

INTRODUCCIÓ

1. L'agricultura: la millora de les espècies vegetals

Les plantes són la base de l'alimentació humana. Des de les primeres societats d'homínids que començaren a recollir les llavors de plantes per alimentar-se, s'evolucionà, fa aproximadament 10.000 anys, cap a la domesticació de determinades espècies vegetals. Sorgiren civilitzacions que seleccionaren llavors de diverses plantes i que les conrearen: aparegué l'agricultura.

Des de la prehistòria, els humans han anat aprofitant, cultivant, domesticant i, més endavant, millorant les llavors i plantes per a la seva alimentació i l'alimentació dels animals domesticats (veure *Figura 1*). Les civilitzacions maia i asteca conrearen el teosinte, ancessor del blat de moro actual; als oasis de Jericò, la domesticació del blat, va sorgir a partir d'una sèrie de modificacions que varen patir diferents pastures silvestres, i que donaren llavors més plenes i amb menys capacitat de dispersió, les quals l'home ja pogué cultivar i més endavant millorar. En el tercer mil·lenni abans de l'era cristiana, l'arròs ja es cultivava a la Xina i a l'Índia. Les tres espècies vegetals que han jugat el paper més important fins als nostres dies en l'alimentació de l'espècie humana s'inclouen dins la família de les gramínies i són el blat, el blat de moro i l'arròs (Moreno, 1996).

L'agricultura que es desenvolupà des de la prehistòria fins a l'època feudal fou una agricultura de subsistència, es conreava el necessari per a l'abastiment del grup o família; s'empraven eines de ferro, s'aprofitaven els fems per a fertilitzar la terra i els camps s'irrigaven en algunes zones de la Xina i Egipte.

És en l'època feudal quant les zones cultivades comencen a augmentar; a Europa es comença a utilitzar la rotació de cultius i el guaret, i a Egipte s'utilitza més terreny amb irrigació. La producció a nivell mundial arriba a augmentar un 50%.

A partir del 1600 apareixen molts avanços tècnics que afavoreixen la productivitat: l'arada de fusta es modifica afegint peces de ferro i posteriorment d'acer, apareixen les segadores, es substitueix la força dels cavalls per la del vapor... Però l'agricultura continuà amb grans limitacions per a l'abastiment de la població a nivell mundial. L'agricultura tradicional encara utilitzava varietats poc productives, amb escassa resposta als fertilitzants, es cultivava amb poca irrigació dels cultius, molts anys es perdien collites senceres...

Fou al 1960, quant un grup d'investigadors, encapçalats per Norman Borlaug, varen començar a treballar per aconseguir millorar la productivitat de diversos cultius (principalment el blat, l'arròs i el blat de moro) bàsics en l'alimentació dels països subdesenvolupats, països que en aquells moments patien grans epidèmies de fam, mentre que les previsions de creixement demogràfic de la població mundial seguien augmentant.

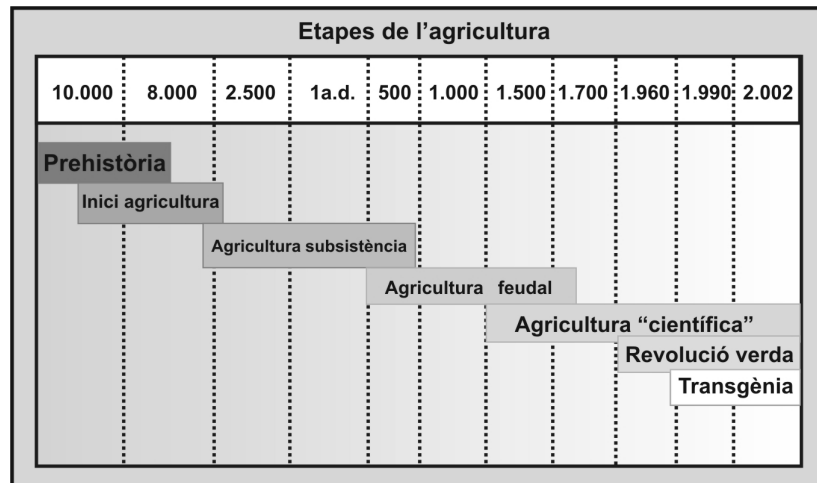


Figura 1: Etapes de l'agricultura (adaptat de Parks, 1998).

L'equip multidisciplinar d'investigadors i agricultors, aconseguí l'augment de la producció agrícola, no pas incrementant l'àrea de les zones cultivades sinó augmentant el rendiment per hectàrea cultivada. Això s'assolí utilitzant varietats de cultiu d'alt rendiment (anomenades VAR), aconseguides mitjançant creuaments successius entre varietats, i en combinació amb noves pràctiques de cultiu com ara l'ús de grans quantitats de fertilitzants, pesticides i maquinària agrícola.

Així, la utilització d'aquestes noves varietats i la implantació d'aquestes noves pràctiques en agricultura, produïren uns efectes espectaculars en l'agricultura mundial. La producció d'aliment a nivell mundial, entre 1960 i 1990, s'incrementà més del 1000%; així mateix, la fam disminuí un 20% entre aquestes dades. Cal pensar que països que en aquells moments patien grans fams, com per exemple l'Índia, passaren a produir suficient cereal per a poder mantenir la seva població, i Indonèsia, que havia d'importar grans quantitats d'arròs, es convertí en un país exportador. Aquest gran èxit a nivell de l'agricultura mundial, conduí a la concessió del premi Nobel de la pau a Norman Borlaug, l'any 1970, per la que des d'aleshores s'anomenà la Revolució Verda (Borlaug, 1970).

Malgrat l'innegable valor que aquesta Revolució Verda tingué a nivell de producció agrícola, cal esmentar limitacions que sorgiren per als petits agricultors i els efectes negatius que se'n derivaren. No tots els agricultors tenien accés a les noves varietats VAR, a més a més, els elevats costos en pesticides, fertilitzants químics i maquinària agrícola no eren fàcilment assumibles per als petits agricultors. Els problemes a nivell ambiental derivats d'aquestes pràctiques es centraren principalment en l'esgotament d'aqüífers degut al rec intensiu, l'erosió del sòl i, sobretot, el fort impacte ambiental de l'ús desmesurat de grans quantitats de pesticides per al control de les plagues d'insectes i patògens.

Durant el segle XX, noves tècniques i mètodes de creuament i cultiu de plantes, que s'engloben dins l'anomenat creuament clàssic, s'han anat desenvolupant i refinant: la hibridació sexual amb l'ajut del cultiu *in vitro* d'òvuls i embrions, l'haplodització, la

poliploidització... Aquestes tècniques malgrat ser marcadament reeixides són, en molts sentits, imprecises (Dale, 1999).

En les dues darreres dècades, han aparegut noves tècniques que han aportat canvis radicals en molts terrenys de la biologia vegetal, i un d'ells ha estat en el terreny de la millora de les plantes d'interès agroeconòmic. Les dues tècniques que marcaren un abans i un després en la millora de plantes d'interès agroeconòmic foren les tècniques de transformació (mitjançant *Agrobacterium* i el bombardeig de microprojectils o biolística) i el cultiu *in vitro* i regeneració d'espècies vegetals.

2. L'arròs i el seu cultiu en les zones mediterrànies

L'arròs es situa, darrera el blat i el blat de moro, com el tercer cereal més cultivat al món. Actualment, la superfície destinada al cultiu de l'arròs a nivell mundial es mou al voltant dels 150 milions d'hectàrees, repartides en un gran ventall d'àrees de característiques climàtiques i geogràfiques molt diferents: des dels arrossars cultivats a més altitud al Nepal; passant pels de més importància a nivell de producció (i nutricional per a la seva població) a Xina, Índia i Tailàndia; als arrossars europeus, localitzats a la conca mediterrània; fins als arrossars més productius a Austràlia (*Riceweb*, 2002).

L'any 2001, la producció d'arròs *paddy* (gra no decorticat) fou de 593 milions de tones a nivell mundial, el 91% de les quals fou produït a Àsia. A Europa, la producció d'arròs fou d'aproximadament 3,2 milions de tones (FAOSTAT, 2002).

A Europa, l'arròs es cultiva en unes 362.000 hectàrees de les zones mediterrànies del sud del continent; essent Itàlia, Espanya, França, Portugal i Grècia, respectivament, els principals països productors. La producció d'arròs a Espanya representa un 25% de l'arròs produït a la Unió Europea. Cal destacar que el 83% de la producció europea correspon als tipus d'arròs de gra rodó o mitjà, en contraposició a la producció a nivell mundial que correspon, majoritàriament, al tipus d'arròs de gra llarg (Faure & Mazaud, 1995).

L'arròs és una planta monocotiledònia de la família de les poàcies, que pertany al gènere botànic *Oryza*; aquest gènere inclou 23 espècies però només dues, *Oryza glaberrima* i *Oryza sativa*, són cultivades. Mentre que l'espècie *O. glaberrima* només és cultivada a la zona subsahariana i es veu en constant regressió, l'espècie *O. sativa* és l'espècie més cultivada al món. Totes les espècies d'*Oryza* són diploïdes amb $2n=24$; les espècies que es cultiven són autògames i anuals, mentre que entre les espècies salvatges podem trobar tant espècies autògames com al·lògames, així com anuals o perennes (Arraudeau *et al.*, 1998).

Oryza sativa s'ha dividit en tres subespècies segons observacions fenotípiques, serològiques i de barreres reproductives: *japonica*, *indica* i *javanica* (Kato *et al.*, 1928; Oka, 1958). El tipus *japonica* es caracteritza per tenir un gra més arrodonit i dur, de difícil ruptura

o esbocinament. A Europa, el tipus *japonica* és el més cultivat; a aquest tipus d'arròs pertanyen les varietats Sènia i Ariete, que són les varietats més cultivades a Espanya-Grècia (Sènia) i Itàlia-França (Ariete). A Catalunya es cultiven, a més a més de la varietat Sènia, les varietats Tebre, Bahia, Bomba (cada vegada més apreciat en el sector de la restauració) i Sequial. A Itàlia, es cultiven també les varietats Selenio, Sta. Andrea i Maratelli. En aquest estudi hem utilitzat les varietats Sènia i Ariete per a la producció d'arròs transgènic; així com també la varietat Taipei 309 (també del tipus *japonica*), considerada com a una varietat model per a la transformació genètica des dels anys 80 (Abdullah *et al.*, 1986).

Originàriament l'arròs fou cultivat en planes al·luvials i deltes de rius, o en zones d'aigües estancades o amb corrent, tots ells entorns creats de forma natural. Encara avui, un 32% de la producció mundial d'arròs, es segueix cultivant d'aquesta manera, al Sud i Sud-est d'Àsia. A través dels segles, els arrossers han anat desenvolupant diferents sistemes per poder cultivar l'arròs en zones on les condicions ambientals i geogràfiques no són les òptimes; així s'ha imposat la construcció de marjals, camps delimitats per bancals de terra que s'inunden. Actualment, més de la meitat dels camps d'arròs del món compten amb irrigació artificial; a Espanya pràcticament tot l'arròs es cultiva amb aquest mètode.

Per altra banda, l'ús massiu de herbicides, adobs inorgànics i pesticides químics que s'utilitzen per a combatre les malalties i plagues en l'arròs, condueix a la pol·lució del medi ambient i, degut a la seva persistència, a l'acumulació de residus, que poden passar a la cadena alimentària afectant diferents organismes vius i arribant, també, als consumidors. Així mateix, és de gran preocupació l'acumulació de les aigües residuals provinents dels arrossars (amb gran quantitats de pesticides i nitrats) ja que provoquen eutrofització dels ecosistemes aquàtics (Fores *et al.*, 2001).

Una de les característiques del cultiu de l'arròs a Europa és que la majoria dels arrossars estan situats en la proximitat de zones protegides o parcs naturals d'interès ecològic: al Delta de L'Ebre (veure *Figura 2*), a l'Albufera de València i les planes del Guadalquivir a Espanya, al Delta del riu Po a Itàlia i a la Camargue a França. Aquest fet comporta l'ús de tècniques i pràctiques agrícoles diferents de les que s'utilitzen habitualment en altres zones arrosseres. Actualment, existeixen legislacions adequades a les zones protegides d'Europa on es cultiva l'arròs, per tal d'evitar la contaminació dels ecosistemes limítrofs. Tot i això, hi ha alguns productes químics que són permesos en uns països i prohibits en d'altres, així mateix, les dosis permeses varien considerablement d'un país a un altre.

A Catalunya s'apliquen, des de 1998, els mètodes de producció agrària compatibles amb la protecció medi ambiental de zones humides incloses en el llistat de la convenció de RAMSAR (directrius resultants de la Convenció sobre les zones humides de 1971 a Ramsar, Iran (RAMSAR, 2002)). Així es prioritza la substitució i reducció de tractaments químics en la lluita contra plagues, amb la finalitat de protegir les aus i les espècies aquàtiques.

Principalment es substitueixen per tractaments biològics, mitjançant l'ús de feromones (confusió sexual), en la lluita contra el lepidòpter *Chilo suppressalis* (Barrinador de l'arròs) o bé utilització de tractaments químics amb ús de productes d'índex toxicològic A. També s'afavoreix el control mecànic de males herbes, especialment amb la tècnica del fangueig mecànic, mitjançant inundacions prematures, per evitar l'ús de herbicides (DARP, 2003).



Figura 2: Arrossars del Delta de l'Ebre (fotografies: M.M. Català (IRTA-Estació Experimental Delta de l'Ebre, Amposta)).

Així mateix, una altra important problema al que es veuen confrontats els productors d'arròs és l'arròs salvatge. L'arròs salvatge és una mala herba que envaeix ràpidament els conreus d'arròs i, que els obliga a una acurada preparació del camp abans de sembrar. L'arròs salvatge suposa una gran despesa pels agricultors en herbicides (DARP, 2003).

Les principals causes de la pèrdua de les collites d'arròs a Europa, són la plaga del insecte lepidòpter *Chilo suppressalis*, conegut com el Barrinador de l'arròs, i la piriculariosi o crema, malaltia produïda pel fong fitopatogen *Magnaporthe grisea*.

2.1 *Chilo suppressalis*, plaga de l'arròs

Chilo suppressalis (Walker) és una de les espècies de barrinadors més esteses a tot el món (des de l'Índia fins a Europa, la Xina, Sibèria, Hawaii...) i causa grans pèrdues en les collites d'arròs. 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).

C. suppressalis (Walker) és un lepidòpter de la família *Pyralidae*, *Crambinae*, de 20-28 mm d'envergadura (les femelles són més grosses que els mascles), amb les ales anteriors de color ocre (més fosc en els mascles) i les posteriors blanques. Els ous són el·líptics i

aplanats, de color groc, d'uns 0,8-0,9 mm de longitud per 0,5-0,6 mm d'amplada. Són dipositats en agrupacions planes de fins 200 ous. Les larves són de color ocre clar amb cinc bandes longitudinals fosques. Al final del seu desenvolupament poden mesurar fins a 26 mm. La crisàlide és de color bru rogenc. A la *Figura 3* es mostren fotografies dels diferents estadis de *Chilo suppressalis*.

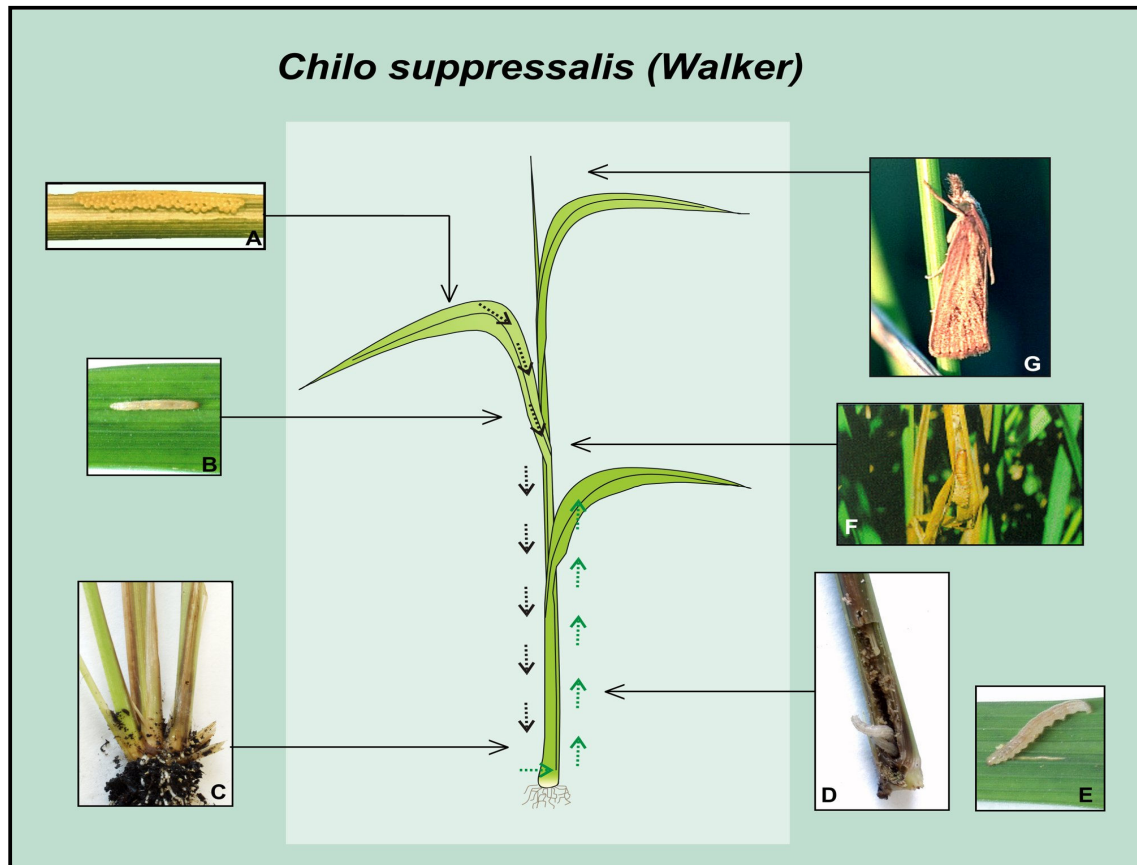


Figura 3: Cicle biològic de *Chilo suppressalis* (Walker). A, ooteca; B, larva en estadi L2; C, part inferior de la tija d'arròs per on penetra la larva; D, larves alimentant-se des de l'interior de la tija; E, larva en estadi L4; F, nimfa; G, individu adult. Les fletxes discontinuades indiquen el trajecte que efectua *Chilo* per la planta al llarg del seu cicle vital: *en negre*, trajecte entre les beines de les fulles i tija; *en verd*, trajecte que efectua per l'interior de les tiges. *Fotografies:* A, IRRI; F i G, DARP 2003.

Els adults, d'hàbits crepusculars i nocturns, ponen els ous a les fulles; les larves neixen a l'exterior i als dos dies perforen les beines i/o la tija; solen descendre entre les beines i perforar la tija a nivell de la base, tot just per sobre de les arrels, i després ocupen les parts internes de la planta. Tot el desenvolupament larvari i la crisalidació es dona a l'interior de la planta. D'aquí la dificultat de la lluita mitjançant els pesticides clàssics, ja que no poden arribar a on es desenvolupa la larva. Els adults viuen entre 3 i 6 dies, les postes en necessiten 6 per eclosionar, i les crisàlides donen lloc als adults en 8-10 dies.

A Catalunya, concretament als arrossars del Delta de l'Ebre, *C. suppressalis* completa fins a 3 generacions al llarg de l'any. Passa l'hivern en estat larvari, les larves es troben majoritàriament en plantes de senill (*Phragmites sp.*) i en rostoll d'arròs mentre n'hi ha. A partir de mitjans d'abril, i fins a mig juny aquestes larves crisaliden i donen lloc als primers adults de la temporada. Part d'aquests ponen els ous en plantes d'arròs, amb la qual cosa s'origina la primera generació. Les larves de 1a generació (L1) passen per 6 estadis abans de crisalidar (L2 a L7) i completen el seu desenvolupament en uns 48 dies de mitjana; així, a partir de primers de juliol emergeixen els adults que donaran lloc a la 2a generació; aquests passen per 5 estadis i presenten un desenvolupament força 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. A finals d'agost ja hi ha larves de 3a generació a les plantes d'arròs, les quals, juntament amb les més tardanes de la 2a generació, són les que hivernen i no completaran el seu desenvolupament fins a la primavera següent (DARP, 2003).

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 què es trobi la planta d'arròs en el moment de l'atac. La *Figura 4* mostra alguns dels símptomes de l'atac de larves de *Chilo* en plantes d'arròs.

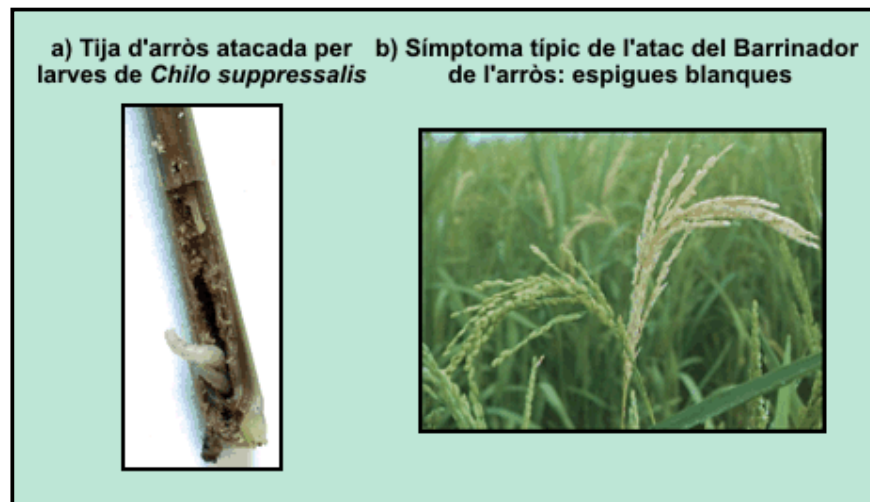


Figura 4: Síntomes de l'atac de *Chilo suppressalis* (Barrinador de l'arròs) en plantes d'arròs. a) base d'una tija d'arròs infestada per *C. suppressalis*. b) aspecte típic de plantes d'arròs atacades en estadi de floració per larves de Barrinador: espigues blanques (IRRI, 2003).

Així, si la planta es troba en estat vegetatiu, el símptoma més clar és l'aparició de la fulla 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 1a 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 2a 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 vinclat pel pes dels grans ben desenvolupats. Aquest símptoma és característic de l'atac de *Chilo suppressalis*, i és el dany que pot provocar més pèrdues en les collites d'arròs.

Si l'atac es produeix en l'estadi de maduració (sol ser provocat per les larves de la 2a i 3a generació), les pèrdues es deuen a què el debilitament de la tija afavoreix el seu tractament i la caiguda de les espigues a l'aigua. Si les espigues ja han madurat, la producció es veu poc afectada (DARP, 2003).

Al Delta de l'Ebre s'està utilitzant, des de fa 5 anys, la lluita biològica com alternativa a l'ús massiu de pesticides. En les explotacions es situen les trampes que contindran les substàncies dissuasives contra el lepidòpter *Chilo suppressalis*. 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 l'insecte mascle; aquest atret per l'olor caurà a dins la trampa. Així doncs, s'evita la fecundació de la femella i, per tant, l'aparició de les larves del barrinador.

2.2 *Magnaporthe ssp*, el patogen dels arrossars

Existeixen més de cent gèneres diferents de fongs fitopatògens que poden infectar *Oryza sativa* (L.): *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*... (Duke, 1983); però les pèrdues més grans de collites d'arròs a nivell mundial són les provocades pels fongs *Magnaporthe grisea* (anamorf, *Pyricularia oryzae*) i *Magnaporthe salvinii* (anamorf, *Sclerotium oryzae*).

Magnaporthe grisea, provoca la piriculariosi o cremat, que es considera la malaltia fúngica més important de l'arròs cultivat, degut a la seva àmplia distribució (ha estat descrita en més de 85 països) i al seu poder destructiu sota condicions favorables. La piriculariosi està considerada com una malaltia criptogàmica complexa degut a la variabilitat patogènica i a la rapidesa amb la que aquest fong venç la resistència de la planta d'arròs (Sun & Snyder, 1981; Ou, 1985). Així mateix, *Magnaporthe grisea* pot infectar més de 50 tipus diferents de plantes herbàcies, on s'inclouen cereals com el blat, l'ordi...

M. grisea és un ascomicet filamentós haploide; el fong és heterotàl·lic amb l'aparellament controlat per un locus alternatiu (Mat-1 i Mat-2); l'aparellament es dona entre individus que presentin els tipus oposats d'aparellament. Presenta conidiòfors on es generen cèl·lules conidiògenes que hi creixen simpodialment; aquestes donaran lloc a conidis holoblàstics. Aquests conidis madurs són piriformes, normalment biseptats i amb un petit apèndix en el punt d'ancoratge amb el conidiòfor. En la *Figura 5* es mostren microfotografies corresponents a *Magnaporthe grisea*.



Figura 5: Microfotografies de *Magnaporthe grisea*. A, hifes; B, espores piriformes i biseptades de *M. grisea*.

Per a la infecció, aquestes espores asexuals formen una estructura altament especialitzada per a la penetració de teixits vegetals: l'*apressorium*. Primerament, l'espóra, forma un tub germinatiu que emergeix de la zona apical o basal (mai central); aquest s'allongarà i formarà en el seu extrem una estructura inflada, anomenada *apressorium*. Aquesta cèl·lula especialitzada per a la infecció, és la que permet al fong penetrar, travessant la cutícula, en la planta. Una vegada dins, les hifes es ramificaran a través de les cèl·lules epidèrmiques i del mesòfil. Després d'aproximadament set dies, els conidiòfors es diferenciaran i centenars de nous conidis serà produïts per a perpetuar el cicle (Talbot, 1995; Howard & Valent, 1996).

El fong produeix taques o lesions de forma allargada a les fulles, primerament de color blanquinós i després de color groguenc uniforme; un cop més avançada la infecció, les lesions presenten els centres més clars, grisosos, i les vores marrons. Si la infecció avança pot conduir a l'assecament total de les fulles infectades. En la *Figura 6* es mostra el desenvolupament de les lesions (A) i els símptomes de la infecció en planta d'arròs causats per *Magnaporthe grisea* en arròs (B i C).

M. grisea també pot produir danys en els nusos i en les diferents parts de la panícula i les llavors. En el nus superior o a zones properes, es produeixen decoloracions amb àrees necròtiques de color marró. En la panícula es poden produir lesions fosques, que poden contribuir al vinclament d'aquesta; les llavors solen acabar buides i grises, o no reomplir-se completament. El tamany i forma de les lesions depèn de factors com les condicions ambientals, l'edat de la planta, el grau de susceptibilitat de la varietat cultivada i de l'aport de nitrogen (*RiceBlastDB*, 2001; *APSnet*, 2002).

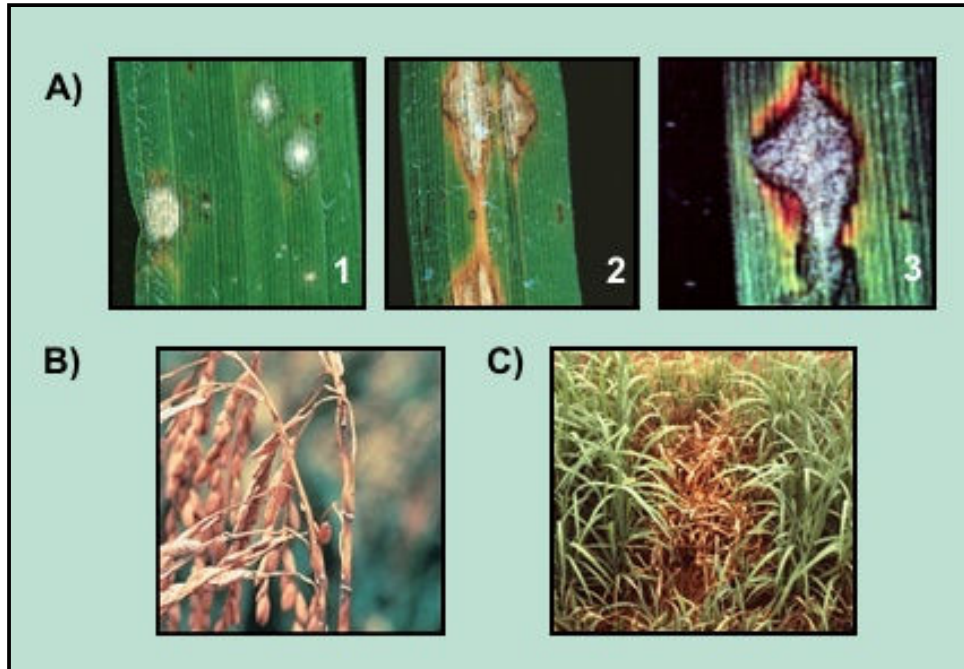


Figura 6: Lesions i símptomes característics de plantes d'arròs infectades per *Magnaporthe grisea*. A) Lesions foliars degudes a la piriculariosi: 1, lesions en fases primerenques de la infecció; 2, lesions madures amb marges necròtics; 3, aparició de l'esperulació. B) Panícula d'arròs amb el vinclament propi de la infecció per *Magnaporthe grisea*. C) Aspecte de plantes d'arròs afectades per la piriculariosi. (EURICE, 2001; APSnet, 2002; Ohio State University, 2002).

Magnaporthe salvinii causa el podrint de la tija, una altra important malaltia dels arrossars. El fong forma esclerocis en les tiges senescents; aquests esclerocis romandran al camp fins a la temporada següent, quant germinaran en contacte amb les plantes joves (estadi de 3 a 5 fulles). Al germinar l'escleroci, el fong penetrarà en la beina de la planta d'arròs, produint una petita lesió. A continuació es produeix un període de latència que dura unes setmanes; el fong estarà en la beina en una fase biotròfica. Al final de l'època de formació de les panícules, poden aparèixer les lesions necròtiques (de 4 a 12 cm de llarg), però generalment el fong romandrà a les beines externes de cada tija. És molt comú veure un 50-80% de les tiges afectades. El fong envairà la tija al final de l'època de maduració de les panícules (Notteghem *et al.*, 1995).

3. Plantes ornamentals: el gerani

Des d'una perspectiva econòmica, el sector de la planta ornamental representa en l'actualitat una part important de la producció agrària a nivell estatal. La millora de les plantes ornamentals s'ha centrat sobretot en l'obtenció de noves varietats fenotípiques

(variació del color de la flor o el port per exemple), ja que a l'hora d'obtenir plantes ornamentals resistents a plagues existeix la limitació del material silvestre disponible. Amb els canvis en la legislació respecte a l'ús de productes fitosanitaris, especialment dins l'àmbit europeu, i com a conseqüència de la major conscienciació medi ambiental, existeix dins del sector un creixent interès en l'obtenció de varietat resistents a malalties. La biotecnologia vegetal permet la possibilitat de utilitzar nous gens de resistència.

El gerani (*Pelargonium zonale*) és una planta ornamental que es cultiva com a planta de temporada o com a planta vivaç, si la climatologia és més suau com a les zones mediterrànies i del Sud. És una planta originària de l'Àfrica del sud. La seva coloració, clara i brillant, i la seva abundant floració fan d'ella una de les plantes ornamentals més sol·licitades. Es produeixen a partir de llavor les varietats de flor senzilla i a partir d'esqueix les varietats de flor doble, en hivernacles, i es venen com a planta de test. És una espècie tetraploide ($2n=4X=36$) de la família de les *Geraniaceae*.

Els geranis, si bé no requereixen unes condicions ambientals gaire especials, estan essent afectats en l'actualitat per una plaga causada pel barrinador *Cacyreus marshalli*. Aquesta plaga causa grans estralls en aquestes plantes; actualment l'únic mitjà de lluita són els insecticides autoritzats.

3.1 *Cacyreus marshalli*, la plaga del gerani

Cacyreus marshalli s'ha convertit en poc més de deu anys, en la pitjor plaga que ha sofert el sector del cultiu del gerani. *Cacyreus marshalli*, fou introduïda des de l'Àfrica sudoriental via Menorca, probablement dins d'esqueixos de gerani. Es té la primera constància de la seva existència l'any 1978, a Anglaterra; tanmateix, com que aquesta espècie no pot viure en climes fred (per exemple, el del nord d'Europa), la seva àrea de colonització i expansió ha estat la zona mediterrània. La progressió d'aquesta plaga a Europa a estat d'una rapidesa espectacular: l'any 1990 es descriu la seva presència a Menorca i ràpidament s'estén per totes les Illes Balears, l'any 1991 es detecta a Brussel·les; l'any 1992 se'n té la primera constància a la península Ibèrica (Castelló) i ja se'n descriuen per diferents punts de la península (Sarto, 1992). Actualment és una plaga que s'estén per tota la zona mediterrània.

Cacyreus marshalli, conegut com el Barrinador del gerani, és un lepidòpter de la família dels licènids (*Lycaenidae*). El color de les seves ales, per la cara superior, és marró, amb un fimbregat blanc als marges; la cara inferior presenta un mosaic marró i blanc. A més, les ales posteriors presenten una petita cua molt característica. L'amplada alar oscil·la entre 18 i 27 mm. En la *Figura 7* es mostren fotografies de diferents estadis de *C. marshalli*.

Els ous que pon *C. marshalli* són blancs, de forma circular i aplanada, de 0,6 mm de diàmetre; es troben majoritàriament sobre sèpals de capolls florals i sobre bràctees de les inflorescències joves del gerani. Les erugues, que presenten quatre estadis larvaris, són blanquinoses en el primer, amb una lleugera tonalitat verdosa i tres franges longitudinals rosades. Presenten pèls de color blanc que cobreixen tot el seu cos llevat de la zona ventral. A mesura que van mudant, el seu color es va fent més verdós i les franges longitudinals rosades més aparents. Les crisàlides, també amb pèls, són de color verd clar o verd fosc, que es transforma en marró un o dos dies abans de l'eclosió de la papallona (DARP, 2003).

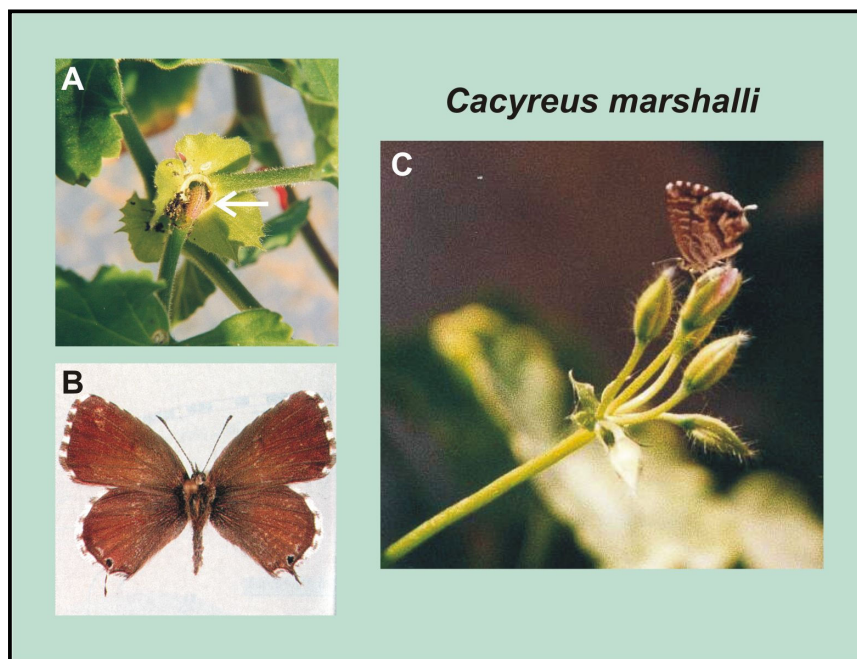


Figura 7: *Cacyreus marshalli*, la plaga del gerani. **A**, Eruga de *C. marshalli*; **B**, adult – papallona; **C**, Adult sobre una planta de gerani (fotografies cedides per Dr. J. Ferré, Universitat de València).

Cacyreus s'alimenta exclusivament de plantes geraniàcies dels gèneres *Pelargonium* i *Geranium*, a les que està perfectament adaptada, essent les varietats *zonale* i *peltatum* (el gerani de mata corrent i el de mata enfiladissa) les més afectades, amb diferència, per la plaga.

La papallona efectua la posta sobre la part aèria del gerani, majoritàriament sobre els capolls florals. L'eruga nounada s'introdueix immediatament dins el capoll del gerani, foradant el sèpal per accedir-hi; allà s'alimenta dels teixits i el va buidant. En iniciar-se el 2n estadi larvari, l'eruga pot romandre encara dins al capoll floral, o migrar a un altre capoll o a l'interior del pedicel de la flor o del peduncle de la inflorescència.

En els estadis 3r i 4t si els capolls florals són abundants se'ls menjaran des de fora; si aquests no abunden, aleshores les erugues s'introduiran en les tiges del gerani, per les

seves parts més tendres, els brots terminals, l'eruga anirà barrinant la tija en sentit descendent, buidant-la i omplint d'excrements la galeria que resulta de la seva activitat. Les galeries repletes d'excrements i amb forats d'entrada, són ràpidament colonitzades per fongs que contribueixen al deteriorament general de la planta. L'eruga crisalida, en la majoria dels casos, a la part exterior del mateix gerani. La transformació en papallona succeirà en temps diversos, segons la temperatura.

A Catalunya, tenen 5 o 6 generacions a l'any; la 1^a apareix a mitjans de març i la última a finals d'octubre, veient-se volar les papallones fins mitjans de novembre.; l'hivern el passarà en forma d'eruga (DARP, 2003).

A l'Àfrica sudoriental, d'on és originària l'espècie i d'on no es té constància que constitueixi plaga, existeixen enemics naturals que controlen eficaçment les seves poblacions. Malauradament, no ha estat detectat encara cap depredador ni paràsit autòcton a la regió íbero-balear que pogués controlar de forma efectiva les seves poblacions. Aquest fet explica també la ràpida propagació de la plaga per la zona mediterrània.

En la lluita química contra aquesta plaga s'ha de tenir en compte l'elevat nombre de generacions i el seu caràcter majoritàriament minador, la qual cosa fa que sigui necessari combatre-la periòdicament amb insecticides des de la primavera i fins a l'inici de tardor. La lluita mecànica, possible en petites superfícies, consisteix en tallar i cremar (o congelar i després llençar) les inflorescències i tiges afectades per la plaga. a lluita biològica és una via que s'està actualment investigant, així com la recerca de varietats resistents. La gran singularitat biològica d'aquesta espècie és que, havent sigut introduïda, a més a més viu sobre una espècie vegetal també introduïda, el que fa especialment difícil el reclutament de parasitoides generalistes. La investigació en lluita biològica contra aquesta plaga es basa actualment en l'himenòpter *Trichogramma evanescens*. Aquest himenòpter parasita el barrinador del gerani, inoculant la seva posta dins l'ou de *Cacyreus*, on creixerà la larva de *Trichogramma*.

Igual que en el cas de moltes altres plagues de lepidòpters, gràcies al desenvolupament de les tècniques de transformació, la millora de la resistència front insectes mitjançant transgènia es podria aplicar en la lluita contra *Cacyreus marshalli*. La introducció en plantes de gerani de gens de característiques insecticides, com per exemple la toxina Bt o d'inhibidors de proteases, es presenta com a una interessant alternativa a la lluita química.

4. Els mecanismes naturals de defensa de plantes

Les plantes, degut a la seva immobilitat i a la constant interacció amb el medi que les envolta, han de fer front a gran varietat de canvis ambientals i enfrontar-se a l'atac d'altres organismes (insectes, nemàtodes, fongs, bacteris, virus i viroides).

Per respondre a aquesta gran varietat d'agressions, les plantes, han desenvolupat complexes sistemes de defensa amb intricades xarxes de transmissió de senyals, que han d'integrar ràpides respostes simultànies (Doares *et al.*, 1995; Genoud & Métraux, 1999). Així mateix, aquests sistemes de defensa han de desencadenar una resposta efectiva front el tipus d'agressió i a la magnitud d'aquesta. Cal destacar que gens concrets que formen part del sistema de defensa, poden participar també en el programa general de desenvolupament de la planta, implicant doncs, una finíssima regulació de l'acumulació de les proteïnes codificades per aquests gens.

4.1 Interaccions planta-patogen

Dins els mecanismes naturals de defensa de plantes, cal destacar les respostes defensives contra l'atac de microorganismes patògens.

L'atac de microorganismes patògens causa a la planta un deteriorament que fa minvar la seva capacitat de supervivència i, en molts casos, la seva eficàcia reproductora. Però en realitat, a la natura, la malaltia és una excepció ens les interaccions planta-microorganisme, la regla general és la resistència. Això és degut a l'existència d'uns mecanismes de defensa molt actius en la planta (a part de les barreres passives aèries i subterrànies que suposen les seves estructures) que es basen, principalment, en l'activació transcripcional d'una sèrie de gens, que codifiquen per proteïnes de defensa. Aquestes respostes es basen en les característiques de la interacció entre la planta i el microorganisme.

Així doncs, en la natura es poden donar diferents tipus d'interacció entre una planta i un microorganisme: que la planta no sigui un hoste natural del microorganisme, i aquest sigui incapaç de reconèixer i infectar la planta (no es presentaran símptomes), o bé que la planta sigui l'hoste natural, pel que s'establirà una interacció inicial. En aquest últim cas, aquesta interacció pot ser de dos tipus: compatible o incompatible. Des de fa quasi cinquanta anys, es sap que, moltes de les interaccions planta-patogen, estan condicionades genèticament, donant-se una relació "gen a gen" entre la planta i el seu patogen (Flor, 1955 i 1959). Aquesta interacció és molt específica i requereix especificitat de cultivar en planta i de raça en el patogen. Aquesta relació "gen a gen" implica una interacció entre els productes gènics de gens de resistència (gens *R*) de la planta, i els corresponents gens d'avirulència (gens *avr*) d'un patogen.

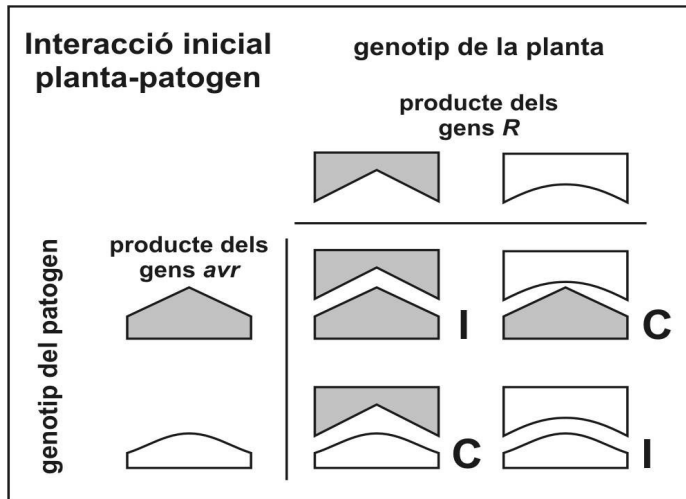
S'han aïllat i identificat més de 20 gens *R* amb reconeixement específic per a gens *avr* concrets. Aquests gens *R* han estat aïllats en diferents espècies de plantes, tant monocotiledònies com dicotiledònies. Aquests gens són efectius contra bacteris, virus i fongs patògens, i en un cas fins i tot a nemàtodes i àfids (gen *Mi* de tomàquet (Vos *et al.*, 1998)). Malgrat que aquests gens *R* actuen en resposta a gran varietat d'organismes i

mecanismes de patogènia, s'han pogut establir que aquests gens codifiquen per proteïnes que presenten certs motius comuns. Els gens *R* coneguts fins a l'actualitat, s'ha classificat en cinc classes: 1) proteïna kinases intracel·lulars; 2) proteïna kinases, tipus receptor de membrana, amb un domini extracel·lular repetit ric en leucines (LRR); 3) proteïnes LRR intracel·lulars amb un lloc d'unió a nucleòtids (NBS) i un motiu de cremallera de leucina (LZ); 4) proteïnes intracel·lulars NBS-LRR amb una regió amb semblança a les proteïnes Toll i receptores de interleuquina-1 (TIR); i 5) les proteïnes LRR que corresponen a proteïnes extracel·lulars unides a membrana (Martin, 1999).

Els gens *avr* han sigut aïllats de gran varietat de patògens on s'inclouen fongs (*Magnaporthe*, *Cladosporium*), bacteris (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*) o virus (virus Y de la patata) (Nimchuk *et al.*, 2001). Contràriament al que s'ha descrit pels gens *R*, en el cas dels gens *avr* no s'han trobat homologies entre les seves seqüències, ni tampoc entre les proteïnes per a les que codifiquen. S'ha descrit que gran nombre de gens *avr* codifiquen per proteïnes elicitores específiques, que indueixen la resposta hipersensible, HR, ja sigui quant són infiltrats en l'espai apoplàstic fora de les cèl·lules vegetals, o quant són expressats dins la cèl·lula. La Resposta Hipersensible (HR, *Hypersensitive Response*) es caracteritza per una ràpida mort cel·lular, molt localitzada en la zona on es dona la infecció. Aquesta resposta de mort cel·lular sembla beneficiar la planta limitant l'accés del patogen a les fonts de nutrients, i limitant-ne la seva proliferació. La diversitat existent de gens *avr* és consistent amb les teories de l'evolució de la resistència "gen a gen", ja que les plantes hoste adquireixen l'habilitat específica de reconèixer molècules diverses produïdes pels patògens (Jia *et al.*, 2001).

L'existència o no dels gens *R* i *avr*, conduirà a que la interacció inicial sigui de tipus compatible o incompatible. En la *Taula 8* es resumeixen les característiques d'aquestes interaccions.

Així doncs, tant si és el patogen que manca del corresponent gen *avr*, com si és la planta que manca del degut gen *R*, la interacció planta-patogen serà de tipus compatible i desembocarà en malaltia. Contràriament, si es dona reconeixement entre el producte dels gens *avr* del patogen (per exemple un elicitor específic), i el producte dels gens *R* de la planta (receptors específics de membrana o proteïnes intracel·lulars), aquesta interacció incompatible desencadenarà la resposta hipersensible (HR) de la planta, una de les respostes més importants i efectives de la planta front l'atac de patògens (Cohn *et al.*, 2001). Així mateix, diferents evidències suggereixen que en la resposta HR, les cèl·lules mortes, alliberen molècules que actuen com a senyals inductores de l'expressió de diversos gens de defensa de la planta hoste (Dangl *et al.*, 1996).



Taula 8: Diagrama de els tipus d'interacció gen a gen que es poden donar entre una planta i un patogen, per als gens d'avr (avirulència) i R (resistència). I, interacció incompatible; C, interacció compatible (De Wit, 1997).

<p>(C) Interacció compatible</p>	<ul style="list-style-type: none"> El patogen estableix una infecció inicial, multiplicant-se i propagant-se per tota la planta. El patogen produirà compostos tòxics o inhibirà els mecanismes de defensa de la planta. 	<p>hoste susceptible <i>versus</i> patogen virulent</p>
<p>(I) Interacció incompatible</p>	<ul style="list-style-type: none"> El patogen invasor és capaç de establir una infecció inicial en la zona de penetració. El patogen serà incapaç de propagar-se per la planta ja que es produeix un reconeixement molecular, que desembocarà en la ràpida i efectiva resposta de defensa (i resposta hipersensible). 	<p>hoste resistent <i>versus</i> patogen avirulent</p>

4.2 Estratègies de defensa de les plantes

Es poden definir dues grans línies d'acció defensiva en plantes: una que inclou les defenses directes (que intenten frenar l'acció del patogen o de l'insecte atacant) i una altra que englobaria les indirectes (per exemple estratègies per a controlar la població d'insectes herbívors) (Baldwin *et al.*, 2001). La *Taula 9* mostra alguns exemples de les proteïnes implicades en la resposta defensiva de les plantes.

Les **defenses directes** són característiques de la planta que, per elles mateixes, poden afectar el rendiment i/o desenvolupament del patogen o plaga. Segons les característiques de les proteïnes que són produïdes per la planta, aquestes respostes van dirigides cap al reforçament de les barreres físiques, i cap a la síntesi i acumulació de proteïnes amb activitat antimicrobiana i/o dissuasiva. En aquest últim grup s'inclourien les proteïnes PR

(*Pathogenesis-Related proteins*), fonamentals per a la resposta defensiva de plantes (veure Apartat 4.3).

Defenses directes		Exemples
▪ Reforçament de barreres físiques	▫ Proteïnes estructurals de paret	HGRPs, GRPs, PRPs...
	▫ Enzims relacionats amb formació i/o modificació dels polímers de paret	peroxidases, CAD...
▪ Síntesi i acumulació de compostos i proteïnes amb activitat antimicrobiana i/o dissuasiva	▫ Proteïnes PR	quitinases, defensines, tionines, inhibidors de proteases...
	▫ RIPs	
	▫ Lectines	
	▫ Enzims per a la síntesi de compostos antimicrobians	fitoalexines...
Defenses indirectes		Exemples
▪ Control de la població d'insectes herbívors	▫ Compostos volàtils orgànics	sesquiterpens...

Taula 9: Tipus de respostes defensives de plantes contra l'atac de microorganismes patògens o insectes. S'indiquen les línies d'acció defensiva i el tipus de proteïnes que s'acumulen. HGRPs, proteïnes riques en hidroxiprolina; GRPs, proteïnes riques en glicina; PRPs, proteïnes riques en prolina; CAD, cinnamyl alcohol deshidrogenasa; RIPs, proteïnes d'inactivació de ribosomes.

Dins del reforçament de les barreres físiques, s'inclou la síntesi de proteïnes que poden modificar les propietats de la matriu extracel·lular, ja siguin proteïnes estructurals de la paret (HGRPs, proteïnes riques en hidroxiprolina; GRPs, proteïnes riques en glicina; PRPs, proteïnes riques en prolina); o bé enzims implicats en la formació i/o modificació dels polímers de paret (enzims implicats en la síntesi de suberina, lignina, callosa i també compostos fenòlics units a membrana; peroxidases, cinnamyl alcohol deshidrogenasa).

Entre les proteïnes de defensa amb activitat antimicrobiana s'hi troben p.ex. les quitinases, β -1,3 glucanases, defensines, tionines o lectines (proteïnes que s'uneixen a la quitina i presenten propietats antifúngiques).

Les RIPs (*ribosome-inactivating proteins*) són ARN N-glicosidases que depurinen l'ARNr 28S, amb la conseqüent detenció de la síntesis de proteïnes degut al dany ocasionat als

ribosomes (Barbieri *et al.*, 1993; Pu *et al.*, 1996; Hwu *et al.*, 2000). Aquestes proteïnes han estat aïllades en gran nombre d'espècies vegetals (Selintrennikoff *et al.*, 2001), així com en el fong *Aspergillus* (α -sarcina, veure més endavant) (Wnendt *et al.*, 1993). Les RIPs de plantes inhibeixen la síntesi de proteïnes tant en mamífers, bacteris i fongs com en plantes, tant *in vitro* com *in vivo*. Certes RIPs inactiven específicament els ribosomes de l'hoste, mentre que altres mostren toxicitat front ribosomes d'espècies allunyades filogeneticament, com animals o fongs. En els casos en què una RIP pot inactivar un ribosoma propi, la proteïna sol ser sintetitzada com a un precursor inactiu, o bé és dirigida fora del citoplasma, normalment a l'espai extracel·lular. S'han postulat dues funcions majoritàries per a les RIPs en relació a les seves toxicitats potencials. Per una banda, les RIPs que inactiven ribosomes propis, podrien actuar com a gens suïcides programats per expressar-se en un moment determinat del desenvolupament o per inducció. Les RIPs que inactiven ribosomes d'espècies allunyades filogeneticament, podrien tenir una funció defensiva, protegint les plantes d'herbívoros o patògens (Jensen *et al.*, 1999). Les RIPs han estat classificades en tres grups: Tipus I amb una sola cadena (serien les implicades en la resposta defensiva de plantes); Tipus II, que presenten dues cadenes; i Tipus III que consten de 4 cadenes organitzades en dos dímers de Tipus II (Selintrennikoff *et al.*, 2001; Peumans *et al.*, 2001).

Les fitoalexines són compostos de baix pes molecular, amb activitat antimicrobiana, que inclou els terpenoides, els alcaloides i els compostos fenòlics. Les fitoalexines, així com els monòmers de lignina i de suberina, són tots ells produïts per la via biosintètica dels fenilpropanoides (Bruxelles & Roberts, 2001).

Les **respostes defensives indirectes** basen la seva acció en el control de la població d'insectes per mitjà de compostos orgànics volàtils. Les plantes alliberen gran quantitat de compostos orgànics volàtils, ja sigui des dels òrgans florals com des de les parts vegetatives; en la última dècada, s'ha descobert que certs tipus de compostos volàtils s'alliberen en resposta a l'atac d'insectes (Pichersky & Gershenzon, 2002). S'ha comprovat que l'alliberament d'aquests compostos no és, en tots els casos, deguda simplement a la ruptura d'estructures secretores preformades, sinó que existeix síntesi *de novo* d'aquests compostos (Gang *et al.*, 2001) (veure *Apartat 5*).

Els elicitors són molècules capaces de desencadenar la resposta defensiva en plantes. Els elicitors poden provenir p.ex. dels fongs o de les secrecions bucals dels insectes; són els denominats elicitors externs. Els elicitors poden ser productes de la degradació de la paret cel·lular d'un patògen per part d'activitats antimicrobianes produïdes per la planta hoste. També poden actuar com elicitors de la resposta de defensa de la planta, els fragments de paret cel·lular de la pròpia planta, o productes de baix pes molecular del metabolisme secundari (per exemple les *syringolides* (Keen *et al.*, 1996)), aquests són anomenats elicitors endògens i, tots ells, són capaços d'activar la resposta defensiva de la planta.

La resposta defensiva de les plantes front l'atac d'un patogen desencadena una sèrie d'esdeveniments intracel·lulars, que condueixen fins a l'activació de l'expressió dels diferents gens relacionats amb les defenses. En la *Figura 10* s'esquemmatitza la cadena d'esdeveniments en resposta a l'atac de patògens.

Així, quant un patogen ataca la planta, ja sigui a través del reconeixement de productes avr o de molècules elicitores per part de receptors de membrana, es desencadena una entrada de Ca^{2+} i un intercanvi de H^+ i K^+ , que conduirà a l'acidificació de la cèl·lula. L'obertura de canals aniònics i l'activació del complex NADH-oxidasa portarà a la producció d'espècies reactives (ROS, espècies reactives d'oxigen) i d'òxid nítric (NO). Aquests esdeveniments primerencs també coincideixen, en la seva majoria, amb els esdeveniments que es produeixen quant la planta pateix una ferida provocada per l'atac d'un insecte (Durrant *et al.*, 2000; Bruxelles & Roberts, 2001). Les ROS i l'òxid nítric són importants missatgers secundaris en els processos de defensa de les plantes.

Les espècies reactives d'oxigen, ROS, (el radical superòxid (O_2^-) i peròxid d'hidrogen (H_2O_2)) poden tenir efectes immediats en el reforçament de la paret cel·lular, mitjançant l'acció de peroxidases. Aquestes ROS poden ser detectades per la cèl·lula i generar respostes intracel·lulars. La inducció de l'expressió de gens de defensa i de la resposta hipersensible, es veuen induïdes principalment per l'acció de l' H_2O_2 en coordinació amb l'àcid salicílic (Van Camp *et al.*, 1998). És important destacar que l'àcid salicílic actua, a més a més, com a senyal per a la resposta sistèmica en fulles no atacades pel patogen (Bolwell, 1999).

En plantes s'ha descrit que l'òxid nítric, NO, indueix el creixement, retarda la senescència i activa la producció de fitoalexines. L'òxid nítric, que és un element bàsic en el sistema animal, té en plantes un paper clau en la resposta a patògens. L'òxid nítric actua paral·lelament a les espècies reactives d'oxigen en la resposta hipersensible i l'expressió de gens de defensa, i també sembla actuar de manera sinèrgica amb l'àcid salicílic en el desenvolupament de la resistència (Bruxelles & Roberts, 2001). A més a més, l'òxid nítric pot reaccionar químicament amb el superòxid i generar compostos citotòxics com el peroxinitrit i el radical hidroxil (Van Camp *et al.*, 1998). El paper de l'òxid nítric en la mort cel·lular no està encara ben definit, però s'ha proposat que els senyals redox, a través d'aquest i de les espècies reactives d'oxigen, són induïts per l'àcid salicílic en un mecanisme de *feedback* cíclic (Cohn *et al.*, 2001).

Altres senyals primerenques addicionals, que poden precedir l'esclat oxidatiu, inclouen l'activació de kinases, fosfatases, fosfolipases, peroxidases...

La cascada condueix fins a l'activació dels gens de defensa, a través de la participació de factors de transcripció específics, i a la resposta hipersensible (HR). A més de la HR, es donarà un augment en la capacitat de la planta hoste a resistir i respondre a noves

infeccions per diferents patògens. Aquest augment de la resistència a noves infeccions és, juntament amb la HR, clau en la resposta defensiva front patògens, i ha estat anomenada Resposta Sistèmica Adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*) (veure Apartat 4.4).

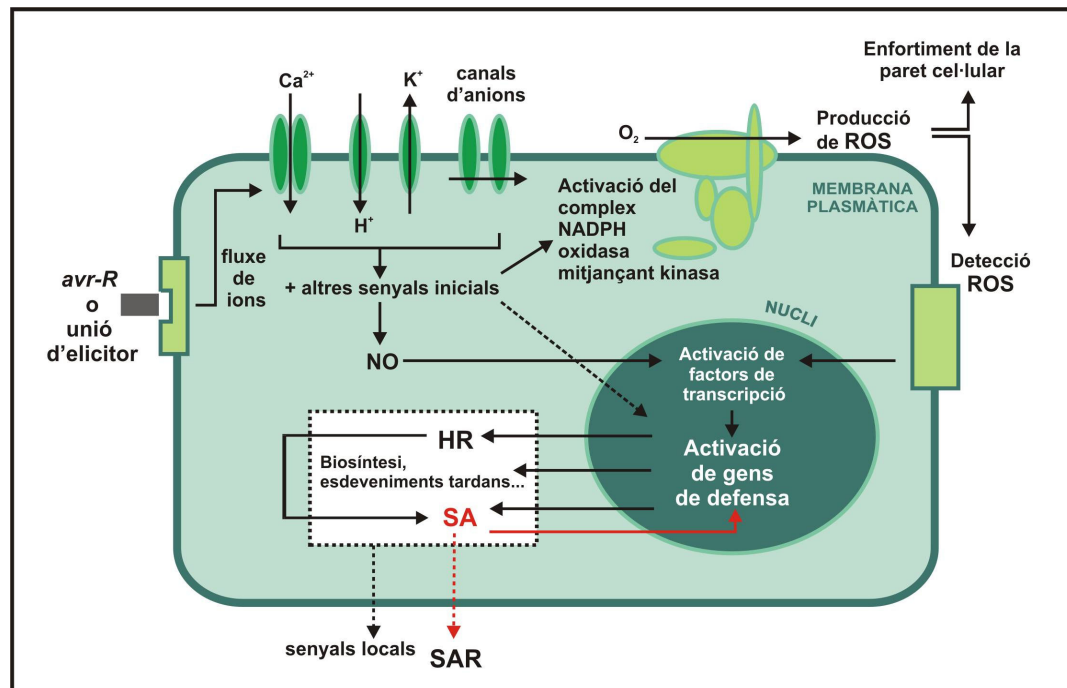


Figura 10: Resposta defensiva de plantes front l'atac de patògens. El reconeixement entre productes *avr* o d'elicitors per part dels seus receptors condueix a l'activació de gens de defensa, de la resposta hipersensible (HR) i a la resistència sistèmica adquirida (SAR). ROS, espècies reactives d'oxigen; NO, òxid nítric; SA, àcid salicílic. (Dangl *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996).

4.3 Proteïnes relacionades amb patogènia (PRs)

Les proteïnes PR (*Pathogenesis-Related proteins*) es defineixen com a proteïnes codificades per la planta hoste però induïdes en situacions de patogènia o situacions relacionades. L'expressió de gens PR s'indueix en resposta a diferents tipus de patògens: fongs, bacteris, virus i viroides. Per situacions relacionades s'entén pressions ambientals com poden ser les ferides mecàniques, tractaments amb agents químics, etc. Les proteïnes PR no només s'acumulen localment a la zona infectada, sinó que també són induïdes sistèmicament, i estan associades al desenvolupament de la resistència sistèmica adquirida (SAR) (Van Loon & Pieterse, 1999). En teixits concrets de la planta, com són les flors i les llavors, les proteïnes PR poden expressar-se de manera constitutiva, no depenent d'infecció; el fet que aquests òrgans estiguin destinats a garantir la supervivència de l'espècie fa que hagin d'estar protegits d'una manera natural i constant.

Actualment, les proteïnes PR es classifiquen en 17 famílies (PR-1 a PR-17). En la *Taula 11* es mostren les 17 famílies de proteïnes PR i les seves característiques.

Família	Membre - tipus	Característica
PR-1	PR-1a 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 transferència 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

Taula 11: Famílies de les proteïnes de defensa PR de plantes. S'indiquen els membres tipus i les característiques de cada família (Van Loon, 2003).

En la majoria de les famílies s'hi troben tant representants àcids com bàsics. Els representants bàsics són generalment localitzats a les vacuoles, mentre que les PR àcides solen ser secretades a l'espai extracel·lular. Per exemple, les quitinases i β -1,3-glucanases bàsiques, de les famílies PR-3 i PR-2 respectivament, es localitzen a les vacuoles; contràriament, les proteïnes àcides corresponents són transportades a l'espai extracel·lular (Hensel *et al.*, 2002).

El mecanisme d'acció de les proteïnes **PR-1** continua essent desconegut. S'ha descrit l'activitat antifúngica de la proteïna PR1a de tabac, així com de la proteïna P14 de tomàquet.

Les β -glucanases corresponen a la família **PR-2** de les proteïnes de defensa PR i han estat agrupades en tres classes en base a l'anàlisi de les seves seqüències aminoàcídiques. Les glucanases de la Classe I són proteïnes bàsiques, d'aproximadament 33 kDa, i que es troben a les vacuoles de plantes; són sintetitzades com a preproteïnes i processades abans de ser actives enzimàticament, aquesta característica les distingeix de les altres dues classes de glucanases. Les Classes II i III inclouen les glucanases àcides d'aproximadament 36 kDa, i són proteïnes extracel·lulars (Selintrennikoff *et al.*, 2001). Les proteïnes PR-2 són presents en gran varietat d'espècies vegetals (tabac, *Arabidopsis*, gramínies...) i s'ha demostrat que presenten activitat antifúngica tant *in vitro* com *in vivo* en plantes transgèniques que sobreexpressen gens de β -glucanases (Stintzi *et al.*, 1993; Jach *et al.*, 1995). El mode d'acció de les glucanases es basa en la hidròlisi dels β -1,3-glucans de la paret cel·lular del fong, principalment en l'àpex de les hifes on els glucans estan més exposats; l'aprimament de la paret cel·lular resultarà en la lisi cel·lular i la mort de la cèl·lula.

La família **PR-3** engloba les quitinases, proteïnes que presenten un pes molecular entre 26 a 43 kDa. Les quitinases han estat dividides en 5 grups (on s'inclouen tant quitinases PR-5 de plantes com d'altres orígens, com bacteris o fongs). Han estat aïllades de gran varietat d'espècies vegetals (tabac, pèsol, cogombre, gramínies...). El mode d'acció de les quitinases correspon a seva activitat endoquitinasa, que trenca *in situ* els polímers de quitina de la paret cel·lular, que dóna com a resultat un aprimament de la paret i que condueix a les cèl·lules fúngiques a un estat osmòticament sensible (Selintrennikoff *et al.*, 2001).

Les proteïnes de la família **PR-4** són quitinases de la classe I i classe II. Aquestes dues classes es diferencien entre sí per la presència (classe I) o absència (classe II) d'un domini N-terminal conservat, ric en cisteïna, que correspon a la *heveïna* madura, una petita proteïna antifúngica aïllada de l'arbre del cautxú (*Hevea brasiliensis*) (Broekaert *et al.*, 1990). Els primers gens que codificaven per quitinases de classe I de la família PR-4 varen ser els gens win-1 i win-2 de patata (Stanford *et al.*, 1989); posteriorment s'ha aïllat gen de quitinases de classe I i de classe II en tomàquet, tabac, *Arabidopsis*, blat i l'arbre del cautxú (Broekaert *et al.*, 1990; Linthorst *et al.*, 1991; Friedrich *et al.*, 1991; Potter *et al.*, 1993; Caruso *et al.*, 1999). Tant les quitinases com les β -1,3-glucanases han estat àmpliament utilitzades per a la protecció front fongs patògens en plantes transgèniques. Tanmateix, els oomicets (com ara *Phytophthora* o *Pythium*) no contenen quitina en la seva paret, i per tant, la estratègia d'utilitzar gens que codifiquen per a quitinases no és vàlida per a la millora de la resistència de plantes a aquests fitopatògens (Van der Bierzen, 2001).

Les proteïnes **PR-5** inclouen el grup de les *thaumatin-like proteins* (TLPs) expressades en fulles i inclou l'osmotina de tabac (Skadsen, 2000). La família **PR-6** inclou els inhibidors de proteases (veure apartat 5.1).

Les defensines (pèptids antimicrobians de 45 a 55 aminoàcids), les tionines (proteïnes amb activitat citotòxica contra fongs i bacteris) i les proteïnes LTP (*lipid transfer proteins*; que participen en la formació de la cutícula i presenten activitat fungicida en ordi i rave) han estat incloses com a les famílies **PR12**, **PR-13** i **PR-14**, respectivament de les proteïnes PR. Les defensines tenen un ampli espectre d'acció i inhibeixen gran nombre de patògens de plantes, com per exemple *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* o *F. solani* (Selintrennikoff *et al.*, 2001). Així mateix, diferents estudis amb plantes transgèniques per gens de defensines han demostrat l'augment de la resistència d'aquestes plantes front fongs fitopatògens (Terras *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Parashina *et al.*, 2000).

Les tionines, pèptids rics en cisteïnes, són compactes i amb forma d' L, on el braç llarg seria format per dues hèlix- α , unides per ponts disulfur, i el braç curt per dues fulles- β antiparal·leles (Hancock & Lehrer, 1998). Molts gens de tionines han estat aïllats, caracteritzats i introduïts en gran varietat de plantes; la sobreexpressió d'alguns d'aquests pèptids en planta a permès reduir el desenvolupament de diferents patògens com ara *Alternaria*, *Fusarium*, *Plasmodiophora* o *Verticillium* (Punja, 2001).

Les LTPs, *lipid-transfer protein*, han sigut aïllades en mamífers, plantes, fongs i bacteris (Selintrennikoff *et al.*, 2001). Són proteïnes petites (d'aproximadament 9kDa) de 90 aminoàcids estabilitzats per 4 ponts de disulfur, i amb un cavitat hidrofòbica central (Guerbette *et al.*, 1999). En plantes superiors són presents en gran quantitat i faciliten la transferència de fosfolípids entre membranes (Kader *et al.*, 1996). Així mateix s'ha pogut demostrar l'acció de les LTPs en la resposta defensiva de plantes front fongs fitopatògens (Molina & García-Olmedo, 1993a; García-Olmedo *et al.*, 1995; Cammue *et al.*, 1995; García-Olmedo *et al.*, 2001; Guiderdoni *et al.*, 2002); així com la millora de la resistència a *Pseudomonas syringae* en tabac i *Arabidopsis* mitjançant la transformació amb el gen d'una LTP d'ordi (Molina & García-Olmedo, 1997). S'ha pogut demostrar la interacció entre LTPs de blat i receptors d'elicitors localitzats a la membrana plasmàtica, fet que reforça la hipòtesi de la implicació de les LTPs en la resposta defensiva de plantes (Buhot *et al.*, 2001).

Així mateix, les últimes famílies de PR descrites han estat les **PR-15** i **PR-16**, que són representades per oxalat sintases aïllades en ordi (Zhang *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1998), i la família **PR-17**, que correspon a PRp27 de tabac, amb funció desconeguda (Okushima *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2002).

4.4 Resposta Sistèmica Adquirida (SAR) i Resistència Sistèmica Induïda (RSI)

Juntament amb la Resposta Hipersensible, la Resposta Sistèmica Adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) és un fenomen clau en la resposta defensiva de plantes front patògens.

La SAR seria l'equivalent a la immunització que es dona en els animals vertebrats; segons la qual una infecció inicial per un patogen, 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 patogen inicial si no també davant d'altres patògens. Aquest tipus de protecció pot durar setmanes o fins i tot mesos, i s'observa tant en els teixits infectats inicialment com en parts distals de la planta (Ryals *et al.*, 1996). La SAR es caracteritza per l'acumulació de proteïnes de defensa, on s'inclouen gran nombre de proteïnes PR, com per exemple quitinases o β -1,3-glucanases (Kombrink & Somssich, 1997). També s'ha descrit la inducció de l'expressió de gens de defensa a nivell sistèmic, per la ferida produïda per insectes, protegint així la planta front ulteriors atacs d'insectes (Ryan, 1990).

Com s'ha comentat anteriorment, l'àcid salicílic (SA) és una fitohormona clau en la resposta defensiva front patògens. Diferents estudis demostren la implicació del SA en la resposta defensiva: els nivells de SA s'incrementen en els teixits de la planta després d'infecció per patògens; així mateix, l'aplicació exògena de SA condueix a l'activació de l'expressió de gens *PR* i a un augment de la resistència front un ampli ventall de patògens (Ryals *et al.*, 1996). Estudis genètics també han demostrat que el SA és necessari per una activació ràpida de les respostes defensives, per a la inducció de la resposta local que permet la contenció del patogen, i també per a la l'establiment de la SAR (Kunkel & Brooks, 2002).

A part de la SAR, existeix una altra forma de resistència sistèmica induïble contra patògens, la Resistència Sistèmica Induïda (ISR, *Induced Systemic Resistance*). L'ISR és estimulada pels rizobacteris no patògens i s'ha demostrat que desencadena resistència a diferents patògens en les parts àrees de la planta (Pieterse *et al.*, 1999). Només certs rizobacteris són capaços de desencadenar la SAR per la via del SA, mitjançant la producció de SA a la superfície de l'arrel (Pieterse *et al.*, 2001).

L'ISR és, en la majoria dels casos, independent d'àcid salicílic (SA) i no implica la inducció de proteïnes PR associades a la SAR, com a estat demostrat en *Arabidopsis thaliana*. En canvi, l'ISR és depenent de l'àcid jasmònic i l'etilè, fitohormones associades tradicionalment a la resposta a ferida (Bruxelles & Roberts, 2001).

L'ISR promoguda per rizobacteris ha estat descrita en nombroses espècies vegetals (mongeta, clavell, cogombre, rave, tabac i la planta model *Arabidopsis*) i s'ha demostrat que és efectiva contra un ampli espectre de patògens de plantes, on s'inclouen fongs, bacteris i virus (Van Loon *et al.*, 1998).