar, en tots els casos, el mecanisme concret d'acció. Aquest treball proporciona, per primera vegada, evidències de que l'inhibidor de carboxiproteases de patata (PCI), presenta activitat antifúngica tant *in vivo* com *in vitro*.

Inicialment es va demostrar, que la proteïna PCI purificada exhibia una significativa activitat antifúngica *in vitro* davant el fong *M. grisea*, causant de la pirculariosi o cremat de l'arròs, la malaltia fúngica més important d'aquest cultiu arreu del món. L'obtenció de varietats d'arròs resistents a aquest patògen és habitualment complicada, no només per l'elevada variabilitat patogènica de *M. grisea*, sinó també pel gran nombre de "races" trobades en les poblacions de camp d'aquest fong. Les plantes transgèniques d'arròs que expressen el gen *pci* presenten un elevat grau de resistència front els fitopatògens fúngics *M. grisea* i *Fusarium verticillioides* (conegut també com *F. moniliforme Sheldon*) (Seifert, 2003), és l'agent causant de la malaltia de l'arròs coneguda com a "*Bakanae*" (Webster i Gunnell, 1992), capaç d'afectar greument el desenvolupament de la llavor i la plàntula. Aquest patògen no només provoca una reducció en la quantitat de gra produït per la planta, sinó també en la qualitat de l'arròs, degut a la producció de les toxines anomenades fumonisines, que poden afectar la salut humana i animal (Nelson *et al.*, 1993). Aquest dos fongs, *M. grisea* i *F. verticillioides*, poden arribar a causar també malalties en altres cultius de cereals, i es coneix que l'ús repetitiu i prolongat d'agents agroquímics per al seu control porta sovint a nombrosos inconvenients. Entre aquests cal assenyalar la pèrdua d'especificitat, l'augment en la incidència d'aparició de resistències al tractament, i per sobre de tots l'impacte nociu en el medi ambient, i en últim terme, en la salut humana. Així doncs, una de les contribucions destacades en aquest treball sorgeix de l'efecte antifúngic descrit pel PCI expressat en plantes d'arròs, augmentant la resistència d'aquestes plantes front patògens fúngics, però tal i com s'ha comentat anteriorment, incrementant per contra la sensibilitat davant l'atac d'insectes herbívors.

Per tal de caracteritzar en major detall el mecanisme pel qual exerceix la seva activitat antifúngica front *M. grisea*, i mitjançant l'ús d'una columna d'afinitat amb la proteïna PCI unida, va poder ser purificada una carboxipeptidasa del fong *M. grisea*. Un cop obtinguda, es va

DISCUSIÓ

identificar, per espectrometria de masses, com a una metal·locarboxipeptidasa que havia estat anotada en les bases de dades que provenen del programa de seqüenciació del genoma de *M. grisea* (Nº Acc.: XP359930) (Dean *et al.*, 2005). Els motius característics d'aquest tipus de proteases, així com els residus crítics per a la unió del substrat o mecanisme catalític de la carboxipeptidasa, es troben presents i altament conservats en aquesta proteïna de *M. grisea*. Cal afegir a més, que els assaig d'activitat proteolítica duts a terme amb la proteïna purificada de *M. grisea*, demostren que aquesta és capaç d'hidrolitzar substrats específics d'activitat del tipus carboxipeptidasa B (CPB). A més, aquesta activitat proteasa, es veu completament inhibida per el propi PCI *in vitro*. Les propietats inhibidores del PCI davant la MgCPB donarien suport a la idea que el PCI exerceix la seva capacitat antifúngica per mitjà de la inhibició de MgCPB.

En altres estudis, s'han descrit proteases fúngiques extracel·lulars involucrades en el procés de patogenicitat. Les seves funcions poden ser molt diverses incloent la participació en la penetració del microorganisme en la planta, la inactivació de proteïnes defensives de l'hoste o la transformació/activació de proteïnes pròpies del patogen. Així, s'han descrit proteases capaces d'hidrolitzar glicoproteïnes de la matriu extracel·lular (Dow, 1998) o de la paret cel·lular (Carlile, 2000). Per altra banda, proteases trobades en altres patògens poden estar implicades en la degradació de proteïnes relacionades amb defensa (PRs), com per exemple quitinases i β -1-3 glucanases (Alexander, 1994), lectines (Heilbronn, 1995) o extensines (Dey 1997). Aparentment, les proteases dels microorganismes fitopatògens, també poden realitzar altres funcions i afectar altres processos en la planta hoste. Per exemple, la metal·loproteasa extracel·lular del bacteri *E. chrysanthemi* catalitza la conversió de la pectat liasa, de la forma precursora fins la forma madura d'aquest enzim, sent la seva activitat crucial per la maceració del teixit vegetal (Schevchic, 1998). Els resultats obtinguts en aquest treball, indicarien que en el cas de la CPB de *M. grisea* susceptible a inhibició pel PCI, la seva funció no estaria directament relacionada amb la patogenicitat del fong, donat que l'acció antifúngica exercida per l'inhibidor es dona tant en condicions *in vivo* (en contacte amb l'hoste) com *in vitro* (en medi PDB).

Per altra banda, els resultats obtinguts en els assaigs antifúngics utilitzant el PCI marcat amb fluorocroms, indiquen que la molècula diana d'aquest inhibidor en les cèl·lules fúngiques es troba, molt probablement, localitzada a la paret o la membrana cel·lular. Aquest fet permet especular que la carboxipeptidasa B susceptible al PCI podria trobar-se en una d'aquestes estructures del fong. Es coneix que alguns enzims importants per el creixement fúngic, com és el cas de la quitina sintasa, són produïts com a proteïnes precursors, les quals són processades a la seva forma madura mitjançant activitat del tipus tripsina o cisteïna proteasa (Machida i Saito, 1993). Així, els inhibidors de proteases vegetals podrien funcionar com a repressors d'activitats enzimàtiques que són necessàries pel creixement del fong (per exemple, evitant el processament de les seves formes precursors). Els resultats obtinguts en el transcurs d'aquest

treball, són consistents amb la hipòtesi de que el PCI podria inhibir carboxipeptidases involucrades en el processament de proteïnes o enzims responsables de manera directa, o indirecta, de la biosíntesi de components de la paret cel·lular del fong. El creixement anormal de les hifes de *Magnaporthe grisea* en presència de PCI, i l'absència de marcatge amb el PCI fluorescent en les espores, junt amb el fet que el creixement del fong és inhibit en cultius tractats amb PCI, afavoreix aquesta possibilitat. Malgrat tot però, seran necessaris més estudis per tal de determinar el procés biològic concret que està específicament afectat pel PCI (com per exemple, aquells que estan associats al creixement i/o desenvolupament fúngic).

El fet que el PCI inhibeixi una CPB de *M. grisea*, no exclou la possibilitat que alguna altra activitat biològica d'aquesta molècula pogués també contribuir a la seva activitat antifúngica. El PCI pertany a la superfamília de proteïnes “*cystine-knot*”, anomenades així pel seu particular patró de ponts disulfur (Mas *et al.*, 1998). De manera interessant, aquesta particular estructura ha estat trobada en proteïnes vegetals de diferents espècies, les quals presenten activitat antifúngica contra fitopatògens, per exemple la família de proteïnes antifúngiques AMP de la planta “flor de nit” (*Mirabilis jalapa*) i l'arbre *Phytolacca americana* (De Bolle *et al.*, 1995). En aquest sentit, els efectes observats en el desenvolupament fúngic en presència de PCI, podrien estar associats a aquesta característica estructural del inhibidor. El mecanisme involucrat en aquest cas però, no coincidiria amb el descrit per aquest tipus de proteïnes antifúngiques. La permeabilització de la membrana del fong és un dels principals efectes descrits per a molts pèptids o proteïnes amb activitat antifúngica (Theis i Stahl, 2004; Zasloff, 2002), i el verd Sytox ha estat emprat per tal de caracteritzar aquest tipus d'efecte per part de les proteïnes antifúngiques, com és el cas de les defensines (Thevissen *et al.*, 1999). En aquest sentit, en el nostre laboratori ha estat recentment descrita la capacitat antifúngica de la proteïna AFP d'*Aspergillus giganteus*, la qual causa permeabilitat de membrana en cèl·lules de *M. grisea* (Moreno *et al.*, 2006). En el cas del PCI, no obstant, no s'ha observat permeabilització de membrana, tal i com es conclou a partir dels resultats obtinguts en els assaigs *in vivo* amb el colorant de DNA fluorogènic verd Sytox.

Malgrat existir un important coneixement respecte les carboxipeptidases de mamífers (Vendrell *et al.*, 2000), la informació disponible d'aquesta família d'enzims en fongs és molt escassa. De fet, es pot dir que la carboxipeptidasa B de *M. grisea* descrita en aquest treball, MgCPB, és la primera carboxipeptidasa caracteritzada en fongs fitopatògens. En anteriors estudis, es detectà una activitat carboxipeptidasa en el fong fitopatogen *Phymatotrichum omnivorum*, agent causant de la podridura de l'arrel de la planta de cotó (Boston i Prescott, 1968). En el cas del fong entomopatògen *Metarhizium anisophae*, s'ha descrit una carboxipeptidasa que presenta especificitat de substrat similar a les CPAs de mamífer (Joshi i Leger, 1999). Per aquest motiu, es va realitzar un l'anàlisi filogenètic basat en la seqüència aminoacídica inferida a partir dels

DISCUSIÓ

gens identificats en genomes de fongs i insectes (**Figura 75**). En aquesta anàlisi no s'han inclòs la totalitat de carboxipeptidases descrites en mamífers i amfibis, ni tampoc totes les de *C. elegans*. L'arbre filogenètic generat en aquest estudi revela que les carboxipeptidases de fongs formen diferents subgrups, i que en el cas del genoma de *M. grisea*, es prediuen 9 gens que codifiquen metal·loproteases distribuïdes en tots els subgrups (grups I, II i III). L'anàlisi filogenètica basada en seqüències aminoacídiques també distingeix una altra carboxipeptidasa de *M. grisea* (Nº Accés: XP367800) clarament agrupada amb la carboxipeptidasa identificada en aquest treball (Nº Accés: XP359930), per la que es pot també predir una activitat carboxipeptidasa B donat que la posició 255 està ocupada per un residu Asp. D'entre els 9 gens identificats que podrien codificar hipotètiques carboxipeptidases, només aquests dos gens contenen un residu carregat negativament a la posició 255 (característica de les carboxipeptidases del tipus B). La presència de gens que codifiquen carboxipeptidases en altres fongs fitopatògens, a més de *M. grisea*, fa per tant que sigui interessant realitzar estudis per tal de determinar si la proteïna PCI és capaç d'inhibir carboxipeptidases d'altres fongs patògens de plantes.

Per altra part, s'ha realitzat una predicció de l'estructura tridimensional de la carboxipeptidasa B de *M. grisea*, a partir de la informació disponible en la base de dades d'estructures de proteïnes (PDB i PSSM). Aquests resultats indiquen que la topologia general de plegament del domini catalític de la carboxipeptidasa, està conservada (**Figura 76**). Sembla particularment interessant la gran similitud que s'observa en l'estructura tridimensional predita per la carboxipeptidasa MgCPB de *M. grisea* amb l'estructura tridimensional de carboxipeptidases d'insectes, més concretament amb la carboxipeptidasa HaPCPA de l'insecte lepidòpter *Helicoverpa armigera*, l'estructura de la qual ha sigut ja resolta per cristal·lografia de raigs X (Bayés *et al.*, 2003). Així doncs, aquest similitud d'estructura entre la carboxipeptidasa fúngica i les carboxipeptidases d'insectes explicarien les propietats inhibidores del PCI front carboxipeptidases tant d'origen fúngic com d'insectes.

Per concloure, en aquest treball el gen *pci* s'ha utilitzat amb èxit per conferir resistència en plantes d'arròs front patògens fúngics, donant les bases per la utilització d'aquest inhibidor en el control de malalties causades per fongs patògens. A més, aquest fet recolza el paper del PCI en la resposta de defensa de la planta front atac per fongs. L'efecte protector en les plantes provocat pel PCI depèn de la seva habilitat per inhibir una carboxipeptidasa del fong diana *M. grisea* (MgCPB). El PCI produït en les plantes transgèniques d'arròs pot funcionar, no només com a inhibidor de les carboxipeptidases fúngiques, sinó també de les carboxipeptidases digestives dels insectes. Mentre la inhibició de les carboxipeptidases fúngiques per part del PCI confereix

avantatges a la planta en termes de resistència a fongs patògens, les seves propietats inhibidores vers les carboxipeptidases d'insectes tenen efectes no desitjats. Així, considerant la resposta adaptativa dels insectes al consum d'inhibidors de proteases, les estratègies de protecció front malalties fúngiques i plagues d'insectes fent servir plantes transgèniques que expressen l'inhibidor PCI, han de ser avaluades conjuntament. Resultarà així mateix interessant estudiar aspectes relacionats amb l'especificitat d'inhibició de PCI vers carboxipeptidases d'insectes i fongs, així com també de complexes carboxipeptidasa-inhibidor.

En una altre línia de treball, també dirigida a l'expressió simultània de gens de defensa per a la protecció de la planta d'arròs front malalties, s'ha treballat amb el gen *AtNPR1* d'*Arabidopsis thaliana*. Des del seu descobriment i caracterització (Cao *et al.*, 1997) el gen *NPR1* d'*Arabidopsis* ha estat àmpliament estudiat, i són molt els treballs que han demostrat el seu paper clau pel que fa la defensa front patògens bacterians i oomicets en *Arabidopsis*. En el transcurs d'aquest treball, s'han generat i caracteritzat plantes d'arròs de la varietat comercial Sènia que expressen constitutivament el gen *AtNPR1*. Seguidament s'ha dut a terme un anàlisi funcional d'aquestes plantes d'arròs per tal de determinar l'efecte de l'expressió de *AtNPR1* en la resistència o susceptibilitat a diferents tipus d'estrès, tant biòtics (fongs, bacteris i virus) com abiòtics (sequera i salinitat).

Primerament, s'ha estudiat l'efecte de l'expressió del gen *AtNPR1* davant la infecció pels fongs *Magnaporthe grisea* i *Fusarium verticillioides*, que són, tal i com s'ha comentat anteriorment els agents causants de la piriculariosi (o cremat de l'arròs) i de la malaltia "*Bakanae*", respectivament. El bacteri gram-negatiu *Erwinia chrysanthemi*, causant de la malaltia anomenada "foot rot" (Goto, 1979), representa un altre important problema en la producció d'arròs cultivat, i s'ha descrit també com a patògen de blat de moro, ordi, entre altres (Goto, 1979). Actualment, la major part del control d'aquestes malalties fúngiques i bacterianes, es du a terme mitjançant agents químics, amb els conseqüents inconvenients per la salut humana i el medi ambient, ja explicats.

En el transcurs d'aquest treball s'han generat línies d'arròs transgèniques independents, portadores del gen *AtNPR1* sota el control del promotor constitutiu del gen de la ubiquitina (*ubi1*) de blat de moro. S'ha demostrat que l'expressió constitutiva d'aquest gen en arròs resulta en un menor creixement de la planta sota condicions de creixement controlat en l'hivernacle. També s'ha avaluat la producció de gra, mostrant-se una reducció significativa al comparar amb la varietat Sènia control no transformada. Contràriament, la sobreexpressió d'aquest mateix gen

DISCUSIÓ

en *Arabidopsis* no porta, ni a la inhibició del creixement, ni a altres alteracions fenotípiques visibles (Cao *et al.*, 1997).

Estudis amb mutants d'*Arabidopsis* relacionats amb defensa indiquen que l'àcid salicílic, a més de tenir un paper clau en les interaccions planta-patogen, pot tenir també un paper regulador d'altres processos cel·lulars, com són l'elongació, l'endoreduplicació i/o la divisió cel·lular (Vanacker *et al.*, 2001). A més, ha estat també descrit en *Arabidopsis*, que la proteïna NPR1 actua regulant la divisió cel·lular i/o suprimint l'endoreduplicació durant el desenvolupament de les fulles (Vanacker *et al.*, 2001). Aquests estudis, recolzen la idea de que, com a mínim en *Arabidopsis*, tant el SA com la NPR1, juguen un paper important no només en la resposta a patògens, sinó que també en processos cel·lulars que romanen fins ara desconeguts.

En aquest sentit, els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que i) s'observa una reducció important en el creixement de les plantes d'arròs que sobreexpressen el gen *AtNPR1* i ii) el tractament amb àcid salicílic té un fort efecte de reducció del creixement en les plantes d'arròs *AtNPR1*. Tot i que es tracta d'un resultat preliminar, i que seran necessaris estudis més profunds, aquests resultats fan pensar que la proteïna *AtNPR1* i la fitohormona SA podrien tenir una funció reguladora en processos implicats en el desenvolupament i el creixement de la planta d'arròs. En animals, la proteïna NFκB, important component de la resposta immune innata, és també un component crític de regulació del cicle cel·lular durant el desenvolupament (Hatada *et al.*, 2000). El fet que el SA i la NPR1 puguin estar involucrats en processos cel·lulars diferents a la resposta de defensa front patògens, mostraria doncs una similitud entre animals i plantes (en ambdós casos un component clau de la senyalització de defensa juga un paper important en la senyalització del desenvolupament).

El conjunt de resultats obtinguts en els assaigs de resistència front diferents microorganismes fitopatògens, com són els fongs *M. grisea* i *F. verticillioides* o el bacteri *E. chrysanthemi*, demostren la resistència de les plantes d'arròs *AtNPR1* front aquests patògens i donen suport al fet que, tal i com ocorre en *Arabidopsis*, en arròs existeix també una via de resposta defensiva mediada per la proteïna NPR1 efectiva front a aquest tipus de patògens.

Donat que en *Arabidopsis* el gen *AtNPR1* és un component crític de la via de transducció de senyal que porta a l'expressió de gens *PR* (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997), es va voler avaluar si l'expressió constitutiva d'aquest gen en arròs podia afectar l'expressió de gens de defensa endògens. Així, es va estudiar el patró d'expressió, i resposta front infecció fúngica, de diferents gens relacionats amb defensa, com són els gens *OsPR1b*, *PR5*, *PR10*, *PBZ1* i *Scil*, en diferents línies d'arròs *AtNPR1* i en les plantes Sènia no transformades. Aquests estudis han demostrat que les línies *AtNPR1* presenten una activació

més ràpida i/o més forta de l'expressió dels gens sota estudi, indicant que la *AtNPR1* modula positivament l'expressió de gens endògens de defensa, com a mínim en el cas dels gens *PR1b*, *PR5*, *PR10*, *PBZ* i *Sci1*. Aquests resultats donen suport a la idea de que la resistència observada front diferents patògens està associada a un augment en la capacitat per activar els mecanismes de defensa de la planta, un fenomen conegut com a “*priming*” (Mauch-Mani *et al.*, 2006). Aquest fenomen també es dona durant el desenvolupament de la Resposta Sistèmica Adquirida (SAR), i en resposta al tractament amb diferents compostos, tant sintètics com naturals, com són per exemple la fitohormona SA o el seu anàleg químic *benzothiadiazole* (BTH) (Conrath *et al.*, 2006). L'observació en les plantes d'arròs *AtNPR1* d'un estat “d'alerta” major al de les plantes no transformades, és consistent amb la resistència mostrada per aquestes línies contra els diferents patògens fúngics i bacterians.

També s'ha examinat el patró d'expressió dels gens ortòlegs en arròs dels gens *AtNPR1* (el gen *OsNHI*) i del factor de transcripció *TGA2.1*. En aquest cas però, mentre que les línies d'arròs *AtNPR1* mostraven un patró d'activació més ràpid i fort dels gens *PRs* en resposta a infecció fúngica, la inductivitat per infecció dels gens *OsNHI* i *TGA2.1* es manifesta durant un període de temps més curt en les plantes transgèniques que en les plantes no transformades. Es coneix que en *Arabidopsis* la proteïna NPR1 regula positivament l'expressió de gens de defensa interaccionant amb membres de la família de factors de transcripció del tipus bàsic TGA. En particular, s'ha descrit que la NPR1 interacciona fortament amb el factor TGA2 d'*Arabidopsis*, tant *in vitro* com *in vivo* (Fan i Dong, 2002). Aquesta interacció NPR1-TGA, en *Arabidopsis*, porta a un augment en la capacitat d'unió del factor de transcripció al DNA, activant l'expressió de gens *PRs* (Després *et al.*, 2000; Johson *et al.*, 2003; Chern *et al.*, 2001). També es coneix però, que en el genoma d'*Arabidopsis* es troben fins a 10 gens de factors de TGA i que, *AtNPR1* no interacciona de manera equivalent amb tots els membres d'aquesta família de factors de transcripció TGA. És per tant possible que diferents factors de TGA controlin diferents grups de gens de defensa. Per altra banda, també hi ha la possibilitat que diferents TGA tinguin un paper positiu o negatiu en la regulació de l'expressió de gens de defensa, gens *PR* entre altres (Pontier *et al.*, 2001). En el transcurs d'aquest treball han aparegut a la literatura resultats força interessants que demostren la complexitat de les vies de regulació mediatas pels factors TGA. Així, s'ha descrit que plantes transgèniques d'arròs en les que s'expressa una versió mutada del gen del factor de transcripció *TGA2.1* (també conegut com a *OsNIFI*), així com en plantes que tenen bloquejada l'expressió d'aquest gen, s'observa un augment en la resistència al patògen bacterià *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo) (Fitzgerald *et al.*, 2005). Aquests resultats reforcen la idea de que el factor *TGA2.1* podria tenir una funció tant positiva com negativa en la regulació de la resposta de defensa en la planta front a diferents tipus de patògens.

DISCUSIÓ

Per tal de completar el ventall d'estressos biòtics, es va decidir estudiar també l'efecte de l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs, front infecció per virus. El virus RYMV (*Rice yellow mottle virus*) fou descrit inicialment en 1974 (Bakker, 1974) i es tracta d'un membre típic del gènere Sobemovirus. El RYMV és endèmic del continent africà on es troba àmpliament distribuït, sent el patògen que causa els danys més importants en el cultiu de l'arròs en aquest continent. Malgrat existeixen varietats d'arròs parcialment resistents, són escasses les varietats cultivades de *O. sativa* que mostrin una forta resistència al virus (Ndjiondjop *et al.*, 1999). Només recentment, s'ha descrit un gen recessiu de resistència en arròs, que confereix protecció contra RYMV codificant el factor eucariòtic d'inici de la traducció 4G (eIF(iso)4G) (Albar *et al.*, 2006). Els resultats obtinguts en aquest treball de tesi, mostren com l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs té un clar efecte en la resistència al RYMV. Així, les plantes de la varietat Sènia transformades amb el gen *AtNPR1* presenten una major susceptibilitat al RYMV, desenvolupant símptomes de la malaltia vírica de manera més severa que les plantes no transformades.

Per tant, sembla evident que la *AtNPR1* funciona en arròs proporcionant una major resistència davant patògens fúngics i bacterians, i que per contra, davant infecció per virus funciona com a regulador negatiu de la resposta viral. És probable que la *AtNPR1* reguli positivament un grup de gens d'arròs implicats positivament en la resistència front patògens bacterians i fúngics, i negativament un grup de gens implicats en la resposta a RYMV. El mecanisme concret pel qual *AtNPR1* afecta negativament a la resposta defensiva front el RYMV roman encara desconegut. Cal afegir també que, tot i que s'han obtingut bons resultats front patògens fúngics i bacterians amb l'expressió del gen *AtNPR1* en altres espècies vegetals diferents a *Arabidopsis*, com són arròs, blat i tomàquet (Lin *et al.*, 2000), en cap cas se n'ha descrit aquest efecte front virus. En el cas de les plantes de tomàquet amb sobreexpressió del gen *AtNPR1*, sí es realitzaren assaigs front el virus CMV (*Cucumber mosaic virus*) i TYLCV (*Tomato yellow leaf curl*), i no s'obtingueren diferències en la susceptibilitat entre plantes transgèniques i plantes no transgèniques (Lin *et al.*, 2000). Malgrat que existeix molt poc coneixement pel que fa a les vies de transducció de senyals en les interaccions planta-virus, alguns estudis indiquen que, a diferència de la resistència front fitopatògens bacterians i fúngics, els mecanismes de resistència antivirals dependents de SA podrien ser independents de la NPR1, i per tant independents de l'expressió de gens *PRs* (Chivasa i Caur, 1998; Wong *et al.*, 2002). D'aquesta manera, els resultats obtinguts en *Arabidopsis* i tabac suggereixen que la resposta de defensa antiviral induïda per SA, seguiria vies diferents d'aquelles que convergeixen en la NPR1, i que proporcionen resistència front patògens fúngics i bacterians. Estudis comparatius de l'expressió de gens de defensa en les plantes d'arròs *AtNPR1* infectades i no infectades amb RYMV, respecte a les plantes no transformades (també infectades i no infectades amb RYMV) podria ajudar a aclarir algun d'aquests aspectes (estudis en curs). Tot i que es tracta només d'una especulació,

podria pensar-se que una sobreproducció de la proteïna AtNPR1 podria segrestar algun element regulador positiu de la resposta antiviral, i per tant disminuir les propietats de resistència de la planta front RYMV. En aquest sentit seria també interessant analitzar el comportament de plantes d'arròs que expressen el gen *AtNPR1* (o el gen *OsNHI*) únicament en condicions d'inductivitat (promotors induïbles per infecció). En definitiva, els resultats presentats en aquest treball, indicarien que la sobreexpressió del gen *AtNPR1* esdevé contraproduent pel que fa la protecció de la planta d'arròs front el virus RYMV.

Els resultats obtinguts en aquest treball, han revelat també altres efectes ni esperats ni desitjats, associats a l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs, com són una major susceptibilitat de les plantes transgèniques davant condicions d'elevada salinitat o sequera. Es coneix, que les vies de senyalització implicades en la resposta de la planta davant condicions adverses de salinitat i sequera sovint es solapen. És per aquest motiu, que en general es consideren aquests estressos de manera conjunta a nivell molecular. L'estrès per salinitat i per sequera comparteixen característiques intrínseques que convergeixen finalment en un estrès osmòtic. A part d'aquest estrès osmòtic, la salinitat elevada present al sòl genera també un estrès iònic a la planta. Tot i que aquests dos estressos activen reaccions comuns, també es donen respostes específiques en les plantes activades per cadascun d'ells. Fins al moment, en la literatura no es troben treballs que relacionin *AtNPR1* amb estressos abiòtics. L'observació de que l'expressió de *AtNPR1* en arròs provoca una major sensibilitat de la planta a salinitat i sequera, permet especular que la *AtNPR1* podria actuar com un regulador negatiu de l'expressió de gens amb una funció protectora en situacions de salinitat i sequera. Així mateix, la mateixa especulació que es feia en relació a un possible efecte de la sobreproducció d'*AtNPR1* segrestant factors reguladors positius de la resposta a RYMV, podria aplicar-se també a la resposta de la planta front salinitat i sequera. Interessantment, l'anàlisi proteòmic de suspensions cel·lulars d'arròs inoculades per RYMV, revela que la infecció pel RYMV indueix l'expressió d'un nombre de gens que se sap que regulen estressos abiòtics, com són proteïnes induïdes per sal, proteïnes de tipus "heat shock" i la superòxid dismutasa (Ventelo- Debout *et al.*, 2004). Així doncs, tot i que es desconeix el significat funcional d'aquests canvis d'expressió, sembla que existeixen punts en comú en la resposta de la planta front a la infecció per RYMV i front estressos abiòtics. De nou, els estudis d'expressió gènica en les plantes d'arròs *AtNPR1* en situació de salinitat/sequera podran ajudar a entendre millor com la planta modula al seva resposta front a aquests diferents tipus d'estrès. Seria també molt interessant estudiar la tolerància a aquests estressos (virus, salinitat i sequera) en les plantes d'*Arabidopsis* que sobreexpressen el gen *AtNPR1* per conèixer si existeixen similituds entre ambdues espècies, arròs i *Arabidopsis*.

L'expressió constitutiva de *AtNPR1* en arròs porta associada efectes addicionals per la planta d'arròs sota determinades condicions de creixement. Així, plantes d'arròs *AtNPR1* crescudes en

DISCUSIÓ

cambres de creixement (en general llum de baixa intensitat) desenvolupen lesions espontànies. Les lesions espontànies desenvolupades en les plantes d'arròs *AtNPR1* estaven distribuïdes a l'atzar tant en fulles noves com velles. La formació de lesions va acompanyada per una sèrie de marcadors citològics, com són la producció de superòxid o l'acumulació d'autofluorescència. Cap d'aquests marcadors histoquímics eren detectats ni en plantes *AtNPR1* crescudes en hivernacle, ni en plantes control crescudes en la cambra de creixement. A més, les línies transgèniques d'arròs *AtNPR1* no presentaven lesions en l'hivernacle, les lesions només es desenvolupaven quan les plantes eren transferides des de l'hivernacle a la cambra de creixement. Aquestes observacions indiquen que les plantes d'arròs *AtNPR1* són molt més sensibles a les condicions de la cambres de creixement, que a les condicions d'hivernacle. La major diferència entre aquests dos ambients són la intensitat i la qualitat de la llum que les plantes perceben. La cambra de creixement té un cicle de 16H de llum i 8h de fosc, i rep llum de baixa intensitat. La intensitat total de llum és 2-4 vegades major en hivernacle (12,000-20,000 lux) que en la cambra de germinació (5,000-8,500 lux). Així, els resultats presentats en aquest treball sobre el desenvolupament de lesions espontànies en plantes *AtNPR1* regulat per les condicions ambientals, estan essencialment en consonància amb els resultats publicats en el transcurs d'aquest treball de tesi per Fitzgerald i col·laboradors (2004) en plantes d'arròs Taipei 309 que expressen *AtNPR1* i que també presenten lesions espontànies. No obstant, les plantes *AtNPR1* de la varietat Sènia desenvolupen lesions molt més aviat que les plantes Taipei (3 dies en plantes Sènia i 10-14 dies en plantes Taipei). Així, el diferent fons genètic pot influenciar en la formació de lesions espontànies mediat per *AtNPR1*. Els resultats obtinguts per Fitzgerald i col·laboradors també indiquen que les plantes *AtNPR1* Taipei 309 tenen nivells més baixos de SA en condicions de creixement de baixa intensitat lumínica en comparació amb les plantes control, per tant les condicions ambientals de creixement poden alterar els nivells endògens de SA. Tot i que especulant, es pot pensar que les diferències en els nivells endògens de SA entre Sènia i Taipei 309, pot determinar diferències en el temps d'aparició de les lesions entre les dues varietats d'arròs. En aquest treball, els nivells de SA en les plantes *AtNPR1* no s'han determinat. En estudis futurs serà important determinar-ho.

Els mecanismes que porten a la formació de lesions en plantes *AtNPR1* són desconeguts, tot i que semblen estar activats per condicions ambientals (intensitat i/o quantitat de llum). En aquest sentit, l'estat de "*priming*" en el que es troben les plantes *AtNPR1* podria explicar l'aparició de lesions quan la planta es troba en condicions de creixement subòptimes. La formació espontània de lesions (tipus HR) també s'ha descrit en plantes transgèniques que expressen gens específics, com els gens involucrats en transducció de senyal (proteïna quinasa activada per mitògens en tabac) (Cheong *et al.*, 2003) o estrès oxidatiu (gen oxalat oxidasa en gira-sol) (Hu *et al.*, 2003), o en plantes en les que s'ha inhibit l'expressió de catalasa (Takahasi

et al., 1997) i ascorbat peroxidasa (Orvar i Ellis, 1997). Una desregulació mediada per *AtNPR1* dels gens involucrats en la mort cel·lular en plantes transgèniques crescudes sota condicions ambientals subòptimes, també podria explicar la formació espontània de lesions en plantes transgèniques. Seran necessaris però més estudis per entendre les conseqüències dels canvis mediat per *AtNPR1* en les plantes d'arròs i elucidar la dependència ambiental sobre el fenotip de les lesions d'aquestes plantes.

També és cert que, molts dels mutants d'arròs amb lesions presenten expressió constitutiva de gens *PRs* (Mittler i Rizhsky, 2000; Yin *et al.*, 2000). Alguns d'aquests mutants d'arròs presenten resistència a *M. grisea*, mentre que d'altres no. Els resultats presentats en aquest treball, mostren que la formació de lesions va acompanyada de l'expressió de gens de defensa en les plantes transgèniques crescudes en condicions subòptimes. Finalment, s'ha investigat la possible relació entre la resistència a *M. grisea* observada en plantes transgèniques i el desenvolupament de lesions espontànies. Les fulles de les plantes *AtNPR1* que presenten resistència a *M. grisea* estan desproveïdes de lesions espontànies, suggerint que la resistència no és el resultat o la conseqüència de la formació de lesions en plantes *AtNPR1* quan aquestes es troben infectades per *M. grisea*.

En resum, els resultats obtinguts pel que fa el comportament de les plantes d'arròs que expressen el gen *AtNPR1* d'*Arabidopsis* han mostrat un augment en la seva resistència front patògens fúngics i bacterians, però per contra, presenten una sensibilitat més forta davant infecció per virus. Les plantes transgèniques *AtNPR1*, també mostren una "hipersensibilitat" a condicions de sequera i salinitat, en comparar-les amb les plantes no transformades de la varietat Sènia. Així doncs, aquest estudi mostra la complexitat del paper que juga *AtNPR1* en resposta a diferents estímuls externs, podent estar involucrada en regulacions antagonistes de les respostes de la planta a estressos biòtics i abiòtics. Tot i que els mecanismes que confereixen resistència a fongs i bacteris són usualment considerats com a independents d'aquells que involucren la resistència a virus, els resultats presentats en aquest treball recolzen que poden existir interaccions entre aquestes vies. També hem vist que *AtNPR1* pot funcionar com estimulador de l'expressió de gens de defensa involucrats en la resistència a patògens fúngics i bacterians (efecte "*priming*" en les plantes transgèniques d'arròs). Les vies de defensa involucrades en la resistència a diferents tipus de patògens, molt probablement interactuen de manera que la inducció d'una via pot inactivar una altre, resultant en un equilibri (o "*tradeoff*") en la resistència a varis organismes. També es pot postular que els mecanismes de resistència viral i tolerància a salinitat/sequera puguin compartir la *AtNPR1* com a component comú. Per aquesta raó les estratègies de protecció de cultius mitjançant transgènia amb el gen *AtNPR1* ha de ser avaluada amb compte. Així, donada l'existència d'aquestes interaccions, es fa necessari examinar tant els efectes positius com els efectes negatius en els diferents caràcters agronòmics

DISCUSIÓ

quan es modifiquen components reguladors en cultius modificats per transgènia. Particularment, els resultats descrits en aquest treball revelen la necessitat d'estudiar més a fons les vies on *AtNPR1* està involucrada i els principis pels quals *AtNPR1* porta a la transducció de senyals pel que fa la resistència i tolerància als diferents estressos. Clarament, és necessari aconseguir produir noves varietats resistents a patògens sense patir característiques agronòmiques no desitjables. El repte ara, és aconseguir una resistència a patògens fúngics o bacterians mediada per l'expressió del gen *AtNPR1* en arròs sense que aquest fet afecti negativament a la resistència de la planta front virus o a la seva tolerància front a estressos abiòtics.

1. En el sistema proteolític digestiu de larves dels insectes *Chilo suppressalis* i *Spodoptera littoralis*, participen majoritàriament serina proteases (tripsines, quimotripsines i elastases) així com, cisteïna, leucinamino i aspàrtic proteases. Així mateix també són presents activitats del tipus carboxipeptidasa. Resultats similars s'han descrit en altres insectes lepidòpters.
2. L'expressió del gen *mpi* (*maize proteinase inhibitor*) sota control del seu propi promotor s'indueix en resposta a ferida en plantes transgèniques d'arròs, i permet aconseguir nivells d'acumulació de la proteïna MPI similars als observats en plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *mpi*. La proteïna MPI no s'acumula a uns nivells significatius en l'endosperm de llavors de les plantes d'arròs que expressen el gen *mpi* sota control del seu propi promotor.
3. L'inhibidor MPI mostra un efecte inhibidor "*in vitro*" sobre l'activitat proteolítica total present en el sistema digestiu de les larves de *C. suppressalis* i *S. littoralis*. MPI inhibeix aproximadament un 40% de l'activitat proteolítica total d'ambdós insectes. S'observa però, en resposta a la ingesta de la proteïna MPI produïda en plantes transgèniques d'arròs, una "activació" del sistema proteolític total del tracto digestiu de les larves, i de proteases concretes tant endoproteases com exoproteases. Aquests resultats indiquen que en resposta a la ingestió de MPI es produeix una adaptació del complement digestiu de *C. suppressalis* mitjançant un increment de proteases que no són susceptibles d'inhibició per MPI.
4. L'inhibidor PCI (*Potato Carboxypeptidase Inhibitor*) mostra un efecte inhibidor "*in vitro*" sobre l'activitat proteolítica total present en el sistema digestiu de les larves de *C. suppressalis* i *S. littoralis*. PCI inhibeix aproximadament un 20% de l'activitat proteolítica total d'ambdós insectes. L'expressió constitutiva del gen *pci* en plantes d'arròs té un efecte estimulador del creixement de les larves de *C. suppressalis* i *S. littoralis*, mostrant-se per tant com a una estratègia no adequada per la protecció de les plantes davant l'atac d'insectes plaga.
5. El gen fusió *mpi-pci* s'expressa correctament sota el promotor i terminador del gen *mpi*. Quan s'utilitza la seqüència de processament 2A per la fusió dels gens *mpi* i *pci*, el producte gènic obtingut, la proteïna fusió MPI-2A-PCI es processa parcialment en la cèl·lula d'arròs. El producte del gen *mpi-C-pci* s'acumula en forma de poliproteïna no processada en la planta de arròs transformada.

CONCLUSIONS

6. L'expressió dels gens fusió *mpi-pci*, tant el gen fusió *mpi-2A-pci* com el gen fusió *mpi-C-pci* dirigida pel promotor induïble 2Kmpi confereix protecció a la planta d'arròs front la infestació de larves de *C. suppressalis*. L'estratègia basada en l'ús de la seqüència de processament Cry1B ha resultat però, més eficaç per a la protecció front aquest insecte lepidòpter. Les larves de *C. suppressalis* en alimentar-se en plantes d'arròs que expressen un gen fusió *mpi-pci* presenten un pes menor i un retard en el seu creixement respecte les larves alimentades en plantes control. La reducció de pes oscil·la entre el 23,5% i el 47% en el cas de les línies *mpi-2A-pci*, i d'entre 32,2% i 64% per les línies *mpi-C-pci*. L'efecte de l'expressió d'un gen fusió sobre el creixement de les larves és doncs superior al que s'observa en el cas de l'expressió del gen *mpi* de manera individual (30% reducció de pes com a promig) en plantes d'arròs. En el cas de les línies obtingudes per creuament entre parentals que expressen bé el gen *mpi* o bé el gen *pci* de manera individual, s'observa una reducció en el pes de les larves alimentades en aquestes plantes que oscil·la entre el 20% i el 40%.
7. La proteïna PCI presenta activitat antifúngica *in vitro* front fongs fitopatògens. En Creixell el fong en presència de PCI a una concentració de 20 µM, aquest és capaç d'inhibir el 50% del creixement de *M. grisea*. En presència de PCI, s'observen importants anomalies morfològiques i inhibició del procés d'elongació de les hifes de *M. grisea*.
8. L'expressió del gen *pci* en plantes d'arròs confereix resistència contra els fongs fitopatògens *M. grisea* i *F. verticillioides*.
9. S'ha purificat i caracteritzat una Carboxipeptidasa B del fong *M. grisea* anomenada MgCPB, que és completament inhibida pel PCI, suggerint que l'acció antifúngica d'aquest inhibidor es basa, com a mínim en part, en la seva capacitat per inhibir aquest enzim fúngic. Aquests resultats, junt amb l'observació de la localització de PCI marcat fluorescentment en la perifèria de les cèl·lules de *M. grisea*, suggereixen que el PCI podria estar inhibint una carboxipeptidasa B implicada en processos de biosíntesi de la paret del fong. PCI, a diferència de l'observat per altres pèptids i proteïnes antimicrobianes, no provoca la permeabilització de les membranes cel·lulars del fong.
10. L'expressió constitutiva del gen *AtNPR1* (*Arabidopsis thaliana*, *nonexpressor PR genes*) en arròs confereix resistència front els fitopatògens fúngics *M. grisea* i *F. verticillioides*, i el patògen bacterià *Erwinia chrysanthemi*. La resistència observada front *M. grisea*, està associada a un augment en la capacitat de la planta per activar els

mecanismes endògens de defensa en condicions d'infecció, concretament l'expressió dels gens *PR-1b*, *PR-5*, *Sci1 (PR-6)*, *PR-10* i *PBZ*.

11. Les plantes arròs *AtNPR1* crescudes en condicions d'hivernacle presenten un menor tamany i produeixen menys llavors que les plantes no transformades. Quan les plantes d'arròs *AtNPR1* són crescudes en condicions de baixa intensitat de llum, desenvolupen lesions espontànies. Aquestes lesions van acompanyades d'una sèrie d'efectes citològics com són l'acumulació de superòxid (O_2^-) i acumulació de compostos fluorescents en la paret cel·lular, fenòmens que mimetitzen la resposta hipersensible de defensa.
12. Contràriament a la resistència observada contra patògens fúngics i bacterians, les plantes d'arròs *AtNPR1* presenten una major susceptibilitat a la infecció per el virus RYMV (*Rice yellow mottle virus*), desenvolupant símptomes de la malaltia vírica de forma més severa que les plantes de la varietat Sènia no transformades.
13. L'expressió constitutiva del gen *AtNPR1* en plantes d'arròs provoca una major sensibilitat a estressos abiòtics, com són la salinitat i sequera.

CONCLUSIONS

A. MATERIALS

1 MATERIAL BIOLÒGIC

1.1 Plantes

- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Sènia
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Ariete
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Taipei 309
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Nipponbare
- *Oryza sativa* L. var. *japonica* Azucena
- *Oryza sativa* L. var. *indica* Gigante Vrac
- *Oryza sativa* L. var. *indica* IR64
- *Solanum tuberosum* Ecotip A7540

1.2 Fongs i oomicets

- *F. verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), cedit pel Servei de Protecció dels Vegetals (Generalitat de Catalunya)
- *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*, PR9), CIRAD (Montpeller, França)
- *Phytophthora infestans*, banc BCCM/MUCL (Bèlgica).

1.3 Bacteris

- *Escherichia coli*: Soca DH5 α F' (Hanahan, 1983). Clonatges.
- *Agrobacterium tumefaciens*: Soca EHA 105 (Hood et al. 1993). Transformació estable de les varietats d'arròs Sènia i Ariete).
- *Erwinia chrysanthemi* A3937, cedida pel Dr. P. Rodriguez Palenzuela (Universidad Politécnica de Madrid).

1.4 Virus

- *Rice yellow mottle virus* (RYMV) Aïllat RYMV BF1 (N^a Accés: AJ279901, S2 strain).

1.5 Insectes (Lepidòpters)

- *Chilo suppressalis* (Walker), Camarga francesa (Sambuc, França) i Delta de l'Ebre.
- *Spodoptera littoralis*, insectari del IIQAB-CSIC (Barcelona).

MATERIALS I MÈTODES

2 MATERIAL NUCLEIC

2.1 Plasmidis

- **pGEMTeasy**: Clonatge de productes de PCR pel sistema T/A *cloning*, Amp^R, (Promega)
- **pET28a+**: Expressió de la proteïna fusió MPI-2A-PCI en *E. coli*, Kan^R (Promega)
- **pAHC17** (cedit pel Dr. Tepperman (Christensen & Quail, 1996)): format a partir del plasmidi pUC8. Conté el promotor del gen de la *ubiquitina* 1 de blat de moro i el terminador del gen de la nopalina sintasa (*nos*).
- **pBluescript SK**: Clonatge de fragments d'ADN obtinguts per restricció, Amp^R, (Stratagene)
- **pCAMBIA13000**: Clonatges de fragments d'ADN obtinguts per restricció, i vector de transformació d'arròs. Kan^R, Higo^R HigromicinaR, (CAMBIA)

2.2 Construccions

Construccions utilitzades en aquest treball:

Construcció	Utilització	Referència
pGEXmpi	Expressió del gen <i>mpi</i> en <i>E. coli</i>	Vila, 2003
pALL.MPI	Obtenció del gen <i>mpi</i> sencer (promotor -1872 a +197) per PCR	Vila, 2003
pC1mpi	Expressió induïble del gen <i>mpi</i> (promotor -689 a +197) en arròs	Vila, 2003
p2Kmpi	Expressió induïble del gen <i>mpi</i> (promotor -1872 a +197) en arròs	Vila, 2003
pubi::pci::nos	Expressió constitutiva del gen <i>pci</i> en arròs	
pC1300::2Kmpi::2A::pci::ter	Expressió simultània dels gens <i>mpi</i> i <i>pci</i> (seqüència de processament 2A) sota el promotor induïble 2K en arròs	
pC1300::2Kmpi::C::pci::ter	Expressió simultània dels gens <i>mpi</i> i <i>pci</i> (seqüència de processament <i>CryPS</i>) sota el promotor induïble 2K en arròs	
pC1300::ubi::npr1::nos	Expressió constitutiva del gen <i>npr1</i> en arròs	

3 ANTICOSSOS

S'han utilitzat els següents anticossos policlonals:

- *Ac anti-MPI*: obtingut contra la proteïna recombinant MPI, dilució 1:1000 (Tamayo *et al.*, 2000).
- *Ac anti-RYMV*: obtingut contra la proteïna de càpside (CP) del RYMV, dilució 1:1000 (N'Guessan *et al.*, 2000)

4 MEDIS DE CULTIU

4.1 Medis per Bacteris

Medi LB:

Triptona	10 g/L
Extracte de llevat	5 g/L
NaCl pH 7.5 (NaOH)	10 g/L
Autoclavar	

Medi King:

Peptona	20 g/L
Glicerol	10 mL
K ₂ HPO ₄	1,5 g/L
MgCl ₂ · 7 H ₂ O	1,5 g/L

Autoclavar

Medi SOB:

Triptona	20 g/L
Extracte de llevat	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Autoclavar	

Medi YEB:

“Beef” extract	5 g/L
Extracte de llevat	1 g/L
Peptona	10 g/L
Sacarosa	5 g/L
MgSO ₄	0,48 g/L
Agar (medi sòlid)	15 g/L
Autoclavar.	

Medi AB per *Agrobacterium* (Protocol transformació CIRAD, Montpellier):

20x solució AB *stock*

K ₂ HPO ₄	60 g/L
NaH ₂ PO ₄	20 g/L
Autoclavar	

20x sals AB *stock*

NH ₄ Cl	20 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6 g/L
KCl	3 g/L
CaCl ₂	0,2 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	
Autoclavar	50 mg/L

AB sòlid

Glucosa	5 g/L
Agar (Difco)	15 g/L
H ₂ O destil·lada	900mL/L
Autoclavar	
Solució AB	50 mL/L
sals AB	50 mL/L
Antibiòtics (per pCAMBIA1300):	
kanamicina	50µg/mL
rifampicina	25µg/mL

4.2 Medis per Fongs i oomicets

Medi PDA (*Fusarium verticillioides*):

Medi PDB (Potato Dextrose Broth) (Difco)	24 g/L
Agar	15 g/L
Autoclavar	
Cloramfenicol (Sigma)	30 mg/L

Medi V8 (*Phytophthora infestans*):

Caldo vegetal granulat Starlux	2 cullerades/L
Agar	15 g/L
Autoclavar	
β-Sitosterol	0,05 g/L
Cloramfenicol (Sigma)	30 mg/L

Medi d'arròs (*Magnaporthe grisea*):

Arròs (var. Senia) triturat	20 g/L
Extracte de llevat	2,5g/L
Agar	15 g/L
Autoclavar	
Cloramfenicol (Sigma)	30mg/L

MATERIALS I MÈTODES

4.3 Medis per Plantes

Medi per la germinació *in vitro* d'arròs:

MS (sals i vitamines) * (Duchefa)	4,4 g/L
Sacarosa	10 g/L
Ajustar pH 5,8 (NaOH)	
Agar (Difco)	8 g/L
Autoclavar	

* *Medi MS (Murashige & Skoog, 1962)*

Medi de selecció de plantes transgèniques homozigòtiques:

Medi de germinació <i>in vitro</i>	
Higromicina	50 mg/L

NH ₄ NO ₃	1650 mg/L	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 mg/L
KCl	170 mg/L	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg/L
KNO ₃	1900 mg/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg/L	Àcid nicotínic	0,5 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 mg/L	Piridoxina HCl	0,5 mg/L
MNSO ₄ ·7H ₂ O	6,2 mg/L	Tiamina HCl	0,1 mg/L
H ₃ BO ₃	22,3 mg/L	Mio-inositol	100 mg/L
KI	0,83 mg/L	Glicina	2 mg/L

Substrat pel cultiu d'arròs en hivernacle:

Hivernacles CSIC-IRTA: Es fa una barreja de torba^a (*Torficosa Plantaflor*) i vermiculita (1:1). Per cada kg s'afegeix 1 g de CaCO₃ i 1 g d'adob 15-15-15^b. S'humidifica i es deixa reposar 1 setmana (no autoclavar).

^a Torba clara de *Sphangum*, pH 3,5; Matèria orgànica, 96%; Nitrògen total, 1%.

^b Nitrogen total (níttric, amoniacal i ureic), 15%; Anhídrid fosfòric(P₂O₅), 15%; Òxid de Potassi (K₂O), 15%.

Solució nutritiva de rec per arròs:

NO ₃	8,4 mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2,5 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄ NH ₄ NO ₃	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
K ₂ HPO ₄	3,6 mM
Kelamix (Fe-EDDHA)	35 mg/L

Oligoelements

B	0,005%
Cu	0,001%
Fe	0,012%
Zn	0,004%
Mo	0,005%
Mn	0,005%
Quelats per EDTA	

Medi Kinetina

Agar	10 g/L
Autoclavar.	
Kinetina	1 mL/L
(Stock: 2 mg/mL en EtOH 50%)	

5 TAMPONS I SOLUCIONS

Tampó TE

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	5 mM
Guardar a temperatura ambient	

PBS 20X

Na PO ₄ · H ₂ O	16 mM
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	84 mM
NaCl	1,5 M

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrat trisòdic	0,3 M
Guardar a TA, pH=7,0	

SSPE 20X

NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	20 mM

Autoclavar i guardar a T, pH=7,4

TBE 10X

Tris-HCl	0,089 M
Àcid bòric	0,089 M
EDTA	0,002 M

Guardar a TA

MEN 10X

MOPS	200 mM
NaAc	50 mM
EDTA	10 mM

Guardar a 4°C, pH=7,0

Denhardt 's 100X

Ficoll	20 g/L
Polivinilpirrolidona (PVP)	20 g/L
BSA	20 g/L

Guardar a -20°C.

Solució desnaturalitzant

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
Guardar a TA	

Solució neutralizant

NaCl	1,5 M
pH 8,0 ajustado amb HCl 25 %	
Tris-HCl	0,5 M

Guardar a TA

Tampó de càrrega per DNA (6X)

MATERIALS I MÈTODES

Glicerol	30 %
Blau de bromofenol	0,25 %
Xilenocianol	0,25 %
EDTA	0,5 M

Guardar a -20°C, pH 8,0

Tampó de càrrega per RNA (2X)

Tampó de càrrega para DNA 6X	20 %
Formamida desionitzada	50 %
Formaldehid	6.4 %
MEN 10X	10 %

Bromur de etidi 200 µg

Guardar a -80°C

Tampó de transferència de proteïnes

Tri	48 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20 %
SDS	10 %

Mirar pH sense afegir el metanol. No ajustar el pH, ha d'estar entre 9-9,4. Guardar a 4°C.

Vermell de Ponceau

Vermell de Ponceau	0.1 %
Ac. Acètic	1 %

RNA-asa

Tris-HCl	10 mM
NaCl	15 mM
Ribonucleasa A	10 mg/mL

Escalfar a 65°C 15 min i guardar a -20°C

B. MÈTODES

Les tècniques generals de manipulació i anàlisi d'àcids nucleics i proteïnes, s'han realitzat fonamentalment 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 o mètodes més específics per a la realització dels estudis presentats en aquest treball.

1 MÈTODES RELACIONATS AMB ÀCIDS NUCLÈICS

1.1 Preparació de cèl·lules competents d' *Escherichia coli*

Protocol:

1. Inocular en 5 mL de medi LB una colònia aïllada d' *E. coli* DH5 α a partir d'una placa fresca.
2. Incubar ON a 37°C en agitació orbital constant de 250 rpm
3. Transferir 1 mL del pre-cultiu en 100 mL de medi LB
4. Incubar en agitació a 37°C fins que el cultiu arribi a una densitat òptica (D.O.) a 595 nm de 0.3-0,5 (2-3 h).
5. Refredar el cultiu en gel uns 15 min.
6. Transferir el cultiu a tubs de centrifuga de polipropilè prèviament refredats.
7. Centrifugar 10 min a 4°C i a 4000 rpm (cal treure el fre a la centrifuga per evitar que la parada sigui massa brusca)
8. Decantar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 10 mL de CaCl₂ 100 mM fred (4°C). Deixar 30-60 min en gel.
9. Centrifugar 10 min a 4°C i a 4000 rpm.
10. Decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 2 mL de CaCl₂ 100 mM amb glicerol al 15 % (4°C).
11. Dividir en alíquotes de 100 μ L en tubs eppendorf i congelar immediatament en N₂ líquid.
12. Guardar les cèl·lules a -80°C.

1.2 Preparació de cèl·lules competents d' *Agrobacterium tumefaciens*

Es segueix el protocol anterior (Apartat B.1.1) amb les següents modificacions:

La temperatura de creixement del cultiu *A. tumefaciens* és de 28°C. La densitat òptica a 595 nm (Pas 4) cal que arribi a 0.5-1.

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

Protocol:

1. Afegir a una alíquota de 100 μ L de cèl·lules competents, el DNA plasmídic (uns 50 ng) o la reacció de lligació de DNA (el volum màxim de DNA ha de ser de 1/10 respecte el volum de les cèl·lules).
2. Congelar immediatament en N₂ líquid.
3. Incubar el tub 5 min a 37°C.
4. Afegir 0,8 mL de medi SOB i incubar en agitació 1 h. a 37°C.
5. Centrifugar 60 seg a 13000 rpm, descartar el sobrenedant i resuspendre las cèl·lules en 100 μ L de medi SOB
6. Sembrar les cèl·lules en placa de Petri amb medi LB sòlid amb X-gal (40 mg/mL), IPTG (23,8 mg/mL) i els antibiòtics adequats.
7. Incubar ON a 37°C.

En general, els vectors de clonatge utilitzats (pBluescript SK-, pGEM-T, pCAMBIA1300) presenten la seqüència del gen de la β -galactosidasa. Quan s'insereix un fragment d'ADN en aquesta regió, les cèl·lules perden la capacitat de sintetitzar aquest enzim i per tant, de metabolitzar el substrat X-gal formant, com a conseqüència, colònies blanques (a diferència del color blau característic produït per la degradació del substrat per la β -galactosidasa).

MATERIALS I MÈTODES

1.4 Extracció de DNA genòmic

Segons la quantitat de mostres a analitzar s'ha realitzat l'extracció en tubs eppendorf o tires de tubs* (plaques de 96 tubs, *Qiagen*). El material s'ha triturat en N₂ líquid mitjançant el *Tissue Lyser* seguint les indicacions del fabricant (*Qiagen*).

*En aquest cas cal emprar adaptadors de centrífuga per plaques.

Protocol:

1. Triturar el teixit i passar-ne aproximadament 100 mg per tub. Afegir 5 mL de tampó d'extracció MATAB i invertir 6 vegades.
2. Incubar de 20min a 1 h a 74°C amb agitació suau.
3. Deixar refredar a TA . Afegir 6 mL de cloroform/alcohol isoamílic (24v/1v) per tub. Barrejar les dues fases per inversió suaument.
4. Centrifugar 10 min a 6500 rpm a TA.
5. Transferir el sobrenedant a un tub eppendorf nou. Afegir 1,5 µl d'RNAsa (0,5 µg/ml). Incubar 30min a 37°C.
6. Afegir 4 mL de cloroform/alcohol isoamílic (24v/1v) per tub. Barrejar invertint el tub varies vegades suaument.
7. Centrifugar 10 min a 6500 rpm a TA.
8. Transferir el sobrenedant a nous tubs eppendorf.
9. Afegir 5 mL d'isopropanol. Centrifugar 30 min a 14.000 rpm. Descartar el sobrenedant.
10. Rentar amb EtOH 70%. Centrifugar 30 min a 14.000 rpm. Descartar el sobrenedant.
11. Resuspendre en el volum convenient amb H₂O MiliQ o tampó TE.
12. Comprovar la qualitat del DNA mitjançant fraccionament en una electroforesi d'agarosa i quantificar amb l'espectrofotòmetre a densitat òptica 260 nm.
13. Un cap obtingut l'ADN genòmic es guarda a 4°C per evitar que es fragmenti durant els processos de congelació/descongelació.

Tampó d'extracció MATAB:

Tris-HCl pH 8	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
MATAB*	2 %
PEG 6000	1 %
Sulfit de sodi	0,5%
*mixed alkyltrimethylammonium bromide (Sigma)	

1.5 Extracció de RNA total

Abans d'iniciar el protocol, cal rentar amb SDS i aigua miliQ autoclavada tot el material per evitar la degradació del RNA durant el procés d'extracció.

En el transcurs d'aquest treball s'han utilitzat dos mètodes d'extracció d'RNA total, bé mitjançant tampó Z6 (per a *Northen-Blot*) o bé mitjançant la utilització de TRIZOL^R (per a RT-PCR).

El protocol d'extracció emprant TRIZOL^R s'ha realitzat seguint les instruccions de la casa comercial.

Protocol "Tampó Z6":

1. Triturar el teixit vegetal* congelat en N₂ líquid i passar aprox. 100-200 mg a un tub eppendorf de 1,5 ml
2. Afegir 400 µL de tampó Z6 i 20 µL de β-mercaptoetanol. Homogeneïtzar bé amb vòrtex.
3. Afegir 400 µL de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1) i tornar a homogeneïtzar.
4. Centrifugar 30-45 min a 13.000 rpm a 4°C
5. Recuperar el sobrenedant a un tub eppendorf nou.
6. Afegir 0,1 volums d'àcid acètic 1M i 1 volum de EtOH absolut. Barrejar bé amb vòrtex. Deixar precipitar el RNA (20 min a -80°C o ON a -20°C).
7. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm i descartar el sobrenedant.
8. Rentar el pellet amb 300µL de EtOH 70%. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
9. Descartar el sobrenedant i rentar el pellet amb 200 µL de acetat sòdic 3M per eliminar els polisacàrids.
10. Tornar a rentar el pellet amb EtOH 70% 2 vegades.
11. Descartar el sobrenedant i secar el pellet a TA o fent servir la bomba de buit.
12. Resuspendre en 50 µL de H₂O MiliQ autoclavada
13. Agitar 15 min per resuspendre bé el RNA
14. Escalfar a 65°C 5-10 min.
15. Centrifugar 2 min a 13.000 rpm i recuperar el sobrenedant en un tub eppendorf nou.
16. Comprovar la qualitat del RNA mitjançant fraccionament en una electroforesi d'agarosa i quantificar amb l'espectrofotòmetre a densitat òptica 260 nm.
17. Guardar a -80°C.

* Per triturar les mostres es va emprar, en funció de la quantitat de teixit vegetal inicial, be el morter refredat amb N₂ líquid o be el *Tissue Lyser* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant.

Tampó Z6:

Guanidin-HCl	8M
MES pH 7,0 (KOH)	20mM
EDTA	20mM

1.6 Obtenció de DNA plasmídic

1.6.1 *Midi-preparacions*

Per a l'obtenció d'ADN plasmídic a gran escala s'ha emprat el kit per midi-preparacions (*Qiagen*) seguint les instruccions del fabricant. Normalment s'ha partit de 200 ml de cultiu i el rendiment obtingut per plasmidis tipus pCAMBIA ha estat de 100-300 µg d'ADN plasmídic.

MATERIALS I MÈTODES

1.6.2 Mini-preparacions mitjançant lisi alcalina

1.6.2.1 Mini-preparacions d' *E. coli*

Protocol

1. Inocular una colònia aïllada en 4 mL de medi LB i incubar ON a 37°C en agitació orbital constant (250 rpm)
2. Transferir 1,5 mL del cultiu a un tub eppendorf i centrifugar 2 min a 13000 rpm.
3. Descartar el sobrenedant i repetir el pas anterior.
4. Resuspendre en 200 µL de solució I
5. Afegir 200 µL de solució II i incubar 5 min a TA.
6. Afegir 200 µL de solució III i barrejar per immersió (5 vegades).
7. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
8. Passar el sobrenedant a un tub nou.
9. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
10. Passar el sobrenedant a un tub nou.
11. Afegir 0,7 % del volum d'isopropanol i centrifugar 10 min a 13000 rpm.
12. Descartar el sobrenedant.
13. Afegir 300 µL d'EtOH 70 % per rentar el precipitat.
14. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
15. Descartar el sobrenedant i deixar eixugant el precipitat a TA.
16. Resuspendre en 40 µL de H₂O MilliQ autoclavada.
17. Afegir 2 µL de RNAsa (10mg/mL) i incubar a 37°C 15 min.
18. Guardar a -20°C

Solució I:

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	25mM
<u>Ajustar el pH a 8,0 amb HCl</u>	
Autoclavar 15 min i guardar a 4°C	

Solució II:

NaOH	0,2N
SDS	1%

Solució III:

Acetat potàssic	3M
Àcid acètic glacial	5M
<u>Guardar a 4°C</u>	

1.6.2.2 Mini-preparacions d' *Agrobacterium*

Protocol

Inocular una colònia aïllada en 4 mL de medi YEB i incubar ON a 28°C en agitació orbital constant (250 rpm)

1. Transferir 1,5 mL del cultiu a un tub eppendorf i centrifugar 2 min a 13000 rpm.
2. Descartar el sobrenedant i repetir el pas anterior.

3. Resuspendre en 1 mL de tampó STE.
4. Centrifugar 1 min a 13000 rpm.
5. Passar el sobrenedant a un tub nou.
6. A partir d'aquí seguir com en l'apartat anterior 1.6.2 (Pas 11).

Tampó STE:

NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Es recomana fer una extracció amb fenol/cloroform (Sambrook *et al.*, 1989) un cop obtingut l'ADN per tal d'eliminar-ne components no desitjats.

1.7 Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

1.7.1 Reaccions de modificació del DNA

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.

1.7.2 Purificació d'ADN 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 *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant.

1.8 Obtenció de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)

Prèviament, es realitzà una **purificació del RNA** abans de dur a terme la RT-PCR. Aquest mètode de purificació es basa en el cebador oligo d(T) unit a biotina, el qual hibrida en solució amb la regió poli (A)⁺ del mRNA. Aquests híbrids són capturats mitjançant estreptavidina unida a partícules magnètiques mitjançant un suport magnètic. Es va usar el kit comercial *PolyAtract® mRNA Isolation System* (Promega), seguint les instruccions del fabricant amb la següent modificació: els rentats es realitzaren en SSC 0,2X i no en SSC 0,1X (mètode adaptat per a la purificació de mRNAs de plantes)

Protocol

1. S'utilitzen 2 µg de RNA total, 0,4 µl DNA-asa (10 U/µL) (Roche), 5 µl de tampó de DNAasa 10X i aigua MiliQ fins un volum final de 50 µl.
2. Incubar 15 min a 37°C.
3. Precipitar amb etanol i resuspendre el RNA en 9,5 µl d'aigua MiliQ autoclavada.
4. Afegir 1 µL d'Oligo d(T) a una concentració de 500 ng/µL i 0,5 µL del inhibidor RNAasa (*Roche*). Incubar 10 min a 70°C, 10 min a temperatura ambient i passar a gel.

MATERIALS I MÈTODES

5. Per altra banda, realitzar una segona barreja amb 4 µL del tampó de RT 5X, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTPs 10 mM, i 1 µL de la transcriptasa inversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (200 U/µL) (*Invitrogen*).
6. Afegir aquesta barreja a la obtinguda en el pas 4, (volum final de 20 µL)
7. Incubar una hora a 37°C.
8. Inactivar la reacció a 70°C 10 min
9. Afegir 80 µL d'aigua MiliQ autoclavada.

Les reaccions de PCR s'expliquen a l'apartat següent 1.9.

L'anàlisi de les intensitats relatives de les bandes obtingudes a les reaccions de RT-PCR, foren quantificades amb el programa *Quantity One* (*BioRad*).

1.9 Reacció de PCR

1.9.1 Oligonucleòtids

Oligonucleòtids emprats en aquest treball:

oligonucleòtids

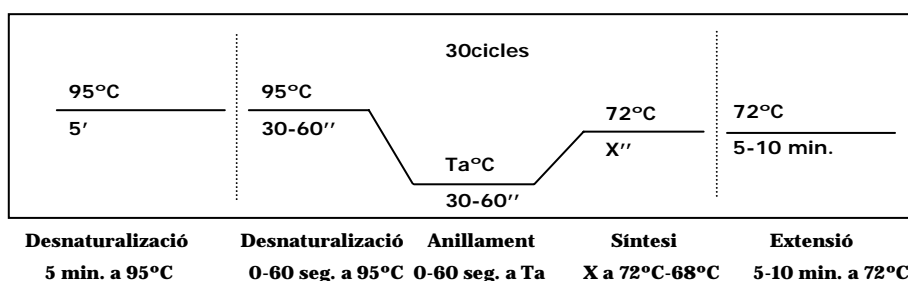
Nom	Seqüència	Tm (°C)
Oligo-dT	5'- T ₁₅ VN -3'	55
2PMPI5	5'- TTG GTA CCT CAT GTT TTA CCC TTT TAC -3'	65
2A5	5'- GCG CAT GCC AAC TGT TGA ACT TCG AC -3'	65
2A3	5'- CGG GAT CCG GGG CCT GGG TTG GAC TCG AC -3'	58
TMPI5	5'- AAG CTT ATA TAA GCT AGC CGC TAT TTC C -3'	58
TMPI3	5'- GCG GCC GCG GTA CCT TTC CAT ATC CCT TCT CCT TG -3'	58
TMPI3-2	5'- GAC AAT GCG GCC GCG GTA CCT -3'	56
PCI5	5'- GGA TCC CAG CAA CAC GCA GAT CCA -3'	56
PCI5-2	5'- GCC AGG ATC CAG CAA CAC GCA -3'	56
PCI3	5'- AAG CTT CTA TTA GCC AAC ATA GGG CCC AC -3'	56
PCI3-xho	5'- GCC TCG AGC TTC TAT TAG CCA ACA TAG -3'	65
PCI fin	5'- TCC GCG CGG ACA TGT G -3'	57
MPI in	5'- GCA CTC CGT GGA GCT C -3'	57
PMPI5	5'- GGT ACC TCA TGT TTT ACC CTT TTA C -3'	56
PMPI3	5'- GCA TGC GCC GAT GTG GGG CGT CT -3'	56
MPI5	5'- CGG ATC CAC ACA CCA TGA GCT CCA CGG AG -3'	58
MPI5	5'- GCG CGG CCG CAT GAG CTC CAC GGA GTG -3'	58
MPI3	5'- CGA GCT CGA AAT AGC GGC TAG CTT AT -3'	58
PS5	5'- GCG CAT GCG AGA GGG CCC AAG AAG CT -3'	64
PS3	5'- GCG GAT CCC CTG GTC AAT GTG GTA GTC G -3'	64
NPR1-5	5'- GCG GAT CCA CAC GAT GGA CAC CAC CAT TGA -3'	54
NPR1-3	5'- GCG GAT CCC ACT AAG AGG CAA GAG TC -3'	54
NPR1-int	5'- GCT TGT ATG AAG CTA TTG G -3'	56
UBI-5	5'- GCG AGC TCC TGC AGT GCA GCG TGA CCC GGT CGT GC -3'	56
NOS-3	5'- GCG AGC TCC CGA TCT AGT AAC ATA GAT -3'	56
pCI300-1201	5'- AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G -3'	56
pCI300-1221	5' CGA CGG CCA GTG CCA AGC TT -3'	63
2k	5'- CAA CTG GTC CGG CAG TTC G -3'	60
PR1b-F	5'- CTT GGC GAG AAC CTC TTC TG -3'	54
PR1b-R	5'- GCC GGC TTA TAG TTG CAT GT -3'	54
TGA2-F	5'- ATG CTC ATG CAA GTG ACA GC -3'	52
TGA2-R	5'- CCA ACG TAT CTG CCA AGG AT -3'	52
PR10-F	5'- TCA GGC AGT TCA ACT TCA CCT C -3'	53
PR10-R	5'- CTT AGC CTT GGT GAT CTC GTC C -3'	54
PBZ-F	5'- CCG GGC ACC ATC TAC ACC -3'	53
PBZ-R	5'- CCT CGA TCA TCT TGA GCA TGC 3'	55
PR5-F	5'- CAG TAC TGC TGC ACC GGC TC -3'	56
PR5-R	5'- ACA TCG ATC AGA TGC CAG CTA A -3'	54
OsMPI-F	5'- GGC CAA GAA GGT GAT TCT CAA GGA C -3'	60
OsMPI-R	5'- ACA GCA GCA TCG CTA CTA ACC A -3'	54
SfPCI5m	5'- GCA ACA CGC AGA TCC AAT TT -3'	53
SfPCI3m	5'- ACA TAG GGC CCA CAT GTC C -3'	52
RAc1-fwd	5'- CCT CTTCCA GCC TTC CTT CAT A -3'	54
RAc1-rev	5'- GCA ATG CCA GGG AAC ATA GTG-3'	54
StAct-F	5'- CCT TGT ATG CTA GTG GTC G-3'	54
StAct-R	5'-GCT CAT AGT CAA GAG CCA C-3'	54

1.9.2 Condicions de PCR emprades en aquest treball

La tècnica de PCR (*polimerase chain reaction*) es va utilitzar per amplificar fragments de DNA fent servir el termociclador *MJ Research PTC-200*.

Condicions generals	
DNA (vector; cDNA; DNA genòmic)	10-100ng
Tampó PCR 10X *	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	200 μM
Oligonucleòtids	100-500 nM
Taq polimerasa*	0,5-1 unidades

El següent esquema mostra las condicions generals de PCR utilitzadas.



- $Ta = [2 \cdot (AT) + 4 \cdot (GC)] - 4$. Sent AT i GC, el número d'adeninas i timines, i guanines i citosines dels oligonucleòtids, respectivament.

1.9.3 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'ha emprat el kit *pGEM[®]-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.

1.9.4 Cribratge ràpid de plasmidis recombinants

Quant ha calgut analitzar un elevat nombre de clons recombinants, s'ha realitzat un cribratge ràpid mitjançant PCR, permetent una primera selecció dels plasmidis que contenen l'insert.

Protocol:

1. Mitjançant una punta estèril, es pica cada colònia de la placa i es resuspen en un *ependorf* amb 20 μl d'aigua MilliQ estèril; paral·lelament, es replica cada colònia en una placa de LB nova i es numera per tal de recuperar-la si cal.
2. S'utilitzen 2μl per cada PCR (condicions apartat 1.9.2)

MATERIALS I MÈTODES

1.10 Transferència i hibridació d'àcids nucleics

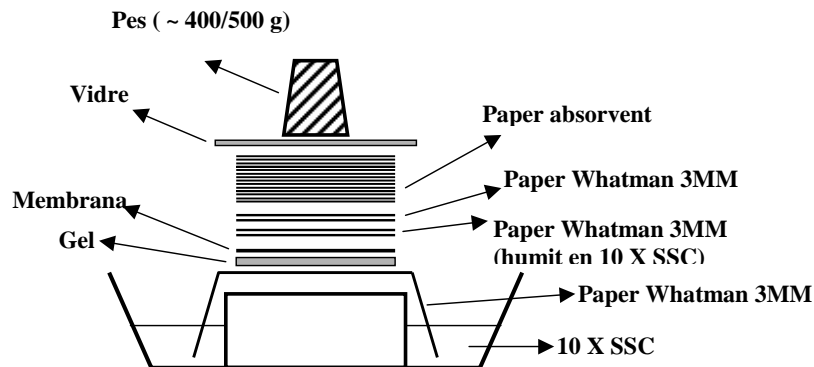
1.10.1 Transferència de ADN ("Southern blot")

1.10.1.1 Transferència de l'ADN a filtre de niló

Els àcids nucleics, es transfereixen per capilaritat a la membrana de niló.

Protocol:

1. Carregar l'ADN digerit (normalment 10 µg) en un gel d'agarosa del 0.8 % i córrer a 30v ON. Fotografiar el gel amb llum uv i una referència de distància (per exemple amb un regle).
2. 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 del tampó de càrrega, es torni groc. Deixar 5-10 min més. Llençar el líquid i rentar amb H₂O destil·lada.
3. Desnaturalitzar: incubar en agitació durant 30 min en NaOH 0,4N solució desnaturalitzant (NaOH 0,5M i NaCl 1,5M). Ha de tornar a aparèixer el blau. Llençar el líquid i rentar amb aigua destil·lada.
4. Neutralitzar: incubar en agitació durant 30 min en solució neutralitzant (TrisHCl 0,5M i NaCl 1,5M)
5. Equilibrar el gel incubant-lo en SSC 2x fins el moment de la transferència
6. Equilibrar el filtre de niló *Hybond-N (Amersham-Pharmacia)* en SSC 2x fins el moment de la transferència
7. Transferir ON amb SSC 10x al filtre de niló seguint el següent model:



8. Després de la transferència, treure la membrana i netejar-la amb SSC 2x.
9. Deixar assecar completament la membrana en paper absorbent. Poden conservar-se a 4°C.
10. Fixar el DNA: embolicar el filtre en paper *Saran Wrap* i deixar a l'U.V. durant 3 min o bé a 80°C durant 2 h.

1.10.1.2 Prehibridació i Hibridació

Protocol:

1. **Prehibridació:** Equilibrar la membrana amb 2x SSC. Posar la membrana en un tub d'hibridació i afegir la solució de prehibridació (20 ml/tub). Deixar durant 5-16h a 65°C en constant agitació.
2. **Hibridació:** Desnaturalitzar la sonda marcada radioactivament (veure apartat següent), incubant 10 min a 100°C. Afegir la sonda a la solució d'hibridació (10 ml/tub). Treure la solució de prehibridació dels tubs i afegir la solució d'hibridació amb la sonda. Deixar 8-16h a 65°C en agitació constant.

3. Recuperar la solució d'hibridació utilitzada en un tub *falcon* de 50 ml (sonda marcada) per si cal reutilitzar-la .
4. **Rentats:**
 - 10 min amb solució de rentat S1, a TA. Llençar la solució.
 - 30 min (x2) amb solució de rentat S2 a 65°C.
 - 30 min (x2) amb solució de rentat S3 a 65°C.
5. Assecar amb compte la membrana amb paper absorbent i segellar-la amb plàstic.
6. Dipositar la membrana en un *cassette* amb un film d'autoradiografia (*Kodak Scientific Imaging Film XAR-5*) o amb una pantalla de *PhosphoImager (BIORAD)*.
7. Deixar exposant a -80°C (film d'autoradiografia) o TA (pantalla *PhosphoImager*)^a fins el seu revelat.
 - ^aRevelat amb escaner *PhosphoImager (Personal Molecular Imagen FX System, BIORAD)*.

Solució prehibridació i d'hibridació:

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10mM
SSC	5x
SDS	0,2% (p/v)
DNA 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.

Solucions de rentat:

S1		
SSC		2x
SDS		0,1% (p/v)
S2		
SSC		0,1x
SDS		0,1% (p/v)
S3		
SSC		0,1x
SDS		0,1% (p/v)

1.10.2 Transferència de RNA (“Northern blot”)

1.10.2.1 Transferència del RNA a filtre de niló

Protocol:

1. Carregar el RNA (normalment 10 µg) amb tampó de càrrega de ARN 2x (relació 1:1), prèviament desnaturalitzat (15 min a 65°C) en un gel d'agarosa del 1.5 % i córrer a 90v durant 3-4 h. Fotografiar amb un regle al costat.
2. Rentar amb H₂O destil·lada a 65°C durant 5 min en agitació. Repetir 3 cops
3. Rentar el gel incubant-lo en SSC 10x durant 30 min en agitació. Repetir 2 cops.
4. Equilibrar el filtre de niló *Hybond-N (Amersham-Pharmacia)* en SSC 2x fins el moment de la transferència

MATERIALS I MÈTODES

5. Transferir ON amb SSC 10x al filtre de niló seguint el mateix model de l'apartat anterior (1.10.1.1).
6. Després de la transferència, treure la membrana i netejar-la amb SSC 2x.
7. Deixar assecat completament la membrana en paper absorbent. Poden conservar-se a 4°C.
8. Fixar l'ARN: embolicar el filtre en paper *Saran Wrap* i deixar a l'U.V. durant 3 min o bé a 80°C durant 2h

1.10.2.2 Prehibridació i Hibridació

Protocol:

1. **Prehibridació:** Equilibrar la membrana amb 2x SSC. Posar la membrana en un tub d'hibridació i afegir la solució de prehibridació (20 ml/tub). Deixar com a mínim 4 h a 42°C en constant agitació.
2. **Hibridació:** Desnaturalitzar la sonda marcada radioactivament (veure apartat següent), incubant 10 min a 100°C. Afegir la sonda a la solució d'hibridació (10 ml/tub). Treure la solució de prehibridació dels tubs i afegir la solució d'hibridació amb la sonda. Deixar 8-16h a 42°C en agitació constant.
3. Recuperar la solució d'hibridació utilitzada en un tub *falcon* de 50 ml (sonda marcada) per si cal reutilitzar-la.
4. **Rentats:**
 - 10 min amb solució de rentat S1, a TA. Llençar la solució.
 - 30 min (x2) amb solució de rentat S2 a 42°C
 - 30 min (x2) amb solució de rentat S3 a 42°C
5. Assecat amb compte la membrana amb paper absorbent i segellar-la amb plàstic.
6. Dipositar la membrana en un *cassette* amb un film d'autoradiografia (*Kodak Scientific Imaging Film XAR-5*) o amb una pantalla de *PhosphoImager (BIORAD)*.
7. Deixar exposant a -80°C (film d'autoradiografia) o TA (pantalla PhosphoImager)^a fins el seu revelat.
^a Revelat amb escaner PhosphoImager (*Personal Molecular Imagen FX System, BIORAD*).

Solució prehibridació i d'hibridació:

Formamida	40%
SSPE	5x
SDS	0,5 (p/v)
DNA esperma de salmó	0,1mg/ml
Denhart	5x

Per a la *solució d'hibridació* s'afegeix la sonda prèviament desnaturalitzada

Solucions de rentat:

	S1	S2	S3
SSC	2x	0,1x	0,1x
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)

1.10.3 **Marcatge i purificació de la sonda per random priming**

S'utilitza el kit *Random Primed DNA Labeling Kit (ROCHE)*, seguint les indicacions del fabricant. El fragment d'ADN a marcar es desnaturalitza a 100°C durant 2 min en presència de la barreja d'hexanucleòtids a l'atzar, els quals hibridaran amb cadascuna de les cadenes cada 100-200pb. Les cadenes d'ADN complementàries

seran sintetitzades a partir dels encebadors per acció de l'ADN polimerasa Klenow, en presència d' α -³²P dCTP i dels tres altres nucleòtids freds.

1.10.4 Deshibridació de membranes (ADN/ARN)

Un cop utilitzada i exposada, es pot eliminar la sonda hibridada a una membrana per tal de reutilitzar-la.

Protocol:

1. Rentar la membrana amb SSC 2x durant 5 min.
2. Escalfar SDS 1% fins l'ebullició i llençar sobre la membrana.
3. Mantenir en agitació 30 min a 65°C.
4. Deixar refredar durant 30 min. en agitació a TA.
5. Rentar la membrana 5 min. amb SSC 2x i tornar a hibridar (o bé guardar a 4°C).

1.11 Seqüenciació d'àcids nucleics

La seqüenciació d'ADN ha estat realitzada amb el seqüenciador automàtic ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) en el servei de Seqüenciació del IBMB (CID-CSIC).

2 MÈTODES RELACIONATS AMB PROTEÏNES

2.1 Extracció de proteïnes totals

2.1.1 Extracció de proteïnes totals de teixits vegetals per a immunodetecció

Aquest protocol ha resultat de gran utilitat per a l'anàlisi mitjançant *Western blot* dels nivells d'acumulació de MPI en 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:

1. Homogeneïtzar el teixit en un morter refredat contínuament amb N₂ líquid.
2. Passar el teixit fet pols (300-500 mg) a un *ependorf* i afegir 300-500 µl de tampó d'extracció.
3. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C.
4. Recuperar el sobrenedant.
5. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm a 4°C.
6. 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 realitza d'acord amb les instruccions del fabricant.

Tampó d'extracció:

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	5 %
Ditiotreitol (DTT)	1 mM
Triton X-100	

2.1.2 Extracció de proteïnes totals de teixits vegetals per assaigs d'activitat enzimàtica

Aquest protocol ha estat emprat per a determinar l'activitat inhibidora dels teixits vegetals en les plantes transgèniques produïdes en el decurs d'aquest treball. El protocol és el mateix que en l'apartat anterior (2.1.1), però el tampó d'extracció és en aquest cas Tris-HCl pH 8 0,1 M.

2.1.3 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 *Spodoptera littoralis*. La conservació dels extractes alíquotats ha de ser a -80°C. Les mostres són descongelades en gel i utilitzades immediatament.

Protocol:

1. En un vidre de rellotge amb solució fisiològica (NaCl 0,9%) s'extreuen els intestins, sota la lupa, i es guarden en *ependorfs* a -80°C.
2. Mantinent l'*ependorf* en neu carbònica, es tritura el contingut utilitzant un èmbol de plàstic.
3. Dividir en alíquotes (en cada *ependorf* alíquotar aproximadament el corresponent a 10 intestins) i guardar a -80°C.
4. En el moment de la utilització, afegir 500 µl de tampó d'extracció fred i barrejar.
5. Centrifugar 10 min a 4°C.

6. Recuperar el sobrenedant.
7. Centrifugar 5 min a 4°C.
8. Recuperar el sobrenedant.
9. 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.

Tampó d'extracció insectes:

Tris-HCl pH 8,8	0,5 M
NaCl	0,15 M

2.1.4 Extracció de proteïnes totals de miceli de *M. grisea*

Per a l'extracció de proteïnes totals de miceli de *M. grisea* es va partir de varis cultius d'aquest fong crescuts 3 setmanes a temperatura ambient en 50 ml de medi d'arròs líquid. Seguidament es va filtrar i recuperar el miceli mitjançant paper *Miracloth* (Calbiochem). El protocol descrit a continuació està adaptat a 50 ml de cultiu inicial.

Protocol:

1. Homogeneïtzar el miceli congelat en un morter refredat contínuament amb N₂ líquid.
2. Dividir el teixit homogenitzat en alíquotes de 500 mg en *ependorfs* de 2 ml i afegir 1,5 ml de tampó d'extracció.
3. Agitar de manera continua en l'orbital a 4°C durant 30 min.
4. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm a 4°C i recuperar el sobrenedant.
5. Tornar a centrifugar 5 min a 13.000 rpm a 4°C.
6. Recuperar el sobrenedant.

Del sobrenedant obtingut es realitza una **precipitació selectiva amb sulfat d'amoni**. El protocol utilitzat ha estat lleugerament modificat a partir del descrit en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, 2001).

Protocol:

1. S'afegeix la quantitat necessària per assolir un 10 % desaturació amb sulfat d'amoni (82,5 mg per cada 1,5 ml de sobrenedant obtingut en l'extracció).
2. Agitar suaument i de manera continua a 4°C durant 20 min.
3. Centrifugar 30 min a 13.000 rpm a 4°C.
4. Recuperar el sobrenedant i guardar el sediment (fracció 0-10%). Amb aquest pas s'eliminen proteïnes molt hidrofòbiques que precipiten al 10 % de saturació de sulfat amoni.
5. Afegir la quantitat de sulfat d'amoni necessària per assolir un 45 % de saturació amb una agitació continua (304,5 mg per cada 1,5 ml de sobrenedant) i deixar ON a 4°C.
6. Centrifugar 30 min a 13.000 rpm a 4°C i recuperar el sediment (fracció 10-45 %).
7. Resuspendre els diferents sediments de cada *ependdorfen* tampó d'extracció (300 µl) i ajuntar totes les fraccions .
8. Concentrar els sediments resuspendes en tampó d'extracció mitjançant columnes amb filtres de 10,000 MWC Amicon Ultra-15.
9. Determinar la concentració de l'extracte proteic concentrat. Amb una alíquota de 2 µl es determina pel mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad). La determinació per Bradford es realitzà d'acord amb les instruccions del fabricant

MATERIALS I MÈTODES

Tampó d'extracció:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	0,45 M

2.2 SDS-PAGE

El mètode utilitzat és el descrit per Laemmli (1970). Els aparells emprats han estat els *Miniprotean 2 i 3 (BioRad)*. Seguidament es descriuen els tampons utilitzats i la composició dels gels emprats en aquest treball.

Tampó del gel concentrador (capa superior o Upper):

Tris-HCl pH 6,5	0,5 M
SDS	0,4 %

Tampó del gel separador (capa inferior o Lower):

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 %

• Gel concentrador per a 2 ml:

Gel concentrador	
H ₂ O	2,25 mL
Tampó gel concentrador	1 mL
Acridiamida (30:0,8)	0,5 mL
APS 15 % (p/v)	40 µL
Temed	6µL

• Gels separadors per a 10 ml (% d'Acridiamida /bisacridiamida):

Gel separador	12,5 %	15 %	18 %
H ₂ O	3,13 mL	3,75 mL	4,5 mL
Tampó gel separador	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Acridiamida (30:0,8)	3,75 mL	3,75 mL	3 mL
APS 15 % (p/v)	40 µL	40 µL	40 µL
Temed	6µL	6µL	6µL

Tampó d'electroforesi (Running Buffer):

Glicina	1,92 M
Tris-HCl	0,25 M
SDS	10 %
pH entre 8,3 i 8,8	

Protocol:

1. Afegir un volum de tampó de càrrega de proteïnes TM x2 igual al volum de mostra (el volum màxim total per pouet és de 35-40 µl)

2. Seguidament s'afegeix β -Mercaptonetanol al 10 % (v/v)
3. Incubar 3 min a 100 °C.
4. Les mostres es mantenen en gel fins a la seva càrrega en el gel de SDS-PAGE.

Tampó de càrrega de proteïnes TM x2:

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
Glicerol	20 %
SDS	4 %
Blau de bromofenol	0,04 %

2.3 Precipitació de proteïnes

En els casos on ha calgut augmentar la concentració de proteïna, abans de realitzar l'electroforesi SDS-PAGE, s'ha realitzat una precipitació de proteïnes de les mostres a analitzar.

Protocol:

1. Afegir 3 volums d'acetona/10% TCA amb 20 mM DTT
2. Precipitar durant com a mínim 45 min -20°C
3. Centrifugar 30 min a 13000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenedant
4. Afegir 1 mL d'acetona amb 20 mM DTT per tal d'eliminar completament restes de TCA
5. Centrifugar 15 min a 13000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenedant.
6. Assecar el precipitat i resuspendre en el volum necessari de tampó de càrrega de proteïnes TM 1X (**apartat 2.2, Mètodes**)

2.4 Immunotransferència

2.4.1 Transferència

S'ha utilitzat el sistema *SemiDry* (BioRad) per a realitzar la transferència de les proteïnes resoltes en gels d'acrilamida cap a membranes de nitrocel·lulosa (0,2 o 0.45 μ m. Els protocols detallats es descriuen a *Current Protocols in Protein Science*, (Coligan *et al.* 2002).

Protocol:

1. Equilibrar el gel abans de la transferència fent rentats amb tampó de transferència ("*Trans-Blot*") a 4°C:
 - 2 rentats de 5 min en agitació.
 - 1 rentat de 10 min en agitació.
 - Els papers i membrana han d'incubar-se 10 min en tampó de transferència.
2. Les condicions de treball emprades per a l'electrotransferència han estat de 12 V durant 40 min amb el tampó de transferència
3. Desmuntar i tenyir el gel (amb Blau de Coomassie) i la membrana (amb Vermell de Ponceau), per tal de confirmar si hi ha hagut una transferència correcte. Marcar amb llapis sobre la membrana les bandes corresponents al marcador de pes molecular.

Tampó de transferència ("Trans-Blot") :

MATERIALS I MÈTODES

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20 %
SDS	10 %

(El pH ha d'estar al voltant de pH 9)

2.4.2 Immunodetecció

Les condicions emprades en aquest treball han estat:

Protocol:

1. Rentar la membrana amb PBST durant 5 min en agitació (x2).
2. Incubar en solució de bloqueig durant 1h a TA o bé O/N a 4 °C en agitació.
3. Fer 3 rentats de 5 min amb PBST.
4. Incubar amb la dilució de l'anticòs adequat (apartat 3 de A. *Materials*) en solució de bloqueig durant 1 h a TA o bé O/N a 4°C en agitació.
5. Eliminar el sèrum.
6. Fer 4 rentats de 5 min amb PBST.
7. 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 s'han utilitzat dos anticòssos secundaris anti IgG de conill. En la primera part (proteïna MPI), lligat a una fosfatasa alcalina (Dako A/S) a una dilució de 1:5000. En la segona part d'aquest treball, s'ha emprat un anticòs secundari conjugat a una peroxidasa (Pierce) a una dilució de 1:7500 (Proteïna MPI-PCI).
8. Fer 4 rentats de 5 min amb PBLs.

PBST:

PBS	1 x
Tween-20	0,1 %

Solució de bloqueig:

5 % de llet en pols desnatada en PBST

A. Revelat amb fosfatasa alcalina:

Protocol:

1. Equilibrar amb tampó fosfatasa 10 min.
2. Revelar amb el substrat NBT/BCIP, mantenint la membrana a l'obscuritat. Per accelerar la reacció es pot mantenir a 37°C.
3. Parar la reacció amb PBS+EDTA 0,2M.

Tampó fosfatasa:

NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Tris-HCl pH 9,5	100 mM

NBT:

NBT (Boehringer)	0,05 g
Dimetilformamida(DMF)	700µl
H ₂ O	300µl

BCIP:

BCIP (Duchefa)	0,05 g
H ₂ O(*)	1 mL

(*) Si el BCIP està en Toluidin salt, dissoldre en DMF

Substrat NBT/BCIP:

NBT (50 mg/ml)	66 µL
BCIP (50 mg/ml)	33 µL
tampó fosfatasa	10 mL

B. Revelat amb Peroxidasa:

S'ha emprat el *kit* comercial *SuperSignal West Femto* (Pierce) siguin les instruccions del fabricant. En aquest cas es realitza un revelat quimoluminiscent mitjançant un film d'autoradiografia (Kodak X-OMAT AR Film, XAR-5) a TA. El temps d'exposició han variat en funció de la senyal obtinguda en cada experiment, determinant-se en general als 2 i 7 min (exposicions màximes de 30 min).

2.5 Determinació d'activitats proteolítiques**2.5.1 Activitat proteolítica total d'extractes proteics**

Per tal de valorar l'activitat proteolítica total s'utilitzà el substrat universal per a proteases *Casein, resorufin-labeled* (Roche), realitzant tres rèpliques per mostra.

Protocol:

- Afegir en un tub *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 *Spodoptera littoralis* 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 (Tots contenen NaCl 0,15M):

- Na₂HPO₄ (0,1M) amb pH 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5

MATERIALS I MÈTODES

- 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
- Na₂HPO₄ (0,1M) amb pH 10,0 - 10,5 - 11,0 - 11,5 - 12,0 - 12,5

2.5.2 Inhibició d'activitats enzimàtiques

S'utilitzà igualment el substrat universal per a proteases *Casein, resorufin-labeled (Boehringer Mannheim)*. En aquest cas 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 2.5.1. En aquests assaigs s'han utilitzat habitualment 5 µg d'extractes proteics d'intestins de larves de lepidòpter.

(*) Els inhibidors utilitzats i les corresponents concentracions de treball foren:

- *Elastatinal* (0,1mM) (*Sigma*)
- *Chymostatin* (0,1mM) (*Sigma*)
- *Soybean Bowman-Birk Inhibitor* (SBBI) (10µM) (*Sigma*)
- *Leupeptin* (100µM) (*Sigma*)
- *Pepstatin* (25µM) (*Sigma*)
- *Maize Proteinase Inhibitor* (MPI) (10 µM) (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)

2.5.3 Activitat proteolítica d'extractes proteics utilitzant substrats específics

Els substrats comercials utilitzats han estat:

Substrat (Casa comercial)			
SA3pNA (Sigma)	N-succinyl-alanine-alanine-alanine-phenylalanine p-nitroanilide	Elastasa	0,1 mM
SA2PPpNA (Sigma)	N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine p-nitroanilide	Quimotripsines	0,25 mM
SA2PLpNA (Sigma)	N-succinyl-alanine-alanine-proline-leucine p-nitroanilide)		
BAPNA (Sigma)	N α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide	Tripsines	1 mM
BAPNA + Cisteïna (Sigma)	N α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide + L-cysteine	Cisteïna proteases	1 mM + 1mM
P-Glu-Phe-Leu-pNA (Sigma)	L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide	Cisteïna proteases	0,5 mM
HPA (Sigma)	hippuryl-phenylalanine (benzoyl-glycyl-phenylalanine)	Carboxipeptidasa A	1 mM
AAFP (Bachem)	N-(4-methoxyphenyl-azoformyl)-L-phenylalanine		0,1 mM
HA (Sigma)	hippuryl-L-arginine (benzoyl-glycyl-arginine)	Carboxipeptidasa B	1 mM
FAAK (Sigma)	N-(3-[2-furyl] acryloyl)-Ala-Lys		0,2 mM
LpNA (Sigma)	L-leucine p-nitroanilide	Leucina aminopeptidases	1 mM

Els assaigs han estat realitzats a temperatura ambient i les absorbàncies mesurades en el temps a 410 nm (substrats SA3pNA, SA2PPpNA, SA2PLpNA, BAPNA i p-Glu-Phe-Leu-pNA), 254 nm (substrats HPA i HA), 350 nm (substrat AAFP) o 330 (substrat FAAK). S'ha determinat el pH òptim en cada cas (veure **apartat 2.5.1**). A excepció de les activitats del tipus carboxipeptidasa (A i B), els assaigs d'activitats específiques s'han dut a terme en plaques de 96-pous en un volum final de 200 µL. En el cas de les activitats carboxipeptidasa s'han realitzat en

cubetes de quarz amb un volum final de 500 µL. S'han emprat 5 µg d'extractes proteics en el cas de les larves de lepidòpters o 40 µg en el cas de miceli de fong.

S'han realitzat tres repeticions de cada assaig amb 3 mostres independents.

Els valors d'absorbància es processen per obtenir l'activitat del inhibidor en nmol / min / µg d'inhibidor, utilitzant la fórmula:

$$1 \text{ mmol} / \mathbf{C}^* \text{ UDO} = x \text{ mmol substrat} / \text{interval lectura (min)}$$

* ($\mathbf{C} \text{ UDO}$ correspon al coeficient d'extinció molar calculat per al substrat)

El coeficient d'extinció molar és de 8,8 UDO per als substrats pNA; 0,36 per als substrats HA i HPA, i 19 per al substrat AAFP.

2.5.4 Inhibició de l'activitat proteolítica utilitzant extractes proteics vegetals (de plantes transgèniques d'arròs MPI i PCI)

Per tal de determinar l'activitat inhibidora dels extractes proteics de plantes transgèniques d'arròs, s'ha emprat la Carboxipeptidasa A bovina (1µg) (ambdues de *Sigma*). S'han utilitzat 50, 100, 150, 200 i 300µg d'extractes proteics de teixit vegetal.

Protocol:

1. Barrejar els extractes proteics de teixit vegetal amb la proteasa adequada, i completar fins a 50µL amb tampó Tris-HCl 0,1M pH8.
2. Incubar 30 min en gel.
3. En cubetes de l'espectrofotòmetre d'1 ml, afegir 100µL de substrat específic 10x i 850mL de tampó Glicina (NaOH) 0,1 M pH 10,5 (activitat elastasa) o Tris-HCl 0,1M pH8 (activitat CPA).
4. Afegir els extractes incubats a la cubeta i fer la lectura.
5. Lectura: es llegeix l'absorbència a 410 nm (substrat SA₃pNA) i 350 nm (substrat AAFP).
6. Els valors d'absorbància es processen per obtenir l'activitat de l'inhibidor en nmol / min / µg d'inhibidor, tal i com s'indica a l'apartat anterior 2.5.3.

2.6 Cromatografia d'afinitat sobre PCI immobilitzat

Es va realitzar una cromatografia d'afinitat amb l'inhibidor de patata PCI amb extractes proteics obtinguts a partir del miceli de *M. grisea*. Així, el PCI es produí de forma recombinant al grup del Dr. F.X Avilés (UAB), on es va immobilitzar en una matriu de *Sepharose* activada amb bromur de cianogen. El procés d'immobilització es va dur a terme a pH 8,3 tota la nit a 4°C, sent la capacitat final de la columna de 5mg/mL (1,2mM) de PCI (Bayés, 2005).

MATERIALS I MÈTODES

Es van preparar mini-columnnes de 0,1 mL amb la matriu de *Sepharose*-PCI i es va passar l'extracte proteïc de miceli a través de la mini-columnna. La mostra no unida es va rentar amb 10 volums de columna del tampó d'equilibri. Posteriorment es va realitzar una primera elució amb tampó Tris-HCl pH 9,0 seguit d'una segona elució amb tampó fosfat sòdic pH 11,0. Les fraccions de tot el procés cromatogràfic es van analitzar en una electroforesi SDS-PAGE i se'n va mesurar l'activitat carboxipeptidasa B (veure apartat 2.4.3, *Mètodes*). Les mostres eluïdes a pH 11, es van tractar, immediatament, amb el tampó de neutralització per tal d'evitar-ne la proteòlisi.

Tampó d'equilibri	Tris- HCl 10mM pH7,5 NaCl 0,15M
Tampons d'elució	Tris-HCl 50mM pH 9,0 Fosfat sòdic 50mM pH 11,0
Tampó de neutralització	Tris 1 M pH 7,0

Per tal de determinar les **concentracions de proteïna** de les diferents fraccions obtingudes, es va realitzar una quantificació per espectrometria.

En el cas de les fraccions eluïdes que van mostrar activitat carboxipeptidasa, es va aplicar la llei de Lambert-

$$C = DO_{280} / \epsilon_{280} \cdot d$$

On **C** equival a la concentració de la proteïna, **DO₂₈₀** és l'absorbància de la mostra a 280nm, **ϵ_{280}** el coeficient d'extinció molar (19 M⁻¹ cm⁻¹ per la carboxipeptidasa B) a la mateixa longitud d'ona i amplada del pas de llum de l'espectrofotòmetre (cm).

2.7 Seqüenciació de proteïnes mitjançant espectrometria de masses

Les fraccions que provenen de la cromatografia d'afinitat PCI, foren analitzades mitjançant electroforesi SDS-PAGE (12,5 %), seguida de tinció amb *Comassie Blue Coloidal* seguint el següent protocol:

Protocol:

1. Posar el gel en solució de fixació ON.
2. Mesclar 4 parts de solució de tinció preparada recentment amb una part de metanol.
3. Incubar el gel fixat en almenys 100 ml d'aquesta solució durant 3 hores més (s'obtenen millors resultats si la duració és de dies).
4. Destenyir el gel amb aigua MiliQ canviant-la varies vegades (si la tinció és molt forta es pot afegir fins un 20% de metanol).

Solució Fixació:

Metanol	40 %
Ac. Acètic	10 %
Aigua MiliQ	

Solució A:

Àcid ortofosfòric	2 % (P/V)
Sulfat d'amoni	10 % (P/V)
Aigua MiliQ	

Solució B:

Serva Blue G250	5 % (P/V)
-----------------	-----------

Aigua MiliQ

Solució Tinció:

- Solució A 98 % (V/V)
- Solució A 2 % (V/V)
- Deixar agitant ON

Les proteïnes detectades després de la tinció amb *comassie coloidal*, foren retallades manualment del gel i analitzades en el servei de proteòmica del Parc Científic de Barcelona (PCB-UB). De cada mostra, es realitzà una reducció amb DTT i una posterior digestió amb tripsina durant una nit a 37 ° C. Els diferents pèptids generats foren extrets amb acetonitril/trifluoroacètic. Les proteïnes foren identificades per mapeat peptídic, i un subseqüent anàlisi de l'espectre de fragmentació peptídica mitjançant:

- 1) **MALDI-TOF/TOF-MS** (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) emprant un 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF-MS (Applied Biosystems).
- 2) Cromatografia líquida (**HPLC**) combinada a espectrometria de masses amb font nanoelectrospray (Digestió-nanoLC-MS/MS) emprant un HPLC per a nanoflux capLC (Waters).

Els espectres de massa obtinguts, es llançaren contra les bases de dades de seqüències de proteïnes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nih.gov/>) a través del servidor Matrix Science (<http://www.matrixscience.com/>). A continuació es mostra el format de la pàgina on s'analitzen els resultats obtinguts amb aquesta cerca indicant-se detalladament la informació generada.

Mascot Search Results

User : Proteomica PCB
 Email : bellido@act.ub.es
 Search title :
 MS data file : D:\Projecta\Digestion70.PB0\FPKLfiles70\Diges64_F0_F3_1.ph1
 Database : HCDIns 20061021 (4072503 sequences: 1402384053 residues)
 Timestamp : 25 Oct 2006 at 12:21:37 GMT
 Significant hits: [q1139940786](#) hypothetical protein M004047.4 [Magnaporthe oryzae 70-15]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 49 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Peptide Summary Report

Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits 20
 Standard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off 0 Show sub-sets
 Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Query	Observed	Hr (exp1)	Hr (calc)	Delta Hires	Score	Expect	Rank	Peptide
5	468.7711	977.5776	977.5753	-0.0476	0	0.23	1	K.LLELVVEH.S
7	522.7134	1043.4122	1043.5036	-0.0913	0	5.5	2	K.HFEDPELHK.V
8	525.7333	1049.4520	1049.5505	-0.0984	0	1.1e-05	1	K.TIFGGAVLHSGE.H
9	536.7544	1071.4942	1071.5209	-0.0267	0	0.063	1	K.HDGGELASGK.V
10	557.7638	1102.5130	1102.5672	-0.0541	0	0.036	1	K.AFFHGAISHK.E
11	613.7479	1225.4812	1225.6102	-0.1490	0	0.009	1	K.GLETQVNYTHPK.I
12	622.7952	1243.5750	1243.6556	-0.0806	0	6.2	1	K.GLEDFDFEIK.V + oxidation (M)
13	672.8099	1343.6452	1343.6550	-0.0097	0	2.6	1	K.HFDLMDLHK.E
14	745.3008	1480.5802	1480.6521	-0.0658	0	0.14	1	K.VFGEVSSDNR.D
15	712.7132	2135.1178	2135.1949	-0.0772	1	0.44	1	K.GLDTQVYTHPKLLSVVEH.S
17	873.7026	2610.0860	2610.1812	-0.0952	0	60	1	K.IYDVSASLYVFEASDDYAFK.H

MATERIALS I MÈTODES

A: S'indica l'usuari, l'e-mail, la base de dades emprada (NCBIInr), la data i els resultats significatius.

B: Puntuació general o score = $10 \cdot \log(P)$, on P és la probabilitat de que el resultat obtingut sigui un esdeveniment a l'atzar. Puntuació individual o individual scores > 49 indiquen identitat o alta homologia ($p < 0.05$).

C: La zona marcada en verd indica la regió amb un score menor a 49 i per tant fora de l'interval significatiu.

D: Proteïna identificada

E: Paràmetres per a la cerca (per defecte). Probabilitat amb significació de $p < 0.05$. Es mostren les 20 cerques amb millor *score*.

F: Pèptids identificats de la proteïna amb major *score*.

G: Pes molecular esperat i calculat dels diferents pèptids identificats.

H: Puntuació o *score* dels diferents pèptids identificats.

3 MÈTODES DE TRANSFORMACIÓ D'ARRÒS

Els mètodes de transformació d'arròs foren aplicats a les varietats *japonica* Sènia i Ariete d'*Oryza sativa*

3.1 Desinfecció de grans d'arròs:

Protocol:

5. Decorticar les llavors sanes d'arròs.
6. Submergir-les en alcohol al 70% durant 1 minut sota la cambra de flux laminar i en condicions d'esterilitat.
7. Transferir les llavors a un tub *falcon* de 50ml que contingui hipoclorit sòdic al 30% amb H₂O destil·lada. Es pot afegir una gota de Tween 80.
8. Mantenir 30 minuts, amb agitació contínua (agitació orbital 100 rpm)
9. Fer 3-4 rentats amb H₂O destil·lada estèril.
10. Deixar 1h amb H₂O destil·lada estèril.
11. Fer 3-4 rentats amb H₂O destil·lada estèril.
12. Assecar les llavors posant-les sobre un paper de filtre estèril.

3.2 Inducció de calls embriogènics a partir de l'escutel de l'embrió zigòtic madur

Protocol:

1. 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.
2. Incubar les plaques a 28°C i a la foscor durant 4-5 setmanes (30-35 dies).
3. 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. Aquesta selecció es fa amb lupa. El call primari no és transferit però pot ésser conservat en la mateixa placa durant 2-3 setmanes, ja que pot donar noves unitats embriogèniques.
4. Incubar les unitats embriogèniques recuperades a 28°C i a la foscor durant 14 dies.
5. Després d'aquest període, les unitats embriogèniques hauran proliferat en tres tipus de formacions:
 - 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.
 - unitats esfèriques que presenten la superfície rugosa i de talla entre 0,8-1,6mm que seran utilitzades per a la transformació.
 - calls de forma més complexa i de talla superior a 2mm que seran eliminats.
6. 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 descrites, que seran utilitzades 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.

MATERIALS I MÈTODES

3.3 Transformació per *Agrobacterium*

3.3.1 Selecció i preparació de les unitats embriogèniques per la transformació amb *Agrobacterium*

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 resisteixen 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 estan diferenciats i s'han d'evitar.
- Color: les unitats han de ser blanques i opaques. Els calls translúcids, beige o grogosos s'han d'eliminar.
- Textura: els calls han de ser compactes i resistents a les pinces.

Uns 4 dies abans es trien els millors calls que es varen passar a medi NB2 2 setmanes abans, i es passen a medi NB fresc. 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 3.3.1.

3.3.2 Cocultiu amb *Agrobacterium*:

Protocol:

1. Inocular *Agrobacterium* en medi **AB sòlid** (CIRAD, veure apartat 4.1) o en medi **YEB** (CSIC-IRTA, veure apartat 4.1) complementat amb els antibiòtics corresponents a la soca (en el nostre cas kanamicina i rifampicina) i deixar créixer 3 dies a 28°C. En general es preparen 2 plaques.
2. Recollir els bacteris amb una espàtula i resuspendre en 30-50ml de medi líquid de cocultiu R2L fins una D.O.₆₀₀ entre 0.7 i 1. ($3 \cdot 5 \times 10^9$ cèl·lules/ml = 1 de D.O.₆₀₀).
3. Passar la suspensió a una placa de Petri i submergir-hi els calls (100 per cada construcció) durant 15 min.
4. Assecar els calls, d'un en un, fent-los rodar suaument per sobre d'un paper de filtre esterilitzat (fins que presentin una aparença seca).
5. Disposar 10-12 calls per placa de medi sòlid de **cocultiu R2-CS**, segellar amb *Parafilm* i incubar durant 3 dies a 25°C, a la foscor.

3.3.3 Selecció dels calls resistents a l'higromicina:

Protocol:

1. Disposar els calls cocultivats en medi de selecció R2S i incubar 12 dies en foscor a 28°C
2. Controlar freqüentment el creixement bacterià, si hi ha massa proliferació d'*Agrobacterium*, passar els calls no contaminats a nou medi i llençar els altres.
3. Canviar de medi quant aquest es torni groc/marró degut a l'excés dels compostos polifenòlics alliberats
4. Passats els 12 dies, els calls es passen a plaques amb medi NBS, i són incubats a 28°C i obscuritat durant 3 setmanes. Durant aquest període es disgregaran els calls que creixen sobre els calls transformats originaris (necrosats) i es disposaran al voltant.
5. Es comença el procés de regeneració dels calls transformats transferint-los a plaques amb medi **PR-AG**. Incubar a 28°C i obscuritat, durant 8 dies.
6. Transferir els calls a plaques amb medi **RN** (no més de 10 calls) i incubar-los a 28°C, durant 2 dies a l'obscuritat, seguits de 3-4 setmanes de 12h/12h de llum/dia.
7. Els calls que s'han tornat verdosos i que han desenvolupat tija, són transferits a tubs de cultiu *Magenta* amb medi d'arrelament.

8. Les plantes joves seran transferides a aclimatar-se a l'hivernacle quan les seves fulles arribin al tap del tub de cultiu *Magenta* i tinguin un bon desenvolupament d'arrels.
9. Es tallen uns mm-cm de fulla i d'arrel, es renten les arrels de *Phytigel* i es transfereixen les plantes a testos en dispositius d'aclimatació als hivernacles.
10. Es deixen 1 setmana en ambient humit (amb inundació) en aquests dispositius tancats, seguit d'una setmana amb una obertura de 5 cm. A la tercera setmana es destapen completament els dispositius d'aclimatació i es passen a les taules dels hivernacles fins a planta adulta.

Medis per la transformació

Components bàsics:

Macroelements N6 (Chu et al., 1975):

KNO ₃	2830 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	463 mg/L
KH ₂ PO ₄	400 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	165 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185 mg/L

Microelements B5 (Gamborg et al., 1968):

MNSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
H ₃ BO ₃	3 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg/L
KI	0,75 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg/L

Vitamines B5 (Gamborg et al., 1968):

Àcid nicotínic	1 mg/L
Piridoxina HCl	1 mg/L
Tiamina HCl	10 mg/L

Medis

Medi BASIC :

Macro N6 (20x)	50 ml/l
Micro B5 (100x)	10 ml/l
Vitamines B5 (100x)	10 ml/l
FeEDTA (100x)	10 ml/l
Inositol	100 mg/L
Prolina	500 mg/L
Glutamina	500 mg/L
Hidrolisat de caseïna	300 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	2,6 g/l

Medi NB:

Medi BASIC	
2,4-D (auxina)	2 mg/L
pH 5,8 (KOH)	

Medi bàsic R2:

MATERIALS I MÈTODES

Macro R2	100 ml/l
Micro R2	1 mL/L
Tiamina	1 mL/L
FeNaEDTA	10 mL/L

Medi líquid de cocultiu R2-CL:

Medi bàsic R2	
Glucosa	10 g/L
2,4-D	2,5 mg/L
Acetosyringone*	19,62 mg/L (100 µM)
pH 5,2	

Medi sòlid de cocultiu R2-CS:

Medi líquid de cocultiu R2L	
Agarosa tipus I	7 g/L
pH 5,2	

Medi de selecció R2S:

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 (KOH)	

Medi NBS:

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 (KOH)	

Medi PR-AG:

Medi BASIC	
Cefotaxime*	100 mg/L
Vancomicina*	100 mg/L
Higromicina*	50 mg/L
ABA*	5 mg/L
BAP*	2 mg/L
ANA*	1 mg/L
Agarose type I	7 g/lL
pH 5,8	

Medi RN :

Medi BASIC	
BAP*	3 mg/L
ANA*	0,5 mg/L
pH 5,8	
PhytageI	4,5 g/L

Medi Arrelament :

MS (sals i vitamines, Duchefa)	4,4 g/L
Sacarosa	50 g/L
pH 5,8 (KOH)	
PhytageI	2,6 g/L

*no es pot autoclavar

3.4 Selecció de plantes transgèniques homozigòtiques

Aquest protocol ha estat posat emprat per al cribatge de línies d'arròs homozigòtiques transformades (generació T2), mitjançant l'ús de l'agent de selecció Higromicina.

El procés s'inicia a partir de 16 llavors obtingudes de la primera generació de plantes transformades (T1).

Protocol:

1. Desinfectar les llavors d'arròs a analitzar amb l'assaig (**apartat 3.1 , Mètodes**).
2. Es dipositen les llavors individualment en tubs de cultiu *Magenta* (60 mL), i es deixen germinar en medi MS (8 mL/tub) (**apartat 4.3 , Materials**) en la cambra de germinació ($27 \pm 2^\circ$ C, 12h/12h de llum).
3. Passats 4-5 dies es passen (un mínim de 12 plàntules per línia) a nous tubs *Magenta* amb 8 mL de medi MS amb higromicina (50 mg/L).
4. Es marca l'alçada de la planta en el tub i es deixa créixer en les mateixes condicions que abans.
5. Passats 7 dies es comprova l'evolució de les plàntules, considerant-se com a resistents aquelles que presenten un aspecte sa i un creixement significatiu (en aquestes condicions les plàntules arriben al tap del tub).

4 OBTENCIÓ DE CREUAMENTS D'ARRÒS

Aquest protocol ha estat posat a punt amb la Dra. Pilar Fontanet del servei d'hivernacles del IBMB-CSIC.

Es van realitzar tres sembres escalonades en intervals d'una setmana amb 30 plantes de cada línia per sembra. Es va utilitzar la línia 7.34 ubi:pci (generació T3) com a "donadora" (♂) i la línia 24.6 ubi:mpi com a "receptora" (♀), en ambdós casos en fons Ariete.

Metodologia:

- Es fa un seguiment visual de les plantes per tal de detectar els estadis inicials de floració (això s'aconsegueix mirant a contrallum la fulla bandera que envolta la futura espiga). Un cop les plantes arriben a aquest estadi, s'obra la fulla per tal de deixant l'espiga al exterior. Es comprova també a contrallum l'alçada de les anteres (6 per flor) i seguidament es talla l'embolcall o "gluma" deixant la flor al descobert.
- Castració: S'extrauen amb pinces les anteres immadures (que presenten un color blanquinós i un aspecte melós), s'embossen i etiqueten les espigues que s'acaben de buidar amb la data de castració (C). Cal realitzar aquest procés amb molta cura per tal d'evitar danyar l'ovari (o els pistils). També es realitza un control de castració que s'embossa igualment però, no serà fecundat.
- Un cop castrades les flors de les plantes receptores (♀), cal seleccionar les plantes donadores (♂) en funció de la maduresa de les seves anteres. En general, es consideren madures quan les anteres

MATERIALS I MÈTODES

presenten una coloració groguenca. Les anteres es recullen amb compte i es dipositen en plaques de petri.

- Fecundació: Entre els 1-3 dies post-castració, es fecunden les plantes amb el pol·len recuperat de les plantes donadores (♂). Amb l'ajuda d'un pinzell i procurant no danyar els ovaris de les plantes receptores (♀), es dipositen les anteres madures individualment a cada flor.

5 **BIOASSAIGS AMB INSECTES**

5.1 **Obtenció de *Chilo suppressalis***

5.1.1 *Captura d'adults de Chilo suppressalis*

Amb l'objectiu d'obtenir una població de *Chilo suppressalis* (Walker) que garantís el nombre de larves necessàries per dur a terme el bioassaig, es varen realitzar un total de sis expedicions als arrossars de la Camarga (Sambuc, França) i una sortida al Delta de L'Ebre (Muntmell, Amposta). Les parcel·les de la Camarga, cedides pel "Centre Français du Riz" (www.riz-de-camargue.com), no havien estat tractades prèviament amb pesticides ni fungicides. Les sis captures es realitzaren la darrera setmana d'agost en ple 2on vol de *C. suppressalis* (veure Figura 3 d'Introducció). Les parcel·les del Delta més adients per la captura foren indicades per la Associació Defensa dels Vegetals del Delta de l'Ebre (ADV).

Metodologia:

- Prèviament a les sortides, es varen tenir en compte factors meteorològics com el vent i les precipitacions (els adults eviten el vol en condicions de vent moderat o fort i pluja), i la lluna plena (competència amb el sistema d'atracció per llum) per tal d'evitar que interferissin en la captura .
- El dispositiu de captura va consistir en una tela blanca de 2.5m x 2.5m , 2 vares metàl·liques de 2.5m d'alçada, dues bombetes de llum mixta (160 W) i un generador (de 500 Watts de potència).
- El dispositiu es va situar en la perifèria dels arrossars (aprox. 1 m) a favor de la direcció del vent, aixecant la tela subjectada i estesa amb les dues vares metàl·liques i col·locant les 2 bombetes en la part superior encarades al arrosar. Les papallones atretes per la llum es dipositen sobre la tela blanca, i és en aquest moment quan es capturen amb els aspiradors entomològics i es transfereixen a les caixes per adults.

5.1.2 *Obtenció de larves de Chilo suppressalis*

Metodologia:

- Un cop obtinguts 287 adults, aquests foren transferits a caixes d'aparellament en una proporció de 5 mascles per cada 7 femelles. A l'interior de les caixes es varen dipositar papers estèrils d'uns 15-20 cm amb plec (simulant les fulles d'arròs) per tal de facilitar les postes de les femelles i la seva posterior recollida. Les caixes s'identificaven amb un número, la data de recollida dels adults i el número de mascles i femelles.

- Les condicions per la cria de *Chilo suppressalis* en laboratori foren: 26.5°C de temperatura, 70-75 % d'humitat i un fotoperíode de 18 h de llum.
- Un cop recollides les postes, aquestes es guardaren en funció de la data de recollida a 15°C, 19°C o 22°C (en foscor) per tal de sincronitzar-les. Cal dir que les postes recents presenten un color blanquinós, que passa a groc-taronjós en estadis més avançats i a marró-negre just abans de l'eclosió. Aquest desenvolupament depèn de la temperatura, essent d'uns 3-4 dies a 27 °C en foscor i amb 75% d'humitat relativa, i retardant-se amb el fred.
- Un cop les postes assolien el color fosc previ a l'eclosió, eren retallades del paper i esterilitzades de la següent forma:
- S'agafen amb pinces (amb compte de no danyar-les) i es passen un segons per una placa Corning 50 estèril amb hipoclorit sòdic (8 gotes en 100 ml d'H₂O MiliQ autoclavada), seguit de dos rentats en plaques amb H₂O MiliQ autoclavada. Seguidament s'eixuga l'excés d'H₂O dipositant les postes en un paper de filtre esterilitzat.
- Les postes es dipositaren en gasses estèrils dins de plaques amb medi nutritiu. Cal procurar que la gassa no quedi molt estirada per tal d'evitar que les postes toquin la tapa de la placa (on pot haver condensació d'aigua) però el suficient per què tampoc tingui contacte amb el medi.
- Les plaques es deixaren parcialment en foscor fins a l'eclosió, només permetent una petita entrada de llum per la part inferior per tal d'atreure així les larves neonates cap el medi nutritiu. Les larves es poden mantenir en aquestes condicions fins a l'estadi L4 a 27°C.

5.2 Bioassaig amb *C. suppressalis*

Protocol:

1. S'infesten les plantes en estadi de floració amb larves en estadi L2. És necessari utilitzar un pinzell humit per a manipular-les sense danyar-les. Es dipositen les 4 larves separant la 2a-3a fulla en el punt on s'uneix a la tija.
2. Es col·loquen les plantes a les taules amb molt de compte de no fer moviments bruscs, ja que les larves podrien desprendre's.
3. Després d'aproximadament 2 setmanes d'infestació (*), es recuperen les larves de l'interior de les tiges, obrint amb un bisturí longitudinalment tota la planta per recuperar-les. Les larves es pesen individualment en una balança de precisió.
4. Si es requereix l'estudi dels intestins, s'extrauran amb l'ajut d'una lupa binocular i pinces especials d'entomologia.
5. La larva es situa en un vidre de rellotger en solució fisiològica (NaCl 0,9%), mantinguda en gel (que actua com anestèsia suau per a la larva).
6. S'extreu l'intestí, es congela en N₂ líquid i es guarda a -80°C, fins a la seva utilització (Apartat B 2.1.2).

(*) Condicions concretes del bioassaig:

- o **Bioassaig per avaluar l'efecte de l'expressió dels diferents transgens en plantes d'arròs, en el pes i desenvolupament de larves de *Chilo suppressalis*** : Es disposà de 21-27 plantes transgèniques per línia (3 plantes per test de 2 L). Els testos es varen disposar en files de 6-7 testos a les taules d'una cèl·lula dels hivernacles prèviament desinfectada. S'infestaren a raó de 4 larves L2 per planta. La duració total del bioassaig fou de 15 dies.

MATERIALS I MÈTODES

- **Bioassaig per avaluar la resistència a la infestació de plantes d'arròs transgèniques:** Es disposà de 12-18 plantes transgèniques (3 plantes per test) agrupades en dispositius entomològics per línia. S'infestaren a raó de 4 larves L2 per planta. La duració total del bioassaig fou de 18 dies.

5.3 Assaigs amb *Spodoptera littoralis*

Les larves de *S. littoralis* han estat cedides pel grup de la Dra. G. Rosell de l'Institut d'Investigacions Químiques Ambientals (IIQAB-CSIC, Barcelona).

Pels assaig d'alimentació de *S. littoralis*, es van emprar fragments de aproximadament 3 cm de longitud de la segona fulla de plantes transgèniques d'arròs i plantes Ariete control no transformades. Els fulles trossegades es disposaren sobre paper de filtre humit en caixes de plàstic de 5 cm de diàmetre. Les larves de *S. littoralis* (estadi L2) es deixaren prèviament 2 h en dejú abans de l'assaig. El material foliar emprat en els assaigs fou renovat diàriament. La determinació del pes individual de cada larva, així com la superfície foliar consumida es realitzà cada 24 h durant els 4 dies de duració de l'assaig. Es va calcular l'àrea total consumida per cada caixa mitjançant l'ajuda del software d'anàlisi d'imatges Quantity One (BioRad). Cada experiment fou realitzat 3 vegades amb 3 línies homozigòtiques independents (línies 7.34, 9.1 i 2.13).

6 ASSAIGS D'ACTIVITAT ANTIFÚNGICA

6.1 Assaigs de l'activitat antifúngica *in vitro*

Per *Magnaporthe grisea*, es parteix d'una petita porció de paper de filtre amb el fong. Aquest s'obté fent créixer el fong sobre el paper de filtre dipositat sobre una placa amb medi d'arròs. Una vegada el miceli ha ocupat tot el paper de filtre, es treu del medi i es deixa assecant dins d'una placa de petri buida, a 37°C durant 7 dies. Quan el filtre està sec, es talla en petits trossos amb unes tisores estèrils i es guarda a -20°C.

Protocol:

1. Créixer els fongs en plaques d'agar amb la temperatura i el medi adequats (veure taula) durant aproximadament 2 setmanes (fins que el miceli del fong ocupi tota la placa).

Espècie	Temperatura	Medi (*)
Fusarium spp.	28°C	PDA
Magnaporthe grisea	28°C	Arròs

(*) veure apartat 4.2 per la composició del medi

2. Afegir 5 ml d'H₂O estèril a la placa i passar suaument per sobre una nansa de sembres esterilitzada, per tal de desprendre les espores del miceli.
3. Recollir les espores amb una pipeta, filtrar amb *Miracloth* (Calbiochem) estèril i comptar el nombre d'espores amb una càmera *Burker*.
4. Diluir amb H₂O estèril a la concentració de 1x10⁶ espores/ml.
5. En una placa d'ELISA (96 pous), afegir:
 - 100 µl medi PDA líquid (amb 0,03 µg/l de cloramfenicol)
 - 50 µl d'espores a la concentració citada.
6. Incubar 6h el fong a 28°C amb llum

7. Afegir l'extracte proteic o proteïna a assajar a diferents concentracions (fins a 50 µl en el mateix buffer). Es realitzaren tres rèpliques per mostra en cada assaig.
8. En els controls negatius s'hi afegeix *Nystatin* (a 0,1 µg/µl, *Sigma*) que és un agent fungicida.
9. Llegir la D.O. a 595 nm, prenent aquesta lectura com a t=0h
10. Incubar la placa (a 28°C amb fotoperíode de 12h de llum) i llegir a 16, 20, 24 i 48h.

6.2 Assaigs de resistència a fongs patògens en arròs

6.2.1 Assaig de resistència a *M. grisea* en planta sencera.

En el present estudi s'utilitzaren plantes d'arròs de la varietat Sènia i Ariete crescudes fins a l'estadi de 4 fulles, a raó de 4 a 6 plantes per test. S'obtingueren espores del fong *Magnaporthe grisea* mitjançant el mètode descrit a l'apartat 6.1 (Pas 1 a 3).

Protocol:

1. Preparar una suspensió d'espores a 10⁴ espores/mL i 0,02% de Tween 20.
2. Les plantes són inoculades (5 mL per test) amb aquesta suspensió mitjançant un dosificador d'aspersió, ruixant fins a cobrir les fulles de les plantes de manera homogènia. És important que la superfície de la fulla no s'assequi ràpidament, ja que les espores no podrien germinar. Les plantes control són ruixades de la mateixa manera però amb H₂O estèril.
3. Es fa un seguiment visual del desenvolupament dels símptomes de la infecció al llarg del temps (fins a les 6 setmanes), realitzant-se fotografies. Les primeres lesions solen aparèixer en les plantes control 7 dies després de la inoculació.

6.2.2 Assaig de resistència a *M. grisea* en fulla tallada.

S'utilitzaren plantes de 15 dies crescudes als hivernacles. Es talla la segona fulla de cada planta i es disposen en plaques de kinetina, a raó de 9 fulles per placa. Per aquest assaig es van utilitzar espores de *M. grisea* a concentracions de 10⁴, 10⁵ i 10⁶ espores/mL i s'inoculà amb cada concentració la segona fulla de cada planta (un total de 3 fulles per suspensió d'espores i línia). Es deixen les plaques de kinetina en cambra de creixement dos dies en obscuritat. Seguidament es sotmenten a fotoperíode de 16h de lum / 8h de foscor, a 27 °C.

6.2.3 Assaig de resistència a *Fusarium verticillioides*

Protocol:

1. Desinfectar les llavors d'arròs a analitzar amb l'assaig (**apartat 3.1, Mètodes**).
2. Dipositar 16 llavors (en gerres de germinació d'arròs de 1L), amb uns 100 mL de medi MS sense sacarosa.
3. Creïxer el fong en plaques de PDA (**apartat 4.2, Materials**) a 28 °C durant aproximadament 2 setmanes (fins que el miceli del fong ocupi tota la placa).
4. Afegir 5 ml d'H₂O estèril a la placa i passar suaument per sobre una nansa de sables esterilitzada, per tal de desprendre les espores del miceli.
5. Recollir les espores amb una pipeta, filtrar amb *Mira cloth* (Calbiochem) estèril i comptar el nombre d'espores amb una càmera *Burker*.
6. Diluir amb H₂O estèril a la concentració de 1x10⁷ espores.
7. Submergir les llavors en la suspensió de 1x10⁷ espores durant 20 min i assecar amb paper de filtre estèril.

MATERIALS I MÈTODES

8. Dipositar 16 llavors (en gerres de germinació d'arròs de 1L), amb uns 100 mL de medi MS sense sacarosa.
9. Deixar en la cambra de germinació ($27 \pm 2^\circ \text{C}$, 18h/6h de llum).
10. Observar el fenotip als 7-9 dies.

6.2.4 Tinció amb els colorants "sytox green" i "congo red" de cultius de *M.grisea* i microscopia confocal

Protocol:

1. Es pre-germinen 50 μL d'espores (10^6 espores/mL) en 150 μL de PDA en una placa de microtitulació durant 6h a 28°C .
2. S'afegeix la proteïna PCI a la concentració adequada i s'incuba 18h a 28°C . Com a control positiu s'utilitza la proteïna BSA (10 μM), i com a control negatiu la proteïna nistatina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
3. Després d'aquest període d'incubació s'afegeixen 8 μL de verd *Sytox* o "*Sytox green*" (*Sigma*) a 5 μM (concentració final a 0,2 μM), i 2 μL de vermell Congo o "*Congo red*" (*Sigma*) a 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (concentració final a 1mM).
4. Es deixa 20 minuts a temperatura ambient en agitació suau.
5. Es col·loquen 10 μl per mostra en un porta i s'observa al microscopi confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemanya), amb longituds d'onda de 488 nm d'excitació i 500-554 nm d'emissió pel verd *Sytox*, i de 543 nm d'excitació i 560-635 nm d'emissió pel vermell *Congo*.

6.3 Marcatge de la proteïna PCI amb fluorocroms Alexa-488 i 568, i microscopia confocal

Pel marcatge del PCI amb el fluorocrom comercial Alexa (488 i 568) (*Molecular Probes*) es van seguir les instruccions del fabricant. Es dissolgueren 0,25 mg de PCI recombinant (cedit pel grup del Dr. F.X Avilés) en 160 μL de bicarbonat sòdic 100 mM, pH 8,3. A aquesta solució se li afegiren 5 μL de fluorocrom Alexa (488 o 568) prèviament dissolt en DMSO (10 mg/mL). La mescla s'incubà a TA durant 5-6 hores en foscor. Un cop transcorregut aquest temps, es guarda la proteïna a 4°C fins a la seva utilització.

El protocol per al marcatge *in vitro* de cèl·lules de *M. grisea* amb el PCI-Alexa (488 o 568) es realitza tal i com s'explica en l'apartat **6.2, passos 1-6 (Mètodes)**. A partir d'aquest punt, es deixà un període d'incubació de 16 h, i seguidament es realitzà un marcatge de PCI-Alexa(488 o 568) a una concentració de 40 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$.

Després d'aquest període d'incubació es deixa 30 minuts a TA en agitació suau i foscor.

Es col·loquen 10 μl per mostra en un porta i s'observa al microscopi confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemanya), amb longituds d'onda de 495 nm d'excitació i 519 nm d'emissió pel Alexa-488 (verd), i de 577 nm d'excitació i 603 nm d'emissió pel Alexa-568 (vermell).

7 **ASSAIGS AMB BACTERIS**

7.1 Assaigs de resistència a *Erwinia chrysanthemi*

Protocol

1. Desinfectar les llavors d'arròs a analitzar (**apartat 3.1, Mètodes**).
2. Dipositar 16 llavors (en gerres de germinació d'arròs de 1L), amb uns 100 mL de medi MS sense sacarosa.
3. Germinar les llavors 24 h.
4. Prèviament, créixer el bacteri en 3 ml de medi de cultiu King (**apartat 4.1, Materials**) a 30 °C 12-24 h (fins obtenir una DO d'entre 1 i 1,5).
5. Afegir 100 µl de cultiu per llavor i deixar 5 min aplicant el buit a les gerres lleugerament destapades.
6. Deixar en la cambra de germinació (27 ± 2° C, 18h/6h de llum).
7. Observar el fenotip als 6-8 dies.

8 **ASSAIGS AMB VIRUS**

8.1 Assaig de resistència de plantes d'arròs al *Rice yellow mottle virus* (RYMV):

L'assaig es va du a terme als hivernacles de tipus S2 de l'IRD de Montpellier (França).

Totes les línies transgèniques (NPR1) i les diferents varietats control no transformades (Sénia, Nipponbare, Azucena, Gigante-VRAC i IR64) foren sembrades en "safates" individuals amb 100 plantes cadascuna.

S'inocularen les 7 primeres files de plantes (70 plantes) de cada safata amb partícules virals de l'aïllat BF1 (10mg/ml) diluït en tampó fosfat 20Mm pH=7 en presència de *carborúndum*.

Protocol:

1. Es col·loquen les safates de cada línia (o varietat) a la taula de treball dels hivernacles i s'empolsequen lleugerament amb *carborúndum* les fulles de totes les plantes, procurant que sigui de la manera més homogènia possible.
2. S'inoculen les plantes passant suaument 2 vegades els dits molls amb l'inòcul viral per les fulles. Es repeteix aquest procés per a totes les línies (o varietats).
3. Les plantes control de cada línia (o varietat) són tractades de la mateixa manera però només amb tampó fosfat 20Mm pH=7.
4. Es recullen mostres de fulles tant inoculades com control, de cadascuna de les línies (o varietats) a diferents temps: 7, 14, 21, 28 DPI (Dies Post Inoculació). Es prenen a l'atzar en cada recollida 10 fulles inoculades i 6 control per cada temps i línia (o varietat).
5. Es realitza un seguiment visual i fotogràfic del desenvolupament dels símptomes.

8.2 Anàlisi de la càrrega viral:

La cinètica d'acumulació del virus RYMV en les plantes ha estat realitzada mitjançant el test DAS-ELISA segons el mètode adaptat de Clark i Adams (1977).

MATERIALS I MÈTODES

Protocol:

1. Recobriments: diluir l'Anticòs (Ac) en tampó "Coating" (Carbonat) pH 9.6, dipositant 100 µL per pou (en els 60 pous del mig). En el nostre cas, l'Ac és IgGs anti RYMV Mg purificat (1/1000). Seguidament, incubar 2h a 37°C en un ambient humit (posar les plaques en una caixa amb papers humits).
2. Rentats: rentar els 60 pous del mig de la placa. Fer un rentat ràpid seguit de 3 rentats de 3 min amb PBST. Assecar les plaques.
3. Bloqueig: dipositar 200 µL de llet en pols desnatada al 3% en PBST per pou (en tota la placa). Seguidament, incubar 1 h a 37°C.
4. Rentats: rentar tots els pous de la placa. Fer un rentat de 3 min amb PBST. Assecar les plaques.
5. Dipòsit dels Antigenes: dipositar 100 µL per pou (en els 60 pous del mig). En el nostre cas, els antigenes són les extraccions de fulla d'arròs en PBST a 1/10, 1/100 i 1/1000 (Centrifugades 5 min a 8000g). Seguidament, incubar 2 hores a 37°C o bé, durant una nit a 4°C.
6. Rentats: rentar els 60 pous del mig de la placa. Fer un rentat ràpid seguit de 3 rentats de 3 min amb PBST. Assecar les plaques.
7. Dipòsit de l'Ac conjugat: dipositar 100 µL d'anticòs conjugat diluït en PBST per pou (en els 60 pous del mig de la placa). En el nostre cas, l'Ac conjugat és Ac RYMV mg conjugat a la Fosfatasa alcalina diluït 1/1000. Seguidament, incubar 2 hores a 37°C o bé, durant una nit a 4°C.
8. Rentats: rentar els 60 pous del mig i la fila sencera de dalt de la placa. Fer un rentat ràpid seguit de 3 rentats de 3 min amb PBST. Assecar les plaques.
9. Dipòsit del substrat: dissoldre les pastilles de pNPP en tampó Dietanolamina pH 9.8 (1 pastilla per 5 ml de tampó) i dipositar 100 µL per pou en els 60 pous del mig i la fila sencera de dalt. Seguidament, incubar en foscor i a temperatura ambient. Fer dues lectures de DO a 405 nm, la primera als 30 min i la segona, passada una hora.

Solució Rentat :

PBST (10X) 0,05 %

9. INFECCIÓ DE PLANTES DE PATATA AMB *P. INFESTANS*

S'utilitzaren plantes de un mes i mig crescudes als hivernacles. Per a l'obtenció d'espores del fong *P. infestans*, es créixer el fong en plaques de medi V8 (**apartat 4.2**) durant aproximadament 2 setmanes a 18 °C (fins que el miceli del fong ocupi tota la placa). A partir d'aquest punt es va seguir el següent protocol:

Protocol:

1. Afegir 5 ml d'H₂O estèril a la placa i passar suaument per sobre una nansa de sèmres esterilitzada, per tal de desprendre les espores del miceli.
2. Recollir les espores amb una pipeta, filtrar amb Miracloth (*Calbiochem*) estèril i comptar el nombre d'espores amb una càmera *Burker*.
3. Diluir amb H₂O estèril a la concentració de 1x10⁶ espores/ml.
4. Preparar una suspensió d'espores a 10⁵ espores/mL.
5. Les plantes són inoculades (5 mL per test) amb aquesta suspensió mitjançant un dosificador d'aspersió, ruixant fins a cobrir les fulles de les plantes de manera homogènia. És important que la superfície de la fulla no s'assequi ràpidament, ja que les espores no podrien germinar. Les plantes control són ruixades de la mateixa manera però amb aigua estèril.
6. Es fa un seguiment visual del desenvolupament dels símptomes de la infecció al llarg del temps, realitzant-se fotografies fins a les 3 setmanes de la inoculació. Les primeres lesions solen aparèixer en les plantes control 6-8 dies després de la inoculació.

10. ESTRESOS ABIÒTICS

10.1 Tractaments de salinitat i sequera

10.1.1 Salinitat

Es disposà de 72 plantes transgèniques per línia (6 plantes per test) que es varen germinar i créixer als hivernacles durant dues setmanes. Els testos es varen col·locar en safates independents per cada un dels tractaments de (0, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM i 250 mM de NaCl) a raó de 2 testos per cada línia transgènica i la varietat Sènia no transformada. Es varen créixer durant 17 dies, mantenint-les a continuació submergides en una solució amb les diferents concentracions de sal comentades durant 5 dies. Passat aquest període, es recuperaren les plantes mantenint-les amb rec normal durant dues setmanes, i es va seguir el seu desenvolupament. Les plantes control (Sènia) no transformades es van sotmetre als mateixos tractaments.

10.1.2 Sequera

Seguint la mateixa metodologia anterior, es disposà de 24 plantes transgèniques per línia (8 plantes per test) germinades i es varen créixer les plantes als hivernacles durant 17 dies. Els testos es varen col·locar en safates independents, una amb reg normal i l'altre sense reg, i es deixaren sense en aquestes condicions durant 9 dies. Passat aquest període, es recuperaren les plantes mantenint-les amb rec normal durant dues setmanes, i es va

MATERIALS I MÈTODES

seguir el seu desenvolupament. Les plantes control (Sènia) no transformades es van sotmetre als mateixos tractaments.

11. TINCIONS HISTOQUÍMIQUES

11.1 Determinació de l'ió superòxid O₂⁻ (tinció amb NBT)

Protocol:

1. Es tallen seccions de fulles d'arròs d'aproximadament 4 cm de longitud.
2. Mitjançant una campana de buit, s'infiltra aquestes seccions amb una solució que conté 10 mM Tampó Fosfat pH=7.8 i 10mM d'Azida de Sodi durant 10 min.
3. Seguidament es substitueix la solució anterior per nou Tampó Fosfat amb 0.1% de nitro blue tetrazolium (NBT) infiltrat de la mateixa manera durant 15 min.
4. Es treu del buit i es deixa incubar ON a TA.
5. Es fixen les fulles en lactofenol alcohòlic (2:1:1, 95% EtOH: Àcid làctic: Fenol) a 65°C durant 30 min.
6. Es fa un rentat amb 50% etanol seguit d'un altre amb H₂O.
7. Per visualitzar la tinció, les seccions s'incuben en 70% de glicerol i es munten en portes.

Les mostres foren visualitzades en el microscopi *Axiophot* del servei de Microscopia del IBMB (CSIC), en camp clar.

11.2 Determinació d'autofluorescència en fulles d'arròs

Protocol:

1. Es tallen seccions de fulles d'arròs d'aproximadament 2 cm de longitud.
2. Es col·loquen en eppendorfs de 2 mL i es bullen a 100 °C durant 5 min en una solució de lactofenol alcohòlic (95 % etanol: lactofenol, 2:1) .
3. Es fa un rentat amb 50% etanol seguit d'un altre amb H₂O.
4. Per visualitzar la tinció, les seccions s'incuben en 70% de glicerol i es munten en portes.

Les mostres foren visualitzades en el microscopi *Axiophot* del servei de Microscopia del IBMB (CSIC) mitjançant fluorescència ultravioleta (protocol DAPI) (filtre d'excitació 365 nm, mirall dicroic de 395 nm i filtre barrera de 420 nm).

11.3 Tinció amb blau de lactofenol ("*Tripán blue*")

Protocol:

1. Es tallen seccions de fulles d'arròs incloent les lesions visibles (p.ex. de *M. grisea*).
2. Es col·loquen en eppendorfs de 2 mL amb una solució fixadora (80 % etanol; 3,5 % formaldehid; 5% àcid acètic) i mitjançant una campana de buit, s'infiltra durant 1h.
3. Es substitueix la solució i es deixa incubant a TA ON.
4. Es realitza un rentat amb etanol al 70 % durant 5 min (dues vegades).
5. S'afegeix blau de lactofenol cobrint completament les mostres i s'incuba 6h TA
6. Es realitza un rentat amb aigua destil·lada.
7. Per visualitzar la tinció, les seccions es munten en portes.

Les mostres foren visualitzades en el microscopi *Axiophot* del servei de Microscopia del IBMB (CSIC), en camp clar.

12. ANÀLISIS BIOINFORMÀTICS

12.1 Anàlisi de seqüències i filogenies.

A partir de la seqüència aminoacídica deduïda, es comparà amb les bases de dades del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/>) mitjançant el programa BLASTP. L'aliniament de les seqüències d'aminoàcids, es generà mitjançant el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) del EMBL (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/>), i es preparà amb el software DNASTAR (Madison, USA).

Els arbres filogenètics es generen amb el mètode “neighbour-joining” (Saitou i Nei, 1987). Els valors de Bootstrap s'obtingueren mitjançant el programa MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2004) amb 1,000 repliques.

La predicció d'estructura secundària es va generar utilitzant els servidors FUGUE (Shi *et al.*, 2001), GenTHREADER (McGuffin *et al.*, 2000) i J-PRED2 (Cuff *et al.*, 1998) amb els corresponents paràmetres per defecte.

12.2 Modelatge de l'estructura tridimensional.

La compatibilitat de plegament entre la proteïna MgCPB analitzada i les diferents entrades de proteïnes del PDB (Protein Data Bank) s'analitzaren mitjançant els servidors de predicció d'estructura: 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000) i PDB-BLAST (<http://bioserv.cbs.cnrs.fr>), amb els corresponents paràmetres per defecte, i el millor motlle correspongué a la procarboxipeptidasa A2 humana (Protein Data Bank, codi 1AYE). La model tridimensional fou construït directament per mitjà del servidor MODBASE (Pieper *et al.*, 2004) que utilitza el programa MODELLER per assignar plegaments, alinear estructures secundàries i la construcció del model (<http://salilab.org/modeller>). El millor model obtingut presentà un valor o “score” de 0.98 (considerant-se com a model fiable aquells que presenten un “score” major de 0,7, predint-se una reproduïbilitat del 0,95).

L'estructura tridimensional s'evaluà mitjançant el programa Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997). Les imatges dels diferents models moleculars es van produir utilitzant el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

MATERIALS I MÈTODES

- Abdeen A, Virgos A, Olivella E, Villanueva J, Aviles X, Gabarra R i Prat S** (2005) *Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors*. *Plant Mol Biol* 57: 189–202.
- Abe K, Emori Y, Kondo H, Suzuki K i Arai S** (1987) *Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds*. *Journal of Biological Chemistry*. 262(35):16793-16797.
- Abo ME, Alegbejo MD, Sy AA, et al** (2000). *An overview of the mode of transmission, host plants and methods of detection of rice yellow mottle virus* *Journal Of Sustainable Agriculture* 17 (1): 19-36
- Abo, M., Sy, A., i Alegbejo, M.** (1998) Rice yellow mottle (RYMV) in Africa: Evolution, distribution, economic significance and sustainable rice production and management strategies. *J. Sustain. Agric.* 11:85-111.
- Adams DJ, Causier BE, Mellor KJ, Keer V, Milling R, Dada, J.** En, *Chitin Enzymology*, RAA Muzzarelli, eds. European Chitin Society (Lyon, France) & Ancona (Italy), 15-26 (1993).
- Adang MJ, Firoozabady E, Klein J, DeBoer D, Sekar V, Kemp JD, Murray E, Rocheleau TA, Rashka K, Staffeld JG, Stock C, Sutton D i Merlo DJ** (1987) *Expression of a Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein gene in tobacco plants*. In: "*Molecular Strategies for Crop Production*" (C.J. Arntzen i C. Ryan, Eds.), pp. 345-353. A.R. Liss, New York.
- Agrawal GK, Iwahashi H, Rakwal R.** (2003) *Rice MAPKs*. *Biochem Biophys Res Commun*. 302(2): 171-180
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS** (2001a) *Differential induction of three pathogenesis-related genes, PR10, PR1b and PR5 by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (Oryza sativa L.) seedlings* *Journal Of Plant Physiology* 158 (1): 133-137
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa N-S, Agrawal VP** (2001b) *Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice OsPR1a an OsPR1b genes: A model illustrating components participating during defense/stress response*. *Plant Physiol Biochem*. 39: 1095-1103
- Agrawal GK, Rakwal R, Yonekura M, Kubo A, Saji H.** (2002) *Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (Oryza sativa L) seedlings*. *Proteomics* 2: 947-959
- Agrawal GK, Tamogami S, Han O, et al.** (2004) *Rice octadecanoid pathway* *Biochemical And Biophysical Research Communications* 317 (1): 1-15
- Aizpurua, C.** (1994.) *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, ISSN 0213-6910, Vol. 20, N° 4, 1994, pags. 955-962
- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hebrard E, et al** (2006) *Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus* *Plant Journal* 47 (3): 417-426
- Albar L, Lorieux M, Ahmadi N, et al.** (1998) *Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology* *Theoretical And Applied Genetics* 97 (7): 1145-1154
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. Lamb, C.** (1998) *Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity*. *Cell*, 20, 773-784, 1998.
- An G, Mitra A, Choi HK, Costa MA, An K, Thornburg RW i Ryan CA** (1989) *Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene*. *Plant Cell* 1:115-122.
- Andrews DI, Drew MC, Johnson JR, et al.** (1994) *The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress - changes in induction of adh1 messenger-rna, adh activity, and survival of anoxia* *Plant Physiology* 105 (1): 53-60
- APSnet** (2002) web de *The American Phytopathological Society*: <http://www.apsnet.org/>
- Arraundeau M** (1998) *Le riz irrigué. Le technicien d'agriculture tropicale*. Ed. Maisonneuve et Larose. 1:321.
- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM** (2002) *Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms* *Plant Physiology* 128 (2): 491-501

BIBLIOGRAFIA

- Avdishko SA, Brown GC, Dahlman DL, Hildebrand DF.** (1997) *Methyl jasmonate exposure induces insect resistance in cabbage and tobacco*. Environmental Entomology 26: 642–654.
- Awoderu, V. A.** (1991). *The rice yellow mottle virus situation in West Africa*. J. Basic Micro-. biol. 31:91-99. 10.
- Bakker, W.** (1971) Three new beetle vectors of rice yellow mottle virus in Kenya. Neth. J.Plant Pathol. 77:201-206.
- Bakker, W.** (1974) Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. Agric. Res. Rep. (Wageningen)829:1-152.
- Ball AM, Ashby AM, Daniels MJ, Ingram DS, Johnstone K** (1991) *Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of pyrenopeziza-brassicae with oilseed rape* Physiological And Molecular Plant Pathology 38 (2): 147-161
- Barras F, Vangijsegem F, Chatterjee Ak** (1994) *Extracellular Enzymes And Pathogenesis Of Soft-Rot Erwinia Annual Review Of Phytopathology* 32: 201-234
- Barret AJ, Rawlings ND, Davis ME, Machleidt W, Salvesen G i Turk V** (1986) *Proteinase Inhibitors*, pp. 515-569, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, New York.
- Barrett AJ** (1986) *The cystatins - a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors* Biomedica Biochimica Acta 45 (11-12): 1363-1374
- Bartel D.P.**(2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281–297
- Bartlet E, Kiddle G, Williams I, Wallsgrove R** (1999) Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist. Entomologia Experimentalis et Applicata 91: 163–167.
- Barton KA, Whiteley HR i Yang NS** (1987) *Bacillus thuringiensis delta-endotoxin expressed in transgenic Nicotiana tabacum provides resistance to lepidopteran insects*. Plant Physiol. 85:1103-1109.
- Baulcombe D.** (2004) RNA silencing in plants. Nature 431: 356–363.
- Bayés, A., Sonnenschein, A., Daura, X, Vendrell, J i Avilés, FX** (2003) Procarboxypeptidase A from the insect pest *Helicoverpa armigera* and its derivative enzyme. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3026-3035.
- Bayés, A., Comellas-Bigles, M., Rodriguez de la Vega, M, Maskos, K., Bode, W., Avilés, FX, Jongasma MA, Beekwilder J i Vendrell, J** (2005) Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16602-16607.
- Beckers GJM, Spoel SH** (2006) *Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate* Plant Biology 8 (1): 1-10
- Belanger KD, Wyman AJ, Sudol MN, et al.** (2003) *A signal peptide secretion screen in Fucus distichus embryos reveals expression of glucanase, EGF domain-containing, and LRR receptor kinase-like polypeptides during asymmetric cell growth* Planta 217 (6): 931-950
- Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S, et al.** (2004) *The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*. PNAS 101 (3): 886-890
- Bennett RN, Wallsgrove RM.** (1994) Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. New Phytologist 127: 617–633.
- Bernays EA, Chapman RF.** (2000) *A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of Heliothis with different diet breadths*. J Insect Physiol. 46(6):905-912.
- Bernier F, Berna A** (2001) *Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?* Plant Physiology And Biochemistry 39 (7-8): 545-554
- Bi JL, Murphy JB, Felton GW.** (1997) *Does salicylic acid act as a signal in cotton for induced resistance to Helicoverpa zea?* Journal of Chemical Ecology 23: 1805–1818.
- Bidochka MJ, Burke S, Ng L** (1999a) *Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus verticillium: adaptations for pathogenesis* Canadian Journal Of Microbiology 45 (10): 856-864
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Stuart A, et al.** (1999b) *Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus verticillium and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases* Microbiology-UK 145: 955-963 Part4

- Birk Y** (2003) *Plant protease inhibitors*. En: Springer eds, Berlin
- Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB** (2000) *Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants* Nature Biotechnology 18 (2): 213-217
- Blanco-Aparicio C, Molina MA, Fenandez-Sala, Frazier ML, Mas JM, Querol E, Aviles FX, de Llorens R** (1998) *Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth* Journal Of Biological Chemistry 273 (20): 12370-12377
- Bock R i Khan MS** (2004) *Taming plastids for a green future* Trends In Biotechnology 22 (6): 311-318
- Bode W i Huber R** (2000) *Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:241-252.
- Bohlmann H** (1994) *The role of thionins in plant-protection* Critical Reviews In Plant Sciences 13 (1): 1-16
- Bohlmann J, Steele CL, Croteau R.** (1997) Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 21784–21792.
- Bohlmann J, Crock J, Jetter R, Croteau R.** (1998). Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E) -alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 6756–6761.
- Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R. N., i Fauquet, C. M** (1998) Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread. *Virology* 244:79-86.
- Borlaug N** (1970) *The Green Revolution revisited and the road ahead*. <http://www.nobel.se/peace/articles/borlaug/borlaug-lecture.pdf>
- Bostock RM, Karban R, Thaler JS, Weyman PD, Gilchrist D.** (2001) *Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 103–111.
- Boter M, Ruiz-Rivero O, Abdeen A, Prat S.** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev.* Jul 1;18(13):1577-91.
- Bowler C, Vanmontagu M, Inze D** (1992) *Superoxide-dismutase and stress tolerance* Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology 43: 83-116
- Bown DP i Gatehouse JA** (2004) *Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (Helicoverpa armigera) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues*. *Eur. J. Biochem* 271, 2000-2011.
- Bown DP, Wilkinson HS i Gatehouse JA** (1997) *Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive proteinase genes from the phytophagous insect pest, Helicoverpa armigera, are members of complex multigene families*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:625–638.
- Bown DP , Wilkinson HS, Gatehouse JA** (1998) *Midgut carboxypeptidase from Helicoverpa armigera (Lepidoptera : Noctuidae) larvae: enzyme characterisation, cDNA cloning and expression* *Insect Biochemistry And Molecular Biology* 28 (10): 739-749
- Breitler J** (1999) *Transfert de genes synthétiques de δ -endotoxines de Bacillus thuringiensis dans des riz (Oryza sativa L.) transgéniques par biolistique. Amélioration de la technique de transformation génétique et exploration de stratégies d'expression à spécificité tissulaire et inductible par blessure*. tesis doctoral, Université Montpellier II.
- Breitler J, Cordero MJ, Royer M, Meynard D, San Segundo B i Guiderdoni E** (2001) *The-689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound-inducible expression of the cry1B gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack*. *Molecular Breeding.* 7:259-274.
- Breitler JB, Vassal JM, Catala MM, Meynard D, Marfa V, Mele E, Royer M, Murillo I, San segundo B, E Guiderdoni i Messeguer J** (2004) *Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions* *Plant Biotechnology Journal* 2(5):417

BIBLIOGRAFIA

- Breyne P, Vanmontagu M, Depicker A, et al.** (1992) *Characterization of a plant scaffold attachment region in a dna fragment that normalizes transgene expression in tobacco* Plant Cell 4 (4): 463-471
- Broadway RM** (1995) *Are insects resistant to plant proteinase inhibitors?* Journal of Insect Physiology. 41:107-116.
- Broadway RM, Villani MG** (1995) *Does host-range influence susceptibility of herbivorous insects to nonhost plant proteinase-inhibitors* Entomologia Experimentalis Et Applicata 76 (3): 303-312
- Brodersen P i Voinnet O** (2006) *The diversity of RNA silencing pathways in plants.* Trends Genet. 22(5):268-80
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, et al.** (2002) *Knockout of Arabidopsis ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense* Genes & Development 16 (4): 490-502
- Brodersen P, Petersen M, Bjorn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J.** (2006) *Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4.* Plant J. 47(4):532-46
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, et al.** (1995) *Plant defensins - novel antimicrobial peptides as components of the host-defense system* Plant Physiology 108 (4): 1353-1358
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW i Osborn RW** (1997) *Antimicrobial peptides from plants.* Crit. Rev. Plant Sci. 16:297-323.
- Brownleader MD, McNally PE, Davies GEA, et al.** (1997) *Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells* Phytochemistry 46 (1): 1-9
- Brugidou C, Holt C, Yassi MNA, et al.** (1995) *Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein* Virology 206 (1): 108-115
- Buckler ES, Gaut BS, McMullen MD** (2006). *Molecular and functional diversity of maize.* Curr Opin Plant Biol. 9(2): 172-176
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., i Dong, X.** (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell 88, 57-63.
- Cao, H., Li, X., i Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6531-6536.
- Caporale C, Di Bernardino I, Leonardi L, Bertini L, Cascone A, Buonocore V, Caruso C** (2004) *Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity.* FEBS Lett. 575: 71-76
- Carlile AJ, Bindschedler LV, Bailey AM, Bowyer P, Clarkson JM, Cooper RM.** (2000) *Characterization of SNPI, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by Stagonospora nodorum.* Mol Plant Microbe Interact. 13(5):538-50
- Carrington JC i Dougherty WG.** (1988) *A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing.* Proc Natl Acad Sci U S A 85, 3391-5.
- Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C.** (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. Genes & Dev. 18: 1179-1186
- Chen J, Ferris H, Scow KM, et al.** (2001) *Fatty acid composition and dynamics of selected fungal-feeding nematodes and fungi* Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 130 (2): 135-144
- Chen Q, Eudes F, Conner RL, et al.** (2001) *Molecular cytogenetic analysis of a durum wheat x Thinopyrum distichum hybrid used as a new source of resistance to Fusarium head blight in the greenhouse* Plant Breeding 120 (5): 375-380
- Chen WQ i Swart WJ** (2001) *Genetic variation among Fusarium oxysporum isolates associated with root rot of Amaranthus hybridus in South Africa* Plant Disease 85 (10): 1076-1080
- Cheng CHC** (1998) *Evolution of the diverse antifreeze proteins* Current Opinion In Genetics & Development 8 (6): 715-720

- Cheng CP, Tzafrir I, Lockhart BEL, et al.** (1998) *Tubules containing virions are present in plant tissues infected with Commelina yellow mottle badnavirus* Journal Of General Virology 79: 925-929
- Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC.** (2001) *Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis*. Plant J. 27(2): 101-113
- Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC.** (2005) Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(6): 511-520
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ.** (2006) *Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response*. Cell. 124(4):803-14
- Choi CW, Qu F, Ren T, Ye X, Morris TJ.** (2004) *RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the Arabidopsis protein TIP*. J Gen Virol. 85(Pt 11):3415-20.
- Choi GH, Pawlyk DM, Rae B, Shapira R, Nuss DL.** (1993) *Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from Cryphonectria parasitica*. Gene. 125(2):135-41
- Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, et al.** (1992) *Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae - dietary and protease inhibitor interactions* Insect Biochemistry and Molecular Biology 22 (7): 735-746
- Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB i Thordal-Christensen H** (2002) *The molecular characterisation of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins*. Molec Plant Pathol. 3:135-144.
- Christianson, D.W. i Lipscomb, W.N** (1989) *Carboxypeptidase A* Acc. Chem. Res. 22, 62-69.
- Cipollini DF** (2002) *Does competition magnify the fitness costs of induced responses in Arabidopsis thaliana? A manipulative approach* Oecologia 131 (4): 514-520
- Cipollini ML, Paulk E, Cipollini DF** (2002) *Effect of nitrogen and water treatment on leaf chemistry in horsenettle (Solanum carolinense), and relationship to herbivory by flea beetles (Epidrix spp.) and tobacco hornworm (Manduca sexta)* Journal Of Chemical Ecology 28 (12): 2377-2398
- Clark SJ, Templenton MD i Sullivan PA** (1997) *A secreted aspartic proteinase from Glomerella cingulata: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA*. Microbiology 143 (4):1395-403
- Clarke JD, Aarts N, Feys BJ, et al.** (2001) *Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants CPR1 and CPR6 and is partially EDS1-dependent in CPR5* Plant Journal 26 (4): 409-420
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., i Dong, X.** (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in Arabidopsis. Plant Cell 12, 2175-2190
- Clergeot, P-H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M-P., Pépin, R., Tharreau, D., Notteghem, J-L., Lebrun, M-H** (2001) *PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen Magnaporthe grisea*. PNAS, 98 (12), 6963-6968
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW i Wingfield PT** (2002) *Current protocols in protein science*. Ed. Board. John Wiley & Sons, New York.
- Collinge Db, Kragh Km, Mikkelsen Jd, et al** (1993) *Plant Chitinases* Plant Journal 3 (1): 31-40
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B.** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7(5): 210-216
- Cordero MJ, Raventós D i San Segundo B** (1994) *Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene*. The Plant Journal 6(2):141-150.
- Cornellis GR i Gijsegem F** (2000) *Assembly and function of type III secretory systems*. Annu Rev Microbiol. 54:735-74.
- Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, et al.** (2005) *Pseudomonas syringae manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores* PNAS 102 (5): 1791-1796
- Culley DE, Horovitz D, Hadwiger LA** (1995) *Molecular characterization of disease-resistance response gene drr206-d from pisum-sativum (l)* Plant Physiology 107 (1): 301-302

BIBLIOGRAFIA

- Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, et al.** (2004) *Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence* Plant Journal 39 (2): 147-160
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC.** (2000) *An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus.* Cell 101(5):543-53.
- Dammann C, Rojo E, Sanchez Serrano JJ.** (1997) *Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organspecific signal transduction pathways.* Plant Journal 11: 773–782.
- DARP** (2006) web del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya: <http://www.gencat.es/darp/camp.htm>
- Dasgupta A i Emerson L** (1998) *Neutralization of cardiac toxins oleandrin, oleandrogenin, bufalin, and cinobufotalin by digibind: Monitoring the effect by measuring free digitoxin concentrations* Life Sciences 63 (9): 781-788
- Dasgupta S, Collins GB, Hunt AG** (1998) *Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants* Plant Journal 16 (1): 107-116
- Datta, S.K.** (2004). *Rice biotechnology: A need for developing countries.* AgBioForum, 7 (1-2), 31-35. <http://www.agbioforum.org>.
- Datta A i Ochoa J** (1998) *Adaptive internal model control: H-2 optimization for stable plants* Automatica 34 (1): 75-82
- Datta C i Basu PS** (1998) *Production of indole acetic acid in root nodules and culture by a Rhizobium species from root nodules of the fodder legume Melilotus alba desr* Acta biotechnologica 18 (1): 53-62
- Datta, S.K., i Khush, G.S.** (2002). *Improving rice to meet food and nutrient needs: Biotechnological approaches.* Journal of Crop Production, 6(1), 229-247.
- Datta KS, Varma SK, Angrish R, et al.** (1998) *Alleviation of salt stress by plant growth regulators in Triticum aestivum L.* Biologia Plantarum 40 (2): 269-275
- Datta AK, Marron PA, King CJH, et al.** (1998) *Process development for electrocarboxylation of 2-acetyl-6-methoxynaphthalene* Journal Of Applied Electrochemistry 28 (6): 569-577
- Datta, K., Muthukrishnan, S., Datta, S. K.** (1999) *Expresion and function of PR-protein genes in transgenic plants. En Pathogenesis-related proteins in plants.* CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp. 261-277
- Datta K, Tu J, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S, i Datta SK** (2001) *Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars.* Plant Sci.160:405–414.
- Datta, K., Baisakh, N., Thet, K.M., Tu, J., & Datta, S.K.** (2002). *Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight.* Theoretical and Applied Genetics 106: 1-8.
- De Bolle MF, Eggermont K, Duncan RE, Osborn RW, Terras FR, Broekaert WF.** (1995) *Cloning and characterization of two cDNA clones encoding seed-specific antimicrobial peptides from Mirabilis jalapa L.* Plant Mol Biol. 28(4):713-21.
- de Felipe P, Hughes LE, Ryan MD, Brown JD** (2003) *Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide.* J Biol Chem 278: 11441–11448
- De Leo F i Gallerani R** (2002) *The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of Spodoptera littoralis larvae fed on transgenic plants.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 3(5):489-496.
- De Leo F, Bonadé-Bottino MA, Ceci LR, Gallerani R i Jouanin L** (2001) *Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests.* Insect Biochem. Mol. Biol. 31:593–602.
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R i Ceci LR** (2002) *PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes.* Nucl. Acids. Res. 30:347-348.

- De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F** (2001) *The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi* Annual Review Of Phytopathology 39: 313-335
- De Maag, R.A.; Bosch, D.; Stiekema, W.** (1999) Bacillus thuringiensis toxin-mediated insect resistance in plants. Trends Plant Sci., 4:9-13,
- De Moraes CM, Mescher MC i Tumlinson JH** (2001) *Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females*. Nature 410:577-580.
- Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW.** (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434(7036): 980-986
- Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, et al.** (1998) *Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes* Physiologia Plantarum 104 (4): 673-680
- Del Rio LA, Corpas FJ, Barroso JB.** (2004) *Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants*. PHYTOCHEMISTRY 65 (7): 783-792
- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA** (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(14): 6602-6606
- Delessert C, Wilson IW, Van Der Straeten D, Dennis ES, Dolferus R** (2004) *Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in Arabidopsis leaves*. Plant Mol Biol 55:165-181.
- Dempsey DA, Shah J, Klessig DF** (1999) *Salicylic acid and disease resistance in plants* Critical Reviews In Plant Sciences 18 (4): 547-575
- Desjardins AE, Plattner RD, Gordon TR** (2000). Gibberella fujikuroi mating population A and Fusarium subglutinans from teosinte species and maize from Mexico and Central America. Mycological Research 104: 865-872
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., i Fobert, P.R.** (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. Plant Cell 12, 279–290.
- Desveaux D, Subramaniam R, Despres C, Mess JN, Levesque C, Fobert PR, Dangl JL, Brisson N** (2004) A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. Dev Cell. Feb;6(2):229-40.
- Dey PM, Brownleader MD, Pantelides AT, et al.** (1997) *Extensin from suspension-cultured potato cells: A hydroxyproline-rich glycoprotein, devoid of agglutinin activity* Planta 202 (2): 179-187
- Di Pietro A, Huertas-Gonzalez MD, Gutierrez-Corona JF, Martinez-Cadena G, Meglecz E, Roncero MI** (2001) *Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus Fusarium oxysporum*. Mol Plant Microbe Interact. 14(5):653-662.
- Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, et al.** (1996) *The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins*. cell 84 (3): 451-459
- Dobinson KF, Lecomte N, Lazarovits G** (1997) *Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen Verticillium dahliae* Canadian Journal Of Microbiology 43 (3): 227-233
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K.** (1996) *The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence – A review*. Gene 179: 45–51
- Dominguez DI, De Strooper B, Annaert W** (2001) *Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease* Amyloid-Journal Of Protein Folding Disorders 8 (2): 124-142
- Dong X.**(2004) NPR1, all things considered. Curr Opin Plant Biol.;7:547–552

BIBLIOGRAFIA

- Dorokhov YL, Skulachev MV, Ivanov PA, et al.** (2002) *Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry* PNAS 99 (8): 5301-5306
- Dow JM, Davies HA, Daniels MJ.** (1998) A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. *Mol Plant Microbe Interact* 11(11):1085-93.
- Du naevsky YE, Gruban TN, Beliakova GA i Belozersky MA** (2000) *Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of Trichoderma harzianum*. *Biochemistry* 65(6):723-7
- Duan XG, Neuman DS, Reiber JM, et al.** (1996) *Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought* Journal Of Experimental Botany 47 (303): 1541-1550
- Dunaevsky YE, Gruban TN, Beliakova GA, et al.** (2000) *Enzymes secreted by filamentous fungi: Regulation of secretion and purification of an extracellular protease of Trichoderma harzianum* *Biochemistry-Moscow* 65 (6): 723-727
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) *Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose* PNAS 95 (17): 10328-10333
- Durrant WE i Dong X** (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol* 42:185-209
- Edwards MJ , Lemos FJA, Donnelly-Doman M, et al.** (1997) *Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito Anopheles gambiae* *Insect Biochemistry And Molecular Biology* 27 (12): 1063-1072
- Edwards MJ , Moskalyk LA, Donnelly-Doman M, et al.** (2000) *Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, Aedes aegypti* *Insect Molecular Biology* 9 (1): 33-38
- Ellis C, Karafyllidis L, Turner JG** (2002) *Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae* *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (10): 1025-1030
- Ellis C, Turner JG, Devoto A** (2002) *Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens* *Plant Molecular Biology* 50 (6): 971-980
- Epple P, Apel K i Bohlmann H** (1997) *Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 9:509–520.
- Esquerre-Tugaye MT.** (1983) *Hydroxyproline-rich glycoproteins and lectins in the defense of plants*. *Prog Clin Biol Res.* 138:177-85.
- Estébanez-Perpiña, E., Bayés, A, Vendrell, J., Jongma, MA, Bown DP, Gatehouse JA, Huber, R., Bode W, Avilés FX i Reverter D** (2001) *Crystal structure of a novel mid-gut procarboxypeptidase from the cotton pest Helicoverpa armigera*. *J. Mol. Biol.* **313**, 629-638.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S i Somssich IE** (2000) *The WRKY superfamily of plant transcription factors*. *Trends Plant Sci.* 5:199-206.
- Falk, A., Feys, B. J., Frost, L. N., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., Parker, J. E.** (1999) *EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 3292-3297
- Fan X, Shi X, Zhao J, Zhao R i Fan Y** (1999) *Insecticidal activity of transgenic tobacco plants expressing both Bt and CpTI genes on cotton bollworm (Helicoverpa armigera)*. *Chin J Biotechnol.* 15(1):1-5.
- Fan, W., i Dong, X.** (2002). *In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 1377–1389
- Farinos GP, de la Poza M, Hernandez-Crespo P, Ortego F, Castanera P** (2004) *Resistance monitoring of field populations of the corn borers Sesamia nonagrioides and Ostrinia nubilalis after 5 years of Bt maize cultivation in Spain* *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 110 (1): 23-30
- Farmer EE i Ryan CA** (1990) *Interplant communication - airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase-inhibitors in plant-leaves* PNAS 87 (19): 7713-7716

- Felix G, Boller T.** (1995) *Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in Lycopersicon peruvianum cells.* Plant Journal 7: 381–389.
- Felton GW, Korth KL, Bi JL, Wesley SV, Huhman DV, Mathews MC, Murphy JB, Lamb C i Dixon RA** (1999) *Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and insect herbivory.* Current Biology. 9:317–320.
- Felton, G.W., i Korth, K.L.** (2000). Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 309–314.
- Fermi C i Pernossi L** (1894) *Untersuchungen über die Enzyme.* Vergleichende Studie. Z Hyg Infektionskr 18:83-89
- Fuessner I i Wasternack C** (2002) *The lipoxygenase pathway* Annual Review Of Plant Biology 53: 275-297
- Feys BJ i Parker JE** (2000) *Interplay of signalling pathways in plant disease resistance.* Trends in Genetics 16:449-455.
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, et al.** (2001) *Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4* Embo Journal 20 (19): 5400-5411
- Fidantsef AL, Stout MJ, Thaler JS, et al.** (1999) *Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, Lycopersicon esculentum* Physiological And Molecular Plant Pathology 54 (3-4): 97-114
- Finnegan EJ iMatzke MA** (2003) *The small RNA world.* J Cell Sci. 1;116(Pt 23):4689-93
- Fishoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SH, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG i Fraley RT** (1987) *Insect tolerant transgenic plants.* Bio/Technology 5:807-813.
- Fitzgerald, HA., Chern, MS., Navarre, R i Ronald, PC.** (2004) *Overexpression of (At)NPR1 in rice leads to a BTH- and environmentinduced lesion-mimic/cell death phenotype.* Mol. Plant-Microbe Interact. 17:140-151.
- Fitzgerald HA, Canlas PE, Chern MS, Ronald PC.** (2005) *Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae.* Plant J.43(3):335-47.
- Flor HH** (1971) *Current status of the gene-for-gene concept.* Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296
- Fores E, Espanya A i Morales F** (2002) *Regeneración de la laguna costera de La Encanyissada (Delta del Ebro). Una experiencia de biomanipulación.* Ecosistemas XI/2.
- Francois IEJA, Van Hemelrijck W, Aerts AM, et al.** (2004) *Processing in Arabidopsis thaliana of a heterologous polyprotein resulting in differential targeting of the individual plant defensins* Plant Science 166 (1): 113-121
- Francois, De Bolle, Dwyer, Goderis, Woutors, Verhaert, Proost, Schaaper, Cammue iBroekaert** (2002) *Transgenic Expression in Arabidopsis of a Polyprotein Construct Leading to Production of Two Different Antimicrobial Proteins* Plant Physiology 28(4): 1346 - 1358.
- Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R., Ryals, J.** (2001) *NIM1 overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides.* Mol. Plant-Microbe Interact. 14, 1114-1124
- Fujinaga, Cherney, Oyama, Oda i James** (2004) *The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum.* PNAS 101 (10): 3364-3369
- Garcia Tejero** (1993) <http://www.pcult.upv.es/TFC/Hechos/oscar/spodopte.htm>
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M.** (1995) *The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants.* Trends Microbiol. 3(2):72-4.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM i Rodríguez-Palenzuela P** (1998) *Plant defense peptides.* Biopolymers. 47(6):479-91.

BIBLIOGRAFIA

- García-Sáez, I., Reverter, D, Vendrell, J., Avilés, FX i Coll, M.** (1997) The three-dimensional structure of human procarboxypeptidase A2. Deciphering the basis of the inhibition, activation and intrinsic activity of the zymogen. *EMBO J.* **23**, 6906-6913.
- Gatehouse AMR, Shi Y, Powell KS, Brough C, Hilder VA, Hamilton WDO, Newell CA, Merryweather A, Boulter D i Gatehouse JA** (1993) *Approaches to insect resistance using transgenic plants*. Philos. Trans. Roy. Soc. London B342:279-286.
- Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Sauvion N, Rahbe Y, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Gatehouse JA** (1996) *Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid Myzus persicae*. Entomol. Exp. Appl. 79:295-307.
- Gatehouse AMR, Norton E, Davison GM, Babbé SM, Newell CA i Gatehouse JA** (1999) *Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, Lacanobia oleracea, effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo*. Journal of Insect Physiology. 45(6):545-558.
- Gatehouse JA** (2002) *Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction*. New Phytol 156:145-169.
- Gaudin V, Lutticke S, Jouanin L** (1994) *A reporter gene under the control of TMS or AUX promoters is differentially expressed in tobacco and barley protoplasts* Plant Cell Reports 13 (3-4): 155-158
- Gaudin V, Vrain T, Jouanin L** (1994) *Bacterial genes modifying hormonal balances in plants* Plant Physiology And Biochemistry 32 (1): 11-29
- Gelvin SB** (1998a) *Agrobacterium VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm* Journal Of Bacteriology 180 (16): 4300-4302
- Gelvin SB** (1998b) *Multigene plant transformation: More is better!* Nature Biotechnology 16 (11): 1009-1010
- Gelvin SB** (1998c) *The introduction and expression of transgenes in plants* Current Opinion In Biotechnology 9 (2): 227-232
- Gelvin SB** (2003a) *Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-Jockeying" tool* Microbiology And Molecular Biology Reviews 67 (1): 16
- Gelvin SB** (2003b) *Improving plant genetic engineering by manipulating the host* Trends In Biotechnology 21 (3): 95-98
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, et al.** (1997) *Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene* Molecular Breeding 3 (5): 401-414
- Ghesquiere A, Albar L, Lorieux M, et al.** (1997) *A major quantitative trait locus for rice yellow mottle virus resistance maps to a cluster of blast resistance genes on chromosome 12* Phytopathology 87 (12): 1243-1249
- Ghigo JM i Wandersman C** (1992a) *A 4th metalloprotease gene in Erwinia-chrysanthemi* Research In Microbiology 143 (9): 857-867
- Ghigo JM i Wandersman C.** (1992b) *Cloning, nucleotide sequence and characterization of the gene encoding the Erwinia chrysanthemi B374 PrtA metalloprotease: a third metalloprotease secreted via a C-terminal secretion signal*. Mol Gen Genet. 236(1):135-44.
- Gijzen M, Lewinsohn E, Croteau R** (1991) *Characterization of the constitutive and wound-inducible monoterpene cyclases of grand fir (abies-grandis)* Archives Of Biochemistry And Biophysics 289 (2): 267-273
- Girard C, Le Metayer M, Zaccomer B, Bartlet E, Williams I, Bonade-Bottino M, Pham-Delegue M i Jouanin L** (1998a) *Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor*. Journal of Insect Physiology. 44:263-270.
- Giri AP, Harsulkar AM, Deshpande VV, Sainani MN, Gupta VS i Ranjekar PK** (1998) *Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases*. Plant Physiol. 116:393-401.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., Ausubel, F. M.** (1996) *Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening*. Genetics. 143, 973-982

- Glazebrook. J.** (2001) *Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis-2001 status*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 305-308.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H-S., Nawarath, C. Metraux, J. P., Zhu, T., Katagiri, F.** (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal.* 34(2), 217-228,
- Glazebrook J** (2005) *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens* Annual Review Of Phytopathology 43: 205-227 2005
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296 (5): 92-100
- Gonzalez C, Neira JL, Ventura S, Bronsoms S, Rico M, Aviles FX** (2003) *Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by H-1 and N-15 NMR* Proteins-Structure Function And Genetics 50 (3): 410-422
- Goto M** (1979) . *Bacterial Foot Rot Of Rice Caused By A Strain Of Erwinia-Chrysanthemi* Phytopathology 69 (3): 213-216
- Graham JS i Ryan CA** (1981) *Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101:1164-1170.
- Grover A i Gowthaman R** (2003) *Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants.* *Current science* 84(3): 330- 340
- Gu YQ, Holzer FM, Walling LL** (1999) *Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato* European Journal Of Biochemistry 263 (3): 726-735
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ i Gomez-Lim MA** (1999) *The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyvirus in transgenic tobacco plants.* *Nature Biotechnology.* 17(12):1223-1226.
- Gvozdeva EL, Ievleva EV, Gerasimova NG, et al.** (2004) *Exoproteinas of the oomycete Phytophthora infestans* Applied Biochemistry and Microbiology 40 (2): 165-169
- Haas GM i Ryan CA** (1981) *Carboxipeptidase inhibitor from potatoes.* *Methods Enzymol* 80:778-779
- Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmeltzer E, Schreier PH, Stöker RH i Stenzel K** (1993) *Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant.* *Nature.* 361:153-156.
- Halitschke R, Kessler A, Kahl J, Lorenz A, Baldwin IT.** (2000) Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 124: 408-417.
- Halitschke R, Ziegler J, Keinanen M, Baldwin IT** (2004) *Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in Nicotiana attenuata.* *Plant J* 40:35-46.
- Hall TA** (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.* *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41, 95-98
- Halpin C.**(2005) *Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology.* *Plant Biotechnology Journal* 3:2, 141-155
- Halpin C, Cooke SE, Barakate A, El Amrani A, Ryan MD.** (1999) *Self-processing 2A-polyproteins – a system for coordinate expression of multiple proteins in transgenic plants.* *Plant J.* 17(4):453-459.
- Halpin C, Barakate A, Askari BM, et al.** (2001) *Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways* *Plant Molecular Biology* 47 (1-2): 295-310

BIBLIOGRAFIA

- Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D.** (2002) *Two classes of short interfering RNA in RNA silencing.* *EMBO J.* 21(17):4671-9.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) *Resistance gene-dependent plant defense responses.* *Plant Cell* 8 (10): 1773-1791
- Hanania U, Furman-Matarasso N, Ron M i Avni A.** (1999) Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death *Plant J* 19(5):533-541.
- Harborne JB.** (1990) *Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants.* *Ciba Found Symp.* 154:126-34;
- Harper G, Hull R, Lockhart B, et al.** (2002) *Viral sequences integrated into plant genomes* *Annual Review Of Phytopathology* 40: 119-136
- Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK i Deshpande VV** (1999) *Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of Helicoverpa armigera gut proteinases and larval growth.* *Plant Physiology* 121:497-504
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C.** (2000) *Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles.* *Plant Journal* 24: 113–126.
- Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C.** (2003) *Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements.* *Plant Cell Physiol.* 44(6):643-8.
- Hegedus D, Baldwin D, O'Grady M, et al.** (2003) *Midgut proteases from Mamestra configurata (Lepidoptera : Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis* *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology* 53 (1): 30-47
- Heil M** (2002) *Ecological costs of induced resistance* *Current Opinion In Plant Biology* 5 (4): 345-350
- Heil M i Baldwin IT** (2002) *Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept* *Trends In Plant Science* 7 (2): 61-67
- Heil M i Bostock RM** (2002) *Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences* *Annals Of Botany* 89 (5): 503-512
- Heitz T, Bergery DR, Ryan CA.** (1997). *A gene encoding a chloroplasttargeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate.* *Plant Physiology* 114: 1085–1093.
- Heitz t, Geoffroy P, Fritig B, et al.** (1991) *2 apoplasmic alpha-amylases are induced in tobacco by virus-infection* *Plant Physiology* 97 (2): 651-656
- Herbers K, Prat S, Willmitzer L.** (1994) *Cloning and characterization of a cathepsin D inhibitor gene from Solanum tuberosum L* *Plant Mol Biol.* 26(1):73-83.
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT** (2001) *Molecular interactions between the specialist herbivore Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host Nicotiana attenuata. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs.* *Plant Physiol.*125(2):683-700.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. and Boulter, D.** (1987) *A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco.* *Nature* 330, 160-163.
- Hoballah MEF, Turlings TCJ.** (2001) *Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids.* *Evolutionary Ecology Research* 3: 553–565.
- Hoffmann MP, Zalom FG, Wilson LT, Smilanick JM, Malyj LD, Kiser J, Hilder VA i Barnes WM** (1992) *Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding Bacillus thuringiensis delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: Efficacy against Helicoverpa zea.* *J. Econ. Entomol.* 85:2516-2522.

- Hotson, A. i Mudgett, M. B.** (2004). *Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 384-390
- Howard RJ i Valent B** (1996) *Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:491-512.
- Howe GA, Ryan CA** (1999) *Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway*. *Genetics* 153:1411-1421.
- Howe GA, Lightner J, Browse J, Ryan CA.** (1996) *An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack*. *Plant Cell* 8: 2067–2077.
- Hsieh WH, Smith SN, Snyder WC** (1977) Mating groups in *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 67:1041
- Hu X, Cao BN, Hu G, et al.** (2002) *Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garlic extract in rat sarcoma cells* *International Journal Of Molecular Medicine* 9 (6): 641-643
- Inamori Y, Muro C, Yoshioka M, et al.** (1993) *Phytogrowth-inhibitory activities of sulfur-containing-compounds .2. the inhibitory activities of thiosalicylic acid and dihydro-2(3h)-thiophenone-related compounds on plant-growth* *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 16 (8): 813-816
- Inbar M, Doostdar H, Gerling D, Mayer RT.** (2001) *Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 65–70.
- International Rice Genome Sequencing Project.** The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436(7052): 793-800 (2005).
- IRRI** (2006), web del International Rice Research Institute, Filipines: <http://www.irri.org/>
- Ishikawa A, Yoshihara T i Nakamura K** (1994) *Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor-GUS gene fusion in tobacco cells*. *Plant Molecular Biology.* 26:403-414.
- Iwai H, Masaoka N, Ishii T, et al.** (2002) *A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem* *PNAS* 99 (25): 16319-16324
- Jach G, Görnhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J i Mass C** (1995) *Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco*. *Plant J.* 8:97–109.
- Jacinto T, McGurl B, Franceschi V, DelanoFreier J, Ryan CA.** (1997) *Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundlespecific expression of the beta-glucuronidase gene in transgenic tomato plants*. *Planta* 203: 406–412.
- Jacinto T, McGurl B, Ryan CA.** (1999) *Wound-regulation and tissue specificity of the tomato prosystemin promoter in transgenic tobacco plants*. *Plant Science* 140: 155–159.
- Jakab G, Manrique A, Zimmerli L, et al.** (2003) *Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of Arabidopsis* *Plant Physiology* 132 (4): 2230-2239
- James C** (2004) *Global Status of commercialised transgenic crops ISAAA Briefs No.32:Preview*. ISAAA, Ithaca, NY
- Jander G, Cui JP, Nhan B, Pierce NE, Ausubel FM** (2001) *The TASTY locus on chromosome 1 of Arabidopsis affects feeding of the insect herbivore Trichoplusia ni*. *Plant Physiology* 126: 890–898.
- Jirage, D., Tootle, T. L., Reuber, T. L., Frost, L. N., Feys, B. J., Parker, J. E., Ausubel, F. M., Glazebrook, J.** (1999) *Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 13583-13588
- Johnson, C., Boden, E., i Arias, J.** (2003). *Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1846–1858
- Jongsma MA i Bolter C** (1997) *The adaptation of insects to plant protease inhibitors* *Journal of Insect Physiology.* 43(10):885-895.

BIBLIOGRAFIA

- Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D i Stiekema WJ** (1995) *Adaptation of Spodoptera exigua larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition*. Proc Natl. Acad. Sci. 92:8041-8045.
- Jongsma MA, Peters J, Stiekema WJ i Bosch D** (1996a) *Characterization and Partial Purification of Gut Proteinases of Spodoptera exigua Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 26(2):185-193.
- Jongsma MA, Stiekema WJ i Bosch D** (1996b) *Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests*. Trends in Biotechnology. 14(9): 331-333.
- Jorda L i Vera P** (2000) *Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic Arabidopsis plants. Luciferin induction of PR gene expression* Plant Physiology 124 (3): 1049-1057
- Joshi B, Sainani M, Bastawade K, Gupta VS i Ranjekar PK** (1998) *Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein*. Bioch. and Biophys. Res. Com. 246:382-387.
- Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R** (2006) *Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms*. Plant Physiol Biochem. 44(5-6):261-273
- Kar S, Johnson TM, Nayak P, et al.** (1996) *Efficient transgenic plant regeneration through Agrobacterium-mediated transformation of chickpea (Cicer arietinum L)* Plant Cell Reports 16 (1-2): 32-37
- Kato S, Kosaka H i Hara S** (1928) *On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants*. Bull. Sci. Fac. Agric., Kyushu Univ. Japan. 3:132-147.
- Kessler A i Baldwin IT** (2002) *Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis* Annual Review Of Plant Biology 53: 299-328
- Khush GS** (2005) *What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030* Plant Molecular Biology 59 (1): 1-6
- Kiefer IW, Slusarenko AJ.** (2003) *The pattern of systemic acquired resistance induction within the Arabidopsis rosette in relation to the pattern of translocation*. Plant Physiol. Jun;132(2):840-7
- Kim, J-Y, Park, S.Ch, Kim, M-H, Lim, H-T, Park, Y i Hahm K-S.** (2005) *Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **330**, 921-927.
- Kinkema, M., Fan, W., i Dong, X.** (2000). *Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression*. Plant Cell 12, 2339-2350.
- Kitajima S, Sato F.** (1999) *Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function*. Journal of Biochemistry 125 (1): 1-8
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, et al.** (2001) *Resistance to Pseudomonas syringae conferred by an Arabidopsis thaliana coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms* Plant Journal 26 (5): 509-522
- Kodama H, Nishiuchi T, Seo S, Ohashi Y, Iba K.** (2000). *Possible involvement of protein phosphorylation in the wound-responsive expression of Arabidopsis plastid omega-3 fatty acid desaturase gene*. Plant Science 155: 153-160.
- Koiwa H, Sato F, Yamada Y** (1994) *Characterization of accumulation of tobacco PR-5 proteins by ief-immunoblot analysis* Plant And Cell Physiology 35 (5): 821-827
- Koiwa H, Bressan RA i Hasegawa PM** (1997) *Regulation of protease inhibitors and plant defense*. Trends in Plant Science. 2(10):379-38.
- Kombrink E i Somssich IE** (1997) *Pathogenesis-related proteins and plant defense*. In: Carroll G and Tudzynski P eds. The Mycota V, Part A. Plant Relationships. Springer Verlag, 107-128.
- Kondo H, Abe K, Emori Y i Arai S** (1991) *Gene organization of oryzacystatinII, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatinI but different from those of animal cystatins*. FEBS Letters. 278:87-90.
- Kouassi NK, N'Guessan P, Albar L, et al.** (2005) *Distribution and characterization of Rice yellow mottle virus: A threat to African farmers* . Plant Disease 89 (2): 124-133

- Kubigsteltig I, Laudert D, Weiler EW.** (1999) *Structure and regulation of the Arabidopsis thaliana allene oxide synthase gene.* *Planta.*208(4):463-71.
- Kumar, D., Klessig, D. F.** (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has a salicylic acid-stimulated lipase activity. *PNAS* 100, 16101-16106
- Kumar S., Tamura, K. i Nei, M.** (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**, 150-163.
- Kunith M i Northrop JH** (1936) *Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and a inhibitor-trypsin compound* *J. Gen. Physiol.* 19:991-1007
- Kunith M** (1945) *Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean.* *Science* 101:668-669
- Kunith M** (1946) *Crystalline soybean trypsin inhibitor* *J. Gen. Physiol.* 29:149-154
- Kunith M** (1947a) *Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties* *J. Gen. Physiol.* 30:291-310
- Kunith M** (1947b) *Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor* *J. Gen. Physiol.* 30:311-320
- Kurepa J, Walker JM, smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL. Sung Dy I Vierstra RD** (2003) *The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress.* *J Biol Chem* 278(9):6862-6872
- Lamb CJ, Ryals JA, Ward ER, et al.** (1992) *Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens.* *Bio-Technology* 10 (11): 1436-1445
- Laskowski M Jr i Kato I** (1980) *Protein Inhibitors of proteinases.* *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626.
- Lawrence PK i Koundal KR** (2002) *Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects* *Electronic Journal Of Biotechnology* 5 (1)
- Lay FT i Anderson MA** (2005) *Defensins - Components of the innate immune system in plants* *Current Protein & Peptide Science* 6 (1): 85-101
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., i Ward, E.** (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* 16, 223–233
- Lee Hi, Leon J, Raskin I** (1995) *Biosynthesis and metabolism of salicylic-acid* *PNAS* 92 (10): 4076-4079
- Wang YC, Hu DW, Zhang ZG, et al.** (2003) *Purification and immunocytolocalization of a novel Phytophthora boehmeriae protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage* *Physiological And Molecular Plant Pathology* 63 (4): 223-232
- Leon J, Rojo E i Sanchez-Serrano JJ** (2001) *Wound signalling in plants.* *J Exp Bot.* 52(354):1-9.
- Leon J, Rojo E, Titarenko E, Sanchez-Serrano JJ.** (1998) *JA-dependent and – independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in Arabidopsis thaliana.* *Molecular and General Genetics* 258: 412–419.
- Leplé JC, Bonade-Bottino M, Augustin S, Pilate G, Le Tan VD, Deplanque A, Cornu D, Jouanin L** (1995) *Toxicity to Chrysomela tremulae (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor.* *Mol. Breeding* 1:319-328.
- Lewinsohn E, Gijzen M, Croteau R** (1991) *Defense-mechanisms of conifers - differences in constitutive and wound-induced monoterpen biosynthesis among species* *Plant Physiology* 96 (1): 44-49
- Li J i Liu JY** (2003) *A novel cotton gene encoding a new class of chitinase* *Acta Botanica Sinica* 45 (12): 1489-1496
- Li J, Burton RA, Harvey AJ, et al.** (2003) *Biochemical evidence linking a putative callose synthase gene with (1 -> 3)-beta-D-glucan biosynthesis in barley* *Plant Molecular Biology* 53 (1): 213-225
- Li L, Li C, Lee GI, Howe GA.** (2002) *Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6416-21.

BIBLIOGRAFIA

- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA** (2004) *The tomato homolog of CORONATINEINSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development.* Plant Cell 16:126-143
- Li SJ i Hochstrasser M** (1999) *A new protease required for cell-cycle progression in yeast.* Nature 398(6724):246-251.
- Li WL, Faris JD, Muthukrishnan S, et al.** (2001) *Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and beta-1,3-glucanases from wheat spikes infected by Fusarium graminearum* Theoretical And Applied Genetics 102 (2-3): 353-362
- Liener IE i Kakade ML** (1980) *Protease inhibitor.* En: Liener IE (eds) Toxic constituents of plant foodstuffs Academic Pres, New York: 7-71
- Lightner J, Pearce G, Ryan CA, Browse J** (1993) *Isolation of signalling mutants of tomato (Lycopersicon esculentum).* Mol Gen Genet 241:595-601.
- Lin W, Aunratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S i Datta SR** (1995) *Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight.* BiolTeclmology 13:686-691.
- Litvak ME, Monson RK** (1998) *Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory* Oecologia 114 (4): 531-540
- Liu D, Zhang X, Cheng Y, Takano T, Liu S.** (2006) *rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice (Oryza sativa L.).* Plant Physiol Biochem. 44(5-6): 380-386
- Liu Y, Luo J, Xu C, Ren F, Peng C, Wu G, Zhao J.** (2000) *Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed.* Plant Physiol. 122(4):1015-24.
- Liu Y, Schiff M, Czymbek K, Tallozy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP** (2005) *Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response.* Cell 121(4): 567-577
- Lois LM, Lima CD i Chua NH** (2003) *Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis.* Plant Cell 15(6): 1347-1359
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R.** (2003) *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense.* Plant Cell 15(1): 165-178
- Lorito M, Broadway RM, Hayes CK, Woo SL, Noviello C, Williams DL i Harman GE** (1994) *Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicide.* Molecular Plant-Microbe Interactions. 7:525-527.
- Lozovaya VV, Waranyuwat A, Widholm JM** (1998) *beta-1,3-glucanase and resistance to Aspergillus flavus infection in maize* Crop Science 38 (5): 1255-1260
- Ma C i Mitra A** (2002) *Expressing multiple genes in a single open reading frame with the 2A region of foot-and-mouth disease virus as a linker.* Mol Breed 9: 191-199
- Machida S i Saito M.** (1993) *Purification and characterization of membrane-bound chitin synthase.* J. Biol. Chem. **268**, 1702-1707.
- Mäkinen, K., Tamm, T., Naess, V., Truve, E., Puurand, U., Munthe, T., i Saarna, M.** (1995) *Characterization of cocksfoot mottle sobemovirus genomic RNA and sequence comparison with related viruses.* J. Gen. Virol. 76:2817-2825.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Cameron, R. K.** (2002) *A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in Arabidopsis.* Nature, 419, 399-403
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, et al.** (2000) *The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance.* Nat Genet.26:403-410
- Mallory PA, Travis J.** (1975) *Inhibition spectra of the human pancreatic endopeptidases.* Am J Clin Nutr. 28(8):823-30.
- Mares M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V i Baudys M** (1989) *Primary structure of Cathepsin-D inhibitor from potatoes and its structural relationship to trypsin inhibitor family.* FEBS Letters. 251:94-98.

- Matsuoka H, Yang HC, Homma T, Nemoto Y, Yamada S, Sumita O, Takatori K, Kurata H** (1995) Use of Congo Red as a microscopic fluorescence indicator of hyphal growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 102-108
- Matzke AJM i Matzke MA** (1998) *Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes* Current Opinion In Plant Biology 1 (2): 142-148
- Mauch F, Mauch-Mani B, Gaille C, et al.** (2001) *Manipulation of salicylate content in Arabidopsis thaliana by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase* Plant Journal 25 (1): 67-77
- Mazumdar-Leighton S, Broadway RM** (2001) *Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of Helicoverpa zea and Agrotis ipsilon feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor* Insect Biochemistry And Molecular Biology 31 (6-7): 633-644
- McDonald JK** (1985) *An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification.* Histochem J 17(7):773-85
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA.** (1992) *Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene.* Science. 20;255(5051):1570-3
- McManus MT, White DWR i McGregor PG** (1994) *Accumulation of chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests.* Transgenic Research. 3:50-58.
- Meindl T, Boller T, Felix G.** (1998). *The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it.* Plant Cell 10: 1561–1570.
- Meister G, Tuschl T.** (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature. 16;431(7006):343-9
- Melchior F** (2000) *SUMO--nonclassical ubiquitin.* Annu Rev Cell Dev Biol. 16:591-626.
- Mercado-Flores Y, Guerra-Sanchez G, Villa- Tanaca L, Hernández-Rodríguez C.** (2003) *Purification and characterization of an extracellular non-aspartyl acid protease (pumAe) from Ustilago maydis.* Curr Microbiol 7(5):408-11.
- MEROPS** (2006) (<http://merops.sanger.ac.uk/>)
- Mettraux JP.** (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. Trends Plant Sci. Aug;7(8):332-4.
- Mettraux JP, Nawrath C, Genoud T** (2002) *Systemic acquired resistance* Euphytica 124 (2): 237-243
- Michaud D, Cantin L i Vrain TC** (1995a) *Carboxy terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin insensitive insect digestive proteinases.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 322(2):469-474.
- Midoh N, Iwata M.** (1996) *Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice.* Plant Cell Physiol. Jan;37(1):9-18.
- Milligan S, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson V.** (1998) *The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes.* Plant Cell 10: 1307–1320.
- Minami E, Ozeki Y, Matsuoka M, Koizuka N, Tanaka Y.** (1989) Estructure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. Eur J Biochem. 20;185(1):19-25.
- Minami E, Tanaka Y** (1993) Nucleotide sequence of the gene for phenylalanine ammonia-lyase of rice and its deduced amino acid sequence. Biochim Biophys Acta 1171(3):321-2.
- Mittler R, Shulaev V, Lam E** (1995) Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* **7**, 29-42.
- Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G, Vance VB.** (2002) *RNA silencing and the mobile silencing signal.* Plant Cell. 14 Suppl:S289-301
- Molina MA, Avilés FX i Querol E.** (1992) *Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector.* **Gene** **116**, 129-138.

BIBLIOGRAFIA

- Molina MA., Marino C, Oliva B, Avilés FX and Queron E.** (1994) C-tail is a key residue for stabilization of complex between potato inhibitor and carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* **269**, 21467-21472.
- Moreno AB, Penas G, Rufat M, Bravo JM, Estopa M, Messeguer J, San Segundo B** (2005) Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(9): 960-972
- Mou Z, Fan W, Dong X.**(2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell.* 113:935-944.
- Movahedi S, Heale JB** (1990a) *Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by botrytis-cinerea pers ex pers in culture and in infected carrots* Physiological And Molecular Plant Pathology 36 (4): 289-302
- Movahedi S, Heale JB** (1990b) *The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of botrytis-cinerea pers ex pers* Physiological And Molecular Plant Pathology 36 (4): 303-324
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, et al.** (2001) *Agrobacterium-mediated transformation of Fusarium oxysporum: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer* Phytopathology 91 (2): 173-180
- Murashige T i Skoog F** (1962) *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* Physiology Plantarum. 15:473-497.
- Murdock LL, Brookhart G, Dunn PE, Foard DE i Kelley S** (1987) *Cysteine digestive proteinases in Coleoptera.* Comparative Biochemistry and Physiology-B. 87:783-787.
- Murphy JM, Walton JD** (1996) *Three extracellular proteases from Cochliobolus carbonum: Cloning and targeted disruption of ALPI* Molecular Plant-Microbe Interactions 9 (4): 290-297
- Murtas G, Reeves PH, Fu YF, Bancroft I, Dean C, Coupland G.** (2003) *A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates.* Plant Cell 15(10):2308-2319
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, et al.** (2003) *Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice* Plant Journal 33 (5): 887-898
- Nam J, Mysore KS, Gelvin SB** (1998) *Agrobacterium tumefaciens transformation of the radiation hypersensitive Arabidopsis thaliana mutants uvh1 and rad5* Molecular Plant-Microbe Interactions 11 (11): 1136-1141
- Nandi, A., Welti, R., Shah., J.** (2004) The Arabidopsis thaliana dihydroxyacetone phosphate reductase gene suppressor of fatty acid desaturase deficiency 1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 16, 465-477
- Nawrath C i Metraux JP** (1999) *Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation* Plant Cell 11 (8): 1393-1404
- Ndjiondjop, L. Albar, D. Fargette, C. Fauquet, i A. Ghesquière.** (1999) *The Genetic Basis of High Resistance to Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in Cultivars of Two Cultivated Rice Species.* APSnet Publication no. D-1999-0722-02R.: 931-935
- Nelson, C.** (1993) Strategies of Mold Control in Dairy Feeds. *J. Dairy Sci.*, 76: 898 – 902.
- Nelson, PEAE, Desjardins, AE.i Plattner RD** (1993) *Fumonisin, mycotoxins produced by Fusarium species: biology, chemistry, and significance.* Annu. Rev. Phytopathol. 31, 233-252.
- Nemoto Y, Sasakuma T.** (2000). Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 158(1-2): 53-60
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, et al.** (1995) *Is hydrogen-peroxide a 2nd-messenger of salicylic-acid in Systemic Acquired-Resistance* Plant Journal 8 (2): 227-233
- Nielsen LB, Finster K, Welsh DT, et al.** (2001) *Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from Zostera noltii and Spartina maritima meadows* Environmental Microbiology 3 (1): 63-71

- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BE, et al.** (2003) *Recognition and response in the plant immune system* Annual Review Of Genetics 37: 579-609
- Novillo C, Castañera, P i Ortego F** (1997a) *Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 36:181-201.
- Novillo C, Castañera, P i Ortego F** (1997b) *Inhibition of Digestive Trypsin-Like Proteases from Larvae of Several Lepidopteran Species by the Diagnostic Cysteine Protease Inhibitor E-64*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27(3):247-254.
- Odani S i Ikenaka T** (1977) *Studies on soybean trypsin-inhibitors .10. isolation and partial characterization of 4 soybean double-headed proteinase-inhibitors* Journal Of Biochemistry 82 (6): 1513-1522
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO i Bowles DJ** (1996) *Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants*. Science 274:1914-1917.
- O'Donnell PJ, Truesdale MR, Calvert CM, et al.** (1998) *A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals* Plant Journal 14 (1): 137-142
- Ohnmeiss TE, Baldwin IT.** (2000) Optimal Defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. Ecology 81: 1765-1783.
- Oka HI** (1958) *Intervarietal variation and classification of cultivated rice*. Ind. J. Genet. Plant Breeding. 18:79-89.
- Olson PD i Varner JE** (1993) *Hydrogen-peroxide and lignification* Plant Journal 4 (5): 887-892
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA.** (1999) *Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway*. PNAS 96: 6553-6557.
- Orozco-Cardenas M, McGurl B, Ryan CA.** (1993) *Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward Manduca sexta larvae*. PNAS 1;90(17):8273-8276.
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA.** (2001) *Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate*. Plant Cell. 13(1):179-91.
- Orr GL, Strickland JA i Walsh TA** (1994) *Inhibition of Diabrotica larval growth by a multicystatin from potato tubers*. Journal of Insect Physiology. 40:893-900.
- Ortego F, Novillo C i Castañera P** (1996) *Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, Sesamia nonagrioides Lef. (Lepidoptera: Noctuidae)*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 33:163-180.
- Ortego F, Sánchez-Ramos I, Ruiz M i Castañera P** (2000) *Characterization of proteases from a stored product mite, Tyrophagus putrescentiae*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 43(3):116-124.
- Ortells, R. C.** (2003) El cultivo del arroz, en "Jornada sobre el Genoma del arroz". Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.
- Ou SH** (1985) *Rice Diseases*. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Pannetier C, Giband M, Couzi P, Letan V, Mazier M, Tournear J i Hau B** (1997) *Introduction of new traits into cotton through genetic engineering: insect resistance as example*. Euphytica. 96:163-166.
- Pare PW i Tumlinson JH** (1999) *Plant volatiles as a defense against insect herbivores*. Plant Physiol. 121:325-331.
- Paris R i Lamattina L** (1999) *Phytophthora infestans secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato* European Journal Of Plant Pathology 105 (8): 753-760
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, et al.** (2004) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway* Plant Journal 37 (2): 186-198
- Park KS, Cheong JJ, Lee SJ, et al.** (2000) *A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection* Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure And Expression 1492 (2-3): 509-512

BIBLIOGRAFIA

- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004) *The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants*. *Phytochemistry*. 65(13): 1879-1893
- Pautot V, Holzer FM, Walling LL**. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Mol Plant Microbe Interact*. 1991 **4**(3):284-292
- Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano JJ, Mertens R, Willmitzer L, Prat S.**(1989) *Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato*. *PNAS* 86(24):9851-9855.
- Pena-Cortes H, Fisahn J, Willmitzer L.** (1995) *Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants*. *PNAS* 92(10):4106-13.
- Pena-Cortes H, Prat S, Atzorn R, Wasternack C i Willmitzer L** (1996) *Abscisic acid deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemic treatment*. *Planta*. 198:447-451.
- Pernas M, López-Solanilla E, Sánchez-Monge R, Salcedo G i Rodríguez-Palenzuela P** (1999) *Antifungal Activity of a Plant Cystatin* *MPMI* 12 (7),:624-627
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G.** (2000) *Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut*. *FEBS Lett*. 467(2-3):206-10.
- Peumans WJ, Proost P, Swennen RL, et al.** (2002) *The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins* *Plant Physiology* 130 (2): 1063-1072
- Pieper U, Eswar N, Braberg H, Madhusudhan MS, Davis FP, Stuart AC, Mirkovic N, Rossi A, Marti-Renom MA, Fiser A, Webb B, Greenblatt D, Huang CC, Ferrin TE, Sali A** (2004) *MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources*. *Nucleic Acids Res.* **32**, D217-22.
- Pieterse CM, Van Loon LC.** (2004) *NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways*. *Curr Opin Plant Biol* 7:456-464.
- Pieterse CM, van Wees SC, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC** (1996) . *Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression*. *Plant Cell* 8(8): 1225-1237
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., i Van Loon, L.C.** (1998). *A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Pieterse CM, Van Pelt JA, Van Wees SC , Ton J, Leon-loosterziel KM, Keurentjes JB, Verhagen BW, Knoester M, Van der Sluis I, Bakker PA i Van Loon LC** (2001) *Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression*. *European Journal of Plant Pathology*. 107:51-61.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J, et al.** (2002) *Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana* *Plant Biology* 4 (5): 535-544 **Pieterse CMJ i Van Loon LC** (1999) *Salicylic acid-independent plant defence pathways* *Trends In Plant Science* 4 (2): 52-58
- Qu F, Ren T, Morris TJ.** (2003) *The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step*. *J Virol*. 77(1):511-22
- Quiocho FA, Brown RD, Bethge PH, et al.** (1971) *X-ray-diffraction and nuclear magnetic-resonance dispersion studies on derivatives of carboxypeptidase-A* *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* 36: 561
- Rakwal R i Komatsu S** (2000) *Role of jasmonate in the rice (Oryza sativa L.) self-defense mechanism using proteome analysis*. *Electrophoresis* 21(12): 2492-2500
- Rakwal R, Agrawal GK, Yomekura M** (1999) *Separation of proteins from stressed rice (Oryza sativa L) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins*

- Rakwal R, Agrawal GK, Agrawal VP** (2001) *Jasmonate, salicylate, protein phosphatase 2A inhibitors and kinetin up-regulate OsPR5 expression in cut-responsive rice (Oryza sativa)* Journal Of Plant Physiology 158 (10): 1357-1362 *by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride*. Electrophoresis 20: 3472-3478
- Ramos A , Mahowald A, Jacobslorena M** (1994) *Peritrophic matrix of the black fly simulium-vittatum - formation, structure, and analysis of its protein-components* Journal Of Experimental Zoology 268 (4): 269-281
- Rancour JM i Ryan CA** (1968) *Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125:380-382.
- Rawlings ND i Barrett AJ** (1993) Evolutionary families of peptidases. Biochem J. 290 (1):205-18.
- Rawlings, N.D. i Barrett AJ.** (1995) *Evolutionary families of metallopeptidases*. Methods Enzymol. 248, 183-228
- Rawlings ND i Barrett AJ** (2000) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res. 28(1):323-5.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ.** (2004) *Evolutionary families of peptidase inhibitors*. Biochem J. 378(Pt 3):705-16.
- Reddy PV, Lam CK i Belangerr FC** (1996) *Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity*. Plant Physiol 111(4):1209-1218.
- Rees DC i Lipscomb WN** (1982) *Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase a at 2.5 angstroms resolution*. J. Mol. Biol. 160:475-498.
- Rees DC, Lewis M, Lipscomb WN.** (1983) *Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54Å resolution*. J. Mol. Biol. 168, 367-387.
- Reverter, D., Vendrell, J., Canals, F., Horstmann, J., Avilés, F.X., Fritz, H. & Sommerhoff, C.P.** (1998). Journal of Biological Chemistry 273, 32927-32933.
- Reverter, D., Fernandez-Catalan, C., Baumgartner, R., Pfänder, R., Huber, R., Bode, W., Vendrell, J., Holak, T. & Aviles, F.X.** (2000). Nature Structural Biology 7, 322-328.
- Reymond, P., i Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 404-411
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE.** (2000) *Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis*. Plant Cell 12: 707-719.
- Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RM, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE** (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. Plant Cell 16:3132-3147.
- RiceBlastDB** (2001) *Database for the rice blast fungus, Magnaporthe grisea*: <http://ascus.plbr.cornell.edu/blastdb/>
- Riceweb** produït per International Rice Research Institute (IRRI), West Africa Rice Development Association (WARDA) i Centro Internacional Agricultura Tropical (CIAT) (2002): <http://www.riceweb.org>
- Richardson MJ** (1991) *Seed storage proteins: The enzyme inhibitors*. In: Richardson MJ, ed. Methods in Plant Biochemistry. Academic Press. p. 259-305.
- Roberts JA, Whitelaw CA, Gonzalez-Carranza ZH, et al.** (2000) *Cell separation processes in plants - Models, mechanisms and manipulation* Annals Of Botany 86 (2): 223-235
- Rolka K, Kupryszewski G, Ragnarsson U, Otlewski J, Krokoszynska I i Wilusz T** (1991) *Chemical synthesis of new trypsin, chymotrypsin and elastase inhibitors by amino-acid substitutions in a trypsin inhibitor from squash seeds (CMTI III)*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, Volume 372, Issue 1, January 1991, Pages 63-68.
- Rossi M, Goggin F, Milligan S, Kaloshian I, Ullman D, Williamson V.** (1998) *The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid*. PNAS 95: 9750-9754.
- Rouster J, Leah R, Mundy J i Cameron-Mills V** (1997) *Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain*. Plant Journal. 11(3):513-523.
- Ruíz-Rivero OJ i Prats S** (1998) *A -308 deletion of the tomato LAP promoters is able to direct flower-specific and MeJA-induced expression in transgenic plants*. Plant Molecular Biology. 36(5):639-648.

BIBLIOGRAFIA

- Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, et al.** (1995) *Signal-Transduction In Systemic Acquired-Resistance* PNAS 92 (10): 4202-4205
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY i Hunt MD** (1996) *Systemic Acquired Resistance*. Plant Cell 8:1809-1819.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., i Uknes, S.** (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I?B. Plant Cell 9, 425-439.
- Ryan CA** (1968) *Synthesis of chymotrypsin inhibitor i protein in potato leaflets induced by detachment* Plant Physiology 43 (11): 1859
- Ryan CA** (1978) *Proteinase-inhibitors in plant leaves - biochemical model for pest-induced natural plant protection* Trends In Biochemical Sciences 3 (7): 148-150
- Ryan, CA** (1989) *Insect-induced chemical signals regulating natural plant protection responses*. In: Denno, R.F. and McClure M.S., eds. *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. New York, Academic Press. pp. 43-60.
- Ryan CA** (1990) *Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens* Annual Review Of Phytopathology 28: 425-449
- Ryan CA** (2000) *The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes*. Biochimica et Biophysica Acta. 1477(1-2):112-121.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE** (2000) *Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?* Biochim Biophys Acta. 1492(1):1-14
- Saitou N i Nei, M.** (1987) *The neighbour-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees*. Mol. Biol. 4, 406-425.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, et al.** (2002) *Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery* Proteomics 2 (9): 1131-1145
- Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard, J.P., Larmande, P., Ortega, D., Raymal, M., Portefaix, M., Ouwerkerk, P.B.F., Rueb, S., Delseny, M. and Guiderdoni, E.** (2003) *Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (Oryza sativa L.) functional genomics*. Theor. Appl. Genet. 106, 1396-1408.
- Sambrook R, Fritsch E i Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarra S, Oevering P, Guindo S, et al.** (2004) *Wind-mediated spread of Rice yellow mottle virus (RYMV) in irrigated rice crops*. Plant Pathology 53 (2): 148-153
- Schechter I i Berger A** (1967) *On the size of the active site in proteases I Papain*. Biochem Biophys Res Commun 27:157-162
- Scheer JM, Ryan CA.** (1999). *A 160-kD systemin receptor on the surface of Lycopersicon peruvianum suspension-cultured cells*. Plant Cell 11: 1525-1535.
- Schenk PM, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) *Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11655-11660
- Schillmiller AL i Howe GA** (2005) *Systemic signaling in the wound response*. Curr Opin Plant Biol. 8(4): 369-377
- Schmaedick MA i Shelton AM** (2000) *Arthropod predators in cabbage (Cruciferae) and their potential as naturally occurring biological control agents for Pieris rapae (Lepidoptera:Pieridae)* Canadian Entomologist 132 (5): 655-675
- Schweizer P, Buchala A, i Métraux JP** (1997) *Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid*. Plant Physiol. 115:61-70.
- Schweizer P, Buchala A, Silverman P, et al.** (1997) *Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels* Plant Physiology 114 (1): 79-88

- Seemuller E , Lupas A, Stock D, et al** (1995) *Proteasome from thermoplasma-acidophilum - a threonine protease* Science 268 (5210): 579-582
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD.** (2001). *Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses*. PNAS 98: 4788–4793.
- Seo S, Sano H, Ohashi Y.** (1999). *Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase*. Plant Cell 11: 289–298.
- Sesma A. i Osbourn AE** (2004) The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431(7008): 582-586
- Shah J, Tsui F, Klessig DF** (1997) *Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sail) of Arabidopsis thaliana, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene* Molecular Plant-Microbe Interactions 10 (1): 69-78
- Shelton AL** (2000) *Variable chemical defences in plants and their effects on herbivore behaviour* Evolutionary Ecology Research 2 (2): 231-249
- Shelton D, Aitken K, Doimo L, et al.** (2002) *Genetic control of monoterpene composition in the essential oil of Melaleuca alternifolia (Cheel)* Theoretical And Applied Genetics 105 (2-3): 377-383
- Shelton D, Leach D, Baverstock P, et al.** (2002) *Isolation of genes involved in secondary metabolism from Melaleuca alternifolia (Cheel) using expressed sequence tags (ESTs)* Plant Science 162 (1): 9-15
- Shevchik VE, Boccara M, Vedel R, Hugouvieux-Cotte-Pattat N.**(1998) *Processing of the pectate lyase Pell by extracellular proteases of Erwinia chrysanthemi 3937*. Mol Microbiol. 29(6):1459-69.
- Shewry PR, Lucas JA** (1997) *Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens* Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology 26: 135-192
- Shibuya N, Minami E.** (2001) *Oligosacchraide signalling for defence responses in plant*. Physiological and Molecular Plant Pathology 59: 223–233.
- Shimoda T, Ozawa R, Arimura G, et al.** (2002) *Olfactory responses of two specialist insect predators of spider mites toward plant volatiles from lima bean leaves induced by jasmonic acid and/or methyl salicylate* Applied Entomology And Zoology 37 (4): 535-541
- Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S, Takafuji A.** (2000) *Herbivore–species– specific interactions between crucifer plants and parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae) that are mediated by infochemicals present in areas damaged by herbivores*. Applied Entomology and Zoology 35 : 519– 524.
- Siebertz B, Logemann J, Willmitzer L i Schell J** (1989) *cis-Analysis of the Wound-Inducible Promoter wun1 in Transgenic Tobacco Plants and Histochemical Localization of Its Expression*. Plant Cell 1:961-968.
- Silverman P, Seskar M, Kanter D, Schweizer P, Metraux JP, Raskin I.** (1995) Salicylic Acid in Rice (Biosynthesis, Conjugation, and Possible Role). Plant Physiol. 108(2):633-639.
- Simmons CR, Litts JC, Huang N, et al.** (1992) *Structure of a rice beta-glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic-acid and fungal elicitors* Plant Molecular Biology 18 (1): 33-45
- Singh NK, Bracker CA, Hasegawa PM, et al.** (1987) *Characterization of osmotin - a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant-cells*
- Singh NK, Nelson DE, Kuhn D, et al.** (1989) *Molecular-cloning of osmotin and regulation of its expression by aba and adaptation to low water potential* Plant Physiology 90 (3): 1096-1101
- Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, et al.** (1999) *Metabolic engineering of Arabidopsis and Brassica for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production* Nature Biotechnology 17 (10): 1011-1016
- Song WY, Wang GL, Chen LL, et al.** (1995) *A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, xa21* SCIENCE 270 (5243): 1804-1806

BIBLIOGRAFIA

- Soosaar JL, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP.** (2005) *Mechanisms of plant resistance to viruses*. Nat Rev Microbiol. 3(10):789-98.
- Spoel, S.H., et al.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 15, 760–770
- Sreedhar L, Kobayashi DY, Bunting TE, Hillman BI i Belanger FC.**(1999) *Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen Magnaporthe poae with its host*. Gene 235(1-2):121-129
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C** (2003) *Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signaling*. Plant J 33:577-589
- Sticher L, Mauch-Mani B i Métraux JP** (1997) *Systemic acquired resistance*. Annu. Rev. Phytopathol. 35:235-270.
- Stotz HU, Kroymann J, Mitchell-Olds T.** (1999) *Plant–insect interactions*. Current Opinion in Plant Biology 2: 268–272.
- Stotz HU, Pittendrigh BR, Kroymann J, Weniger K, Fritsche J, Bauke A, Mitchell-Olds T.** (2000) *Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth*. Plant Physiology 124: 1007–1017.
- Stout MJ, Fidantsef AL, Duffey SS, et al.** (1999) *Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, Lycopersicon esculentum* Physiological And Molecular Plant Pathology 54 (3-4): 115-130
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., i Brisson, N.** (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. Nat. Biotechnol. 19, 769–772.
- Sun SK i Snyder WC** (1981) *The bakanae disease of the rice plant*. In *Fusarium: Diseases, biology and Taxonomy*. Eds. Nelson, Tousson and Cook. Pennsylvania State Univ., Univ. Park, Pennsylvania. pp 104-113.
- Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S i Zhang Q** (2004) *Xa26, a gene conferring resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein* Plant Journal 37 (4): 517-527
- Suzuki N, Geletka LM, Nuss DL** (2000) *Essential and dispensable virus-encoded replication elements revealed by efforts to develop hypoviruses as gene expression vectors*. J Virol 74: 7568–7577
- Svensden AB i Merckx IJM** (1989) *Occurrence of glycosidic bound volatile compounds in plants .3. a simple method for screening of fresh plant-material for glycosidic bound volatile compounds* Planta Medica (1): 38-40
- Svensden AB, Vankempenverleun AM, Verpoorte R** (1984) *Circular thin-layer chromatography of quaternary alkaloids – quaternary protoberberine alkaloids in plant-material* Journal Of Chromatography 291: 389-391
- Talbot NJ** (1995) *Having a blast: exploring the pathogenicity of Magnaporthe grisea*. Trends in microbiology. 3:9-16.
- Tamayo MC, Rufat M, Bravo JM and San Segungo B** (2000) Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis*. *Planta* 211, 62-71
- Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, et al.** (2001) *Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in Arabidopsis thaliana* Plant Journal 26 (4): 365-373
- Tao Y, Xie ZY, Chen WQ, et al.** (2003) *Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen. Pseudomonas syringae*. Plant Cell 15 (2): 317-330
- Terra WR i Ferreira C** (1994) *Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function*. Comp Biochem Physiol 109B: 1-62.
- Terras F, Schoofs H, Thevissen K, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue B, Broekaert WF.** (1993) *Synergistic Enhancement of the Antifungal Activity of Wheat and Barley Thionins by Radish and Oilseed Rape 2S Albumins and by Barley Trypsin Inhibitors*. Plant Physiol. 103(4):1311-1319.

- Terras FRG, Broekaert WF, Janssens FA** (1995) *A pathogen-induced antifungal plant defensin from radish leaves* Journal Of Cellular Biochemistry : 490-490
- Thain JF, Gubb IR, Wildon DC.** (1995) *Depolarization of tomato leaf cells by oligogalaturonide elicitors.* Plant, Cell & Environment 18: 211–214.
- Thaler JS, Fidantsef AL, Duffey SS, et al.** (1999) *Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: A field demonstration of chemical elicitors of induced resistance* Journal Of Chemical Ecology 25 (7): 1597-1609
- Thaler JS, Stout MJ, Karban R, Duffey SS.** (2001) *Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores.* Ecological Entomology 26: 312–324
- Thaler JS, Farag MA, Pare PW, et al.** (2002) *Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores* Ecology Letters 5 (6): 764-774
- Theis T i Stahl U** (2004) *Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications.* Cell Mol Life Sci 61, 437-455.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP i Broekaert WF** (1998) *Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15107–15111.
- Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Broekaert WF, et al.** (2001) *The complexity of disease signaling in Arabidopsis* Current Opinion In Immunology 13 (1): 63-68
- Thomma BPHJ, Cammue, B. Thevissen P. A.** (2002) Plant defensins. Planta. 216, 193-202.
- Thompson, JD., Higgins, D.J and Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and wight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* 22, 4673-4680.
- Titani K., Ericsson L.H., Walsh K.A. i Neurath, H.** (1975) Amino-acid sequence of bovine carboxypeptidase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1666-1670.
- Ton J, Mauch-Mani B** (2004) *beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose.* Plant Journal 38 (1): 119-130
- Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Metraux JP, Van Loon LC, Pieterse CM.** (2002) Characterization of Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant J.* Jan;29(1):11-21.
- Tor M, Brown D, Cooper A, et al.** (2004) *Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP27 encodes a receptor-like protein similar to CLAVATA2 and tomato Cf-9.* Plant Physiology 135 (2): 1100-1112
- Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, et al.** (2003) *Structure, heterologous expression, and properties of rice (Oryza sativa L.) family 19 chitinases* Bioscience Biotechnology And Biochemistry 67 (5): 1063-1070
- Tu, J., Datta, K., Khush, G.S., Zhang, Q., i Datta, S.K.** (2000). *Field performance of Xa21 transgenic indica rice (Oryza sativa L.), IR72.* Theoretical and Applied Genetics, 101, 15-20.
- Tu TTN, Derenne S, Largeau C, et al.** (2000) *Effects of fungal infection on lipid extract composition of higher plant remains: comparison of shoots of a Cenomanian conifer, uninfected and infected by extinct fungi* Organic Geochemistry 31 (12): 1743-1754
- Tzfira T i Citovsky V** (2002) *Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium* Trends In Cell Biology 12 (3): 121-129
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V** (2002) *Increasing plant susceptibility to Agrobacterium infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1* PNAS 99 (16): 10435-10440
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X, Holuigue L.** (2004). NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact.* Jan;17(1):34-42

BIBLIOGRAFIA

- Urban, M., Bhargava, T., Hamer, J. E.** (1999) An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *The EMBO Journal*, 18 (3), 512-521
- Urwin P, Yi L, Martin H, Atkinson H i Gilmartin PM** (2000) Functional characterization of the EMCV IRES in plants. *The Plant Journal* 24:5, 583-589
- Urwin P, Yi L, Martin H, et al.** (2000) *Functional characterization of the EMCV IRES in plants* *Plant Journal* 24 (5): 583-589
- Urwin PE, McPherson MJ i Atkinson HJ** (1998) *Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs.* *Planta* 204 (4):472-479.
- Urwin PE, Lilley CJ, Atkinson HJ** (2002) *Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference* *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (8): 747-752
- Urwin PE, Zubko EI, Atkinson HJ** (2002) *The biotechnological application and limitation of IRES to deliver multiple defence genes to plant pathogens* *Physiological And Molecular Plant Pathology* 61 (2): 103-108
- Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, Jansens S, de Beukler M, Dean C, Zabeau M, van Montagu M i Leemans J** (1987) *Transgenic plants protected from insect attack.* *Nature*. 328:33-37.
- Valentin HE, Broyles DL, Casagrande LA, et al.** (1999) *PHA production, from bacteria to plants* *International Journal Of Biological Macromolecules* 25 (1-3): 303-306
- Valueva T.A i Molosov V.V.** (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* **69**, 1305-1309.
- Van Dam NM, Horn M, Mares M, Baldwin IT.** (2001) Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology* 27: 547-568.
- Van Loon LC** (1999) *Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins.* En: *Pathogenesis-related proteins in plants*, S.K. Datta, S. Muthukrishnan (eds.), CRC Press, Boca Raton, 1-19
- Van Loon LC i Van Strien EA** (1999) *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.* *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller Th, Conejero V.** (1994) *Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins.* *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264 (1994).
- Van Loon, J.J.A., J.G. de Boer i M. Dicke** (2000) Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 219-227
- Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ** (2006a) *Ethylene as a modulator of disease resistance in plants.* *Trends Plant Sci.* 11(4): 184-191.
- Van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006b) *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.* *Ann. Rev. Phytopatol.* 44, 135-162.
- Van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I, et al.** (1999) *Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge* *Plant Molecular Biology* 41 (4): 537-549
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., i Pieterse, C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8711-8716.
- Varshavsky A** (1992) **The N-end rule.** *Cell* 69: 725-735
- Velazhahan R, Datta SK, Muthukrishnan S.** The PR-5 family; Thaumatin-like Proteins. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*, S.K. Datta, S. Muthukrishnan (eds.), CRC Press, Boca Raton, 107-129 (1999).

- Vendrell J , Wides G, Aviles FX, et al.** (1990a) *Sequence-specific H-1-NMR assignments and determination of the secondary structure for the activation domain isolated from pancreatic procarboxypeptidase-B* Biochemistry 29 (32): 7515-7522
- Vendrell J , Aviles Fx, Vilanova M, et al.** (1990b) *H-1-NMR studies of the isolated activation segment from pig procarboxypeptidase-A* Biochemical Journal 267 (1): 213-220
- Vendrell J , Billeter M, Wider G, et al.** (1991) *The NMR structure of the activation domain isolated from porcine procarboxypeptidase-B* Embo Journal 10 (1): 11-15
- Vendrell J, Querol E i Avilés FX** (2000) *Metalloproteases and their protein inhibitors, Structure, function and biomedical properties.* Bioch et Biophys Acta (BBA) - Protein Struct. and Mol. Enz. 1477(1-2):284-298.
- Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J i Linthorst HJM** (2000) *Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance.* Nat. Biotechnol. 18:779-783.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM.** (2004) *The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis.* Mol Plant Microbe Interact 17(8):895-908.
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP** (1991) *A new family of plant antifungal proteins* Molecular Plant-Microbe Interactions 4 (4): 315-323
- Vignols F, Lund G, Pammi S, et al.** (1994) *Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein* Gene 142 (2): 265-270
- Vignols F, Wigger M, GarciaGarrido JM, et al.** (1997) *Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated* Gene 195 (2): 177-186
- Vila L.** (2003) *Estratègies per a la millora de la resistència de l'arròs (Oryza sativa L) front el lepidòpter Chilo suppressalis i front a fongs fitopatògens.* Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J.C., Marfá, V., Murillo, I., Vassal, J. M., Messeguer, J., Guiderdoni, E. i San Segundo, B.** (2005) Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against striped stem borer (*Chilo suppressalis*): Effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology J.* 3, 187-202.
- Villanueva J, Canals F, Prat S, Ludevid D, Querol E i Avilés FX** (1998) *Characterization of the wound-induced metalloprotease inhibitor from potato, cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal propeptide.* FEBS Letters. 440(1-2):175-182.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., i Baulcombe, D.** (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23:14147-14152.
- Volpicella M, Ceci LR, Cordewener J, et al.** (2003) *Properties of purified gut trypsin from Helicoverpa zea, adapted to proteinase inhibitors* European Journal Of Biochemistry 270 (1): 10-19
- Walling LL.** (2000) *The myriad plant responses to herbivores.* Journal of Plant Growth Regulation 19 : 195–216.
- Wang CX, Avdiushko S, Hildebrand DF.** (1999) *Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco.* Plant Molecular Biology 40: 783–793.
- Wang P , Li GX, Kain W** (2004) *Characterization and cDNA cloning of midgut carboxypeptidases from Trichoplusia ni* Insect Biochemistry And Molecular Biology 34 (8): 831-843
- Wang SC, Ichii M, Taketa S, et al.**(2002) *Lateral root formation in rice (Oryza sativa): promotion effect of jasmonic acid* Journal Of Plant Physiology 159 (8): 827-832
- Wang SJ, Lan YC, Chen SF, Chen YM i Yeh KW** (2002) *Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region.* Plant Molecular Biology. 48(3):223-231.
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB.** (1998) *Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA* PNAS95(23):13959-64.

BIBLIOGRAFIA

- Weber H** (2002) *Fatty acid-derived signals in plants*. Trends in Plant Science. 7(5):217-224.
- Webster RK i Gunnell PS** (1992) Compendium of Rice Diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Weissbecker B, Van Loon JJA, Dicke M.** (1999) Electroantennogram responses of a predator, *Perillus bioculatus*, and its prey, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. Journal of Chemical Ecology 25: 2313–2325.
- Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B. and Polya, G. M.** (2000) *Defense proteins from seed of Cassia fistula include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin*. Plant Sci, , 243-255.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., i Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414, 562–565.
- Williamson VM i Hussey RS** (1996) *Nematode pathogenesis and resistance in plants*. Plant Cell. 8:1735-1745.
- Wolfson JL, Murdock LL** (1990a) *Diversity in digestive proteinase activity among insects* Journal Of Chemical Ecology 16 (4): 1089-1102
- Wolfson JL, Murdock LL** (1990b) *Growth of manduca sexta on wounded tomato plants - role of induced proteinase-inhibitors* Entomologia Experimentalis et Applicata 54 (3): 257-264
- Wright GC, Patten KD, Drew MC** (1994) *Mineral-composition of young rabbiteye and southern highbush blueberry exposed to salinity and supplemental calcium* Journal Of The American Society For Horticultural Science 119 (2): 229-236
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Léon J, Fitzsimmons KC, Levine EB, Raskin I i Shah DM** (1997) *Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants*. Plant Physiol. 115:427–435.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, et al.** (1997) *Abscisic acid signaling through cyclic ADP-Ribose in plants* Science 278 (5346): 2126-2130
- Xiao SY, Brown S, Patrick E, Brearley C i Turner JG** (2003) *Enhanced transcription of the Arabidopsis disease resistance genes RPW8.1 and RPW8.2 via a salicylic acid-dependent amplification circuit is required for hypersensitive cell death*. Plant Cell 15:33-45
- Xie DX, Feys BF, James S, et al.** (1998) *COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility* Science 280 (5366): 1091-1094
- Xu LH, Liu FQ, Lechner E, et al.** (2002) *The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis* Plant Cell 14 (8): 1919-1935
- Xu XM, Ye HC, Li GF, et al.** (2000) *Comparison of some characteristics between Phragmites communis and its salt tolerant variant* Acta Botanica Sinica 42 (11): 1126-1130
- Yencho GC, Cohen MB, Byrne PF.** (2000) *Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants*. Annual Review of Entomology 45: 393–422.
- Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J., Lucas W.J.** (2004) *A systemic small RNA signaling system in plants*. Plant Cell 16: 1979–2000
- Yu D, Chen C, Chen Z.**(2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant Cell 13:1527–1540.
- Yu DQ, Liu YD, Fan BF, et al.** (1997) *Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato?* Plant Physiology 115 (2): 343-349
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z,**

- Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296(5565): 79-92
- Yun DJ, Zhao Y, Pardo JM, et al.** (1997) *Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein.* PNAS 94 (13): 7082-7087
- Zhang, Z.-P., I. T. Baldwin** (1997) *Transport of [2-¹⁴C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in Nicotiana sylvestris.* Planta 203: 436–441
- Zhang YX, Bak DD, Heid H, et al.** (1999) *Molecular characterization of a protease secreted by Erwinia amylovora* Journal Of Molecular Biology 289 (5): 1239-1251
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., i Dong, X.** (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 6523–6528.
- Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X.** (2003) Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. Plant Cell 15:2647–2653.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R.** (2005) *Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites.* Biotechnol Adv. 23(4): 283-333 (2005).
- Zhao J-Z, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush R, Earle ED i Shelton AM** (2003) *Transgenic plants expressing two Bacillus thuringiensis toxins delay insect resistance evolution.* Nat Biotechnol 21: 1493–1497.
- Zhou JM, Tang XY, Frederick R, et al.**(1998) *Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase* Journal Of Plant Research 111 (1102): 353-356
- Zhou JM, Trifa Y, Silva H, et al.** (2000) *NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid* Molecular Plant-Microbe Interactions 13 (2): 191-202
- Zhou L, Jang JC, Jones TL, et al.** (1998) *Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant* PNAS 95 (17): 10294-10299
- Zhou N, Tootle TL, Tsui F, et al.**(1998) *PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis* Plant Cell 10 (6): 1021-1030
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA i Lamb CJ** (1994) *Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco.* Biotechnology. 12:807-812.
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C.**(2000). *Molecular cloning of allene oxide cyclase – The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates.* Journal of Biological Chemistry 275: 19132–19138.

BIBLIOGRAFIA

Aquest apartat, és per a mi el més important de la tesi, ja que tot i que pugui sonar a tòpic, aquesta ha tingut en major o menor grau, molts "autors".

En primer lloc, voldria agrair a la Dra. Blanca San Segundo haver-me permès formar part del seu grup de recerca, i la confiança dipositada en mi. Vull també agrair-li la seva aportació científica i les correccions del present treball.

Je tiens à remercier Dr. Emmanuel Guiderdoni pour m'avoir accueilli dans son group de recherche pendant mes séjours à Montpellier. Merci pour ton aide et ta confiance, et pour m'avoir conseillé et appuyé à tout moment avec la « crisis » de *Chilo*. Un grand merci aussi au Dr. Christophe Brugidou, autant pour m'avoir reçu dans son groupe de façon si agréable que pour sa grande humanité, et pour toujours m'enthousiasmer en évoquant mes résultats et de mon futur scientifique. Merci à tous les deux pour être d'aussi bon chef que des personnes humaines que j'ai eues plaisir de connaître.

Gràcies també al grup de la Dra. Quima Messeguer (IRTA-Cabrils), per la transformació d'arròs de la varietat Sènia, i en especial a la Gisela Peñas.

Vull agrair també el grup del Dr. F. Xavier Avilés (UAB) per haver-nos cedit el clon del gen *pci* i l'inhibidor purificat, així com a la Júlia Lorenzo per les columnes de Sepharosa-PCI. Agrair també a la Mónica Rodríguez de la Vega pel seu ajut en l'anàlisi de l'estructura secundària de la MgCPB. Gràcies també al Dr. F.X. Avilés per haver acceptat ser el meu tutor de tesi.

Al personal d'hivernacles, a l'Eva, l'Alejandro, la Leire i el César, per tota la seva ajuda aquests anys i per fer dels hivernacles un dels llocs més agradables on treballar. Vull agrair molt i molt especialment a la Dr. Pilar Fontanet, per la seva ajuda i enorme professionalitat, només superada per una immensa qualitat humana. Pilar, gràcies per tot el teu ajut aquests anys, per escoltar-me i recolzar-me sempre, i per sobre de tot per la teva gran amistat.

A la gent dels diferents serveis de la casa, com el Raúl (...era Ruben??) l'informàtic, per la seva eficàcia i pels bons moments, i l'Àngel (coronel photoshop), per la seva ajuda amb les fotografies i el tractament d'imatges. També a la Mònica per l'ajuda amb el confocal i a la Mercè i la Mireia per les muntanyes de seqüències analitzades tant ràpidament.

A tots els companys del Departament de Genètica Molecular del CSIC, tant d'abans com d'ara. Al **lab groc**: la Laura (tu tens un apartat especial a baix...), la Mina (por cuidarme tanto siempre y por toda tu ayuda, por ser la mejor alumna de catalán, y sobretodo por ser tan buena persona!), l'Eli, l'Eva (bienvenida de nuevo!), l'Al (el nostre "anglès-català", moltes gràcies per la teva ajuda i sort en el futur), la M^aJosé i el JoseAntonio. Al **lab lila**: el Jaume, l'Irma (pels anys compartits i per la teva ajuda), el Jordi B (per la teva bondat), Luis (por todos los pedidos), la Céline S, l'Anahit, la Salo, l'Ashraf (suerte a ti y a los tuyos!), la Mariana, la Marta B i la Jumana. Al **lab vermell**: el Marc (pels grans moments compartits tant al CSIC com a Montpeller, amb els vinets i els carretons "kamikazes"), l'Eli ("la cunyi"), la Maite (estas sola morena?), la Marga, la Carmen Romera, el Pau (pels seus consells "proteics"), l'Imma, la Sabine i la Lola. Als **'taronges'**: al Víctor, el Hans, en Carles (també per les immersions marines compartides!), l'Amparo, la Matilda, el Pere, l'Eli M (ànim i molta sort en el futur!) i la Fanchon. A la Desi dels **'fruitis'**. Al **lab blau**: el Sami (gracias por toda tu ayuda y consejos proteómicos y suerte con tu tesis!), la Cristina (molts ànims en la recta final!), l'Ana Paula (mucho suerte, y piensa que al final llega la recompensa!), l'Alicia, la Montse, el Lorenzo, el Javi, l'Eva, l'Adela, la Vicky, i la Claudia. Als **'verds'**, Cristian (gracias por todos los momentos compartidos estos años, y sobre todo por tu amistad, pronto nos veremos!), Núria (pels bons moments dins i fora, i per organitzar-ho tot sempre tant bé), Carlos V (por tus consejos y ayuda), Torben, Ignacio i Hèdia. Al **lab negre**: al Fatty (amics per sempre!), al David (per les discussions "futboleres" i el seu humor tant especial), la Valeria (por todos los buenos momentos, toda la suerte con la tesis!), Silvia F (gracias por tu ayuda y suerte con todo!), El Jordi B, l'Inma, i el Joan. Als **'grisos'**: el Néstor (company de promoció a la "uni" i al doctorat! Toda la suerte con esta nueva etapa!), el Pep, l'Enric i la Céline L. Als **'cucarachos'** i al grup dels **'Torné'**: l'André (muito obrigado!), l'Enrique (sigue nadando, llegarás lejos!) i la Patricia. A tota la gent de la sisena: Meri (segueix treballant amb aquesta alegria!), Juanjo (gracias por los consejos "víricos"), l'Ana, el Sergi, el Mariano, la Paloma, la Soraya, la Cristina, la Maida, la Paula, el Nahuel i l' Antoine. Vull agrair especialment a tots aquells que fora del seus països, han compartit aquests anys i m'han ajudat sempre en tot: Moltes gràcies al Cristian, el Fathy i l'Ashraf.

Merci beaucoup a tous les copains des laboratoires du CIRAD et IRD pour leur hospitalité et pour leur accueil, précisément à Martine Bangratz pour son aide toujours accompagnée d'un grand sourire. Merci beaucoup également à

AGRAÏMENTS

Christelle Siré copine de laboratoire à Montpellier et maintenant à Barcelone, pour ton aide à l'IRD et au CSIC, je te souhaite le mieux pour ton postdoc. Je remercie aussi JC Breitler pour son aide et ses conseils distillés avec son humour particulier, et Hoa Le Quang, le grand supporter du Barça au Vietnam. Merci à Jean-Paul, Myriam, Nazaire (pour les manips avec le virus et les déjeuners ensemble..) et John. Merci beaucoup à toutes les autres personnes du Biotrop-CIRAD et de l'équipe riz-IRD que je n'ai pu citer.

Y no, no me olvido de la persona más importante de mi estancia en Montpellier, para mí y para la realización de esta tesis: Donaldo Meynard. Don, tu enorme ayuda, apoyo y todos tus sabios consejos (siempre basados en tu gran experiencia) han sido fundamentales para mí. Gracias por lograr en el momento más crítico de esta tesis algo que parecía imposible, realizar los bioensayos. Gracias por todas tus enseñanzas, por tu alegría contagiosa en el trabajo y por tu amistad.

Gracias también a todos los amigos de Montpellier, especialmente al "comando Chilos", por su ayuda altruista con las expediciones a la Camarga. Gracias a Donaldo (una vez más...), Gastón (el coronel), Hoa, Juan Carlos (Dr. 8ª), Amadeo y a Mr. Pratab (Thanks!).

I que dir dels meus companys del Lab. Rosa... Mil gràcies a tots per la vostra ajuda tant al lab com a fora, tant en els experiments com en les revisions de la tesi, i per sobre de tot per estar sempre units i haver superat junts els mals moments, demostrant que més que companys, som un grup d'amics. Als que ja no hi són: Gràcies a la Marta, per haver compartit dos anys al lab, i per regalar-me per sobre de tot una amistat amb majúscules. Gràcies per tots els moments viscuts i per tota l'ajuda, abans al lab i ara fora (i al Javi!). A la Laura Vila, per ser la meva "mamà-pato" en els primers passos al lab, pel seu recolzament i ajut aquests anys i per les seves aportacions tant valuoses. Espero haver seguit el teu bon exemple. Gràcies!. A la Cristina Bortoloti (Noli), per la seva manera de ser, sempre amb tranquil·litat i bon humor. Te echamos de menos!. Al Jorge, per tota la seva ajuda, especialment amb els assaigs amb fongs, i sobretot per totes les rialles compartides (que han estat moltes!) i per la seva alegria. A l'Eudald ("el germanet petit"), per ajudar sempre al teu germà gran! Sort a la teva nova etapa a l'IRTA!

Gràcies a la Sonia (la meva "germaneta"), per tota la teva ajuda i per ser la meva "postdoc" preferida, per ensenyar-me i respondre'm sempre amb aquell somriure contagiós. Gràcies per aquestes coses i sobretot per la teva amistat. Et desitjo el millor en el futur...i "por cierto, cuanto cargabas de sonda?". A la Bia (la "mamà-Chin"), gracias por todos los grandes momentos compartidos en el rosa y ese fantástico mes en Brasil. Gracias por toda tu ayuda y cuidar de mi como una buena madre, y sobre todo ser una buena amiga. A la Silvia, per ser una persona tant especial i per dir moltes vegades allò que els demés no ens atrevim. Gràcies per tota la teva ajuda aquests anys i no canviïs! A la Bea (la nostra "descendència"), por tu carácter, tu ayuda en todo momento, tu bondad y la dulzura con la que tratas a todo el mundo. Gracias por tu amistad y toda la fuerza del mundo en todo, tu vales mucho! A la Lidi, por toda tu ayuda y los buenos momentos compartidos, suerte en todo! Al Emmanuel (Manu), por los grandes momentos vividos tanto en el lab como en la "catedral" (con los triunfos blaugranas) y por toda tu ayuda en esta recta final! Fuerza y ánimo en el futuro, força! A la Maria, per ensenyar-me a moure'm pel lab al principi i per la seva ajuda. A la Laura M, tota la sort en el teu futur "rosa"!

Vull agrair molt especialment a tots els amics que tant m'han recolzat aquests anys i sempre, per estar amb mi en els pitjors moments i fer-me costat sempre. Gràcies al Jordi (En, gràcies especialment per ajudar-me a Montpeller quan més ho necessitava i per ser un bon amic!), a l'Héctor (per la teva amistat incondicional i en majúscules!) i l'Alba, i finalment l'Aitor (gràcies To, per la teva ajuda a distància i la teva amistat!).

A la meva família que, sense entendre a vegades el com ni el perquè, m'ha escoltat i recolzat en tot moment, gràcies pel vostre suport incondicional.

I finalment vull agrair a la persona més important i "co-autora" en tots els sentits d'aquesta tesi, la Laura. Gràcies per tota l'ajuda infinita i, pel teu recolzament absolut i per ajudar-me a no baixar mai els braços. Només puc dir, i ho dic molt seriosament, que sense tu aquesta tesi no hagués estat possible. Sens dubte has estat el millor regal d'aquests anys al CSIC. T'estimo.

Moltes gràcies a tots!