

---

## **I. EXPRESSIÓ DEL GEN *mpi* (Maize Proteinase Inhibitor) DE BLAT DE MORO EN PLANTES D'ARRÒS**

---

### **I.1 EXPRESSIÓ CONSTITUTIVA DEL GEN *mpi* EN PLANTES D'ARRÒS**

---

#### **I.1.1 Preparació de les construccions per a la transformació**

---

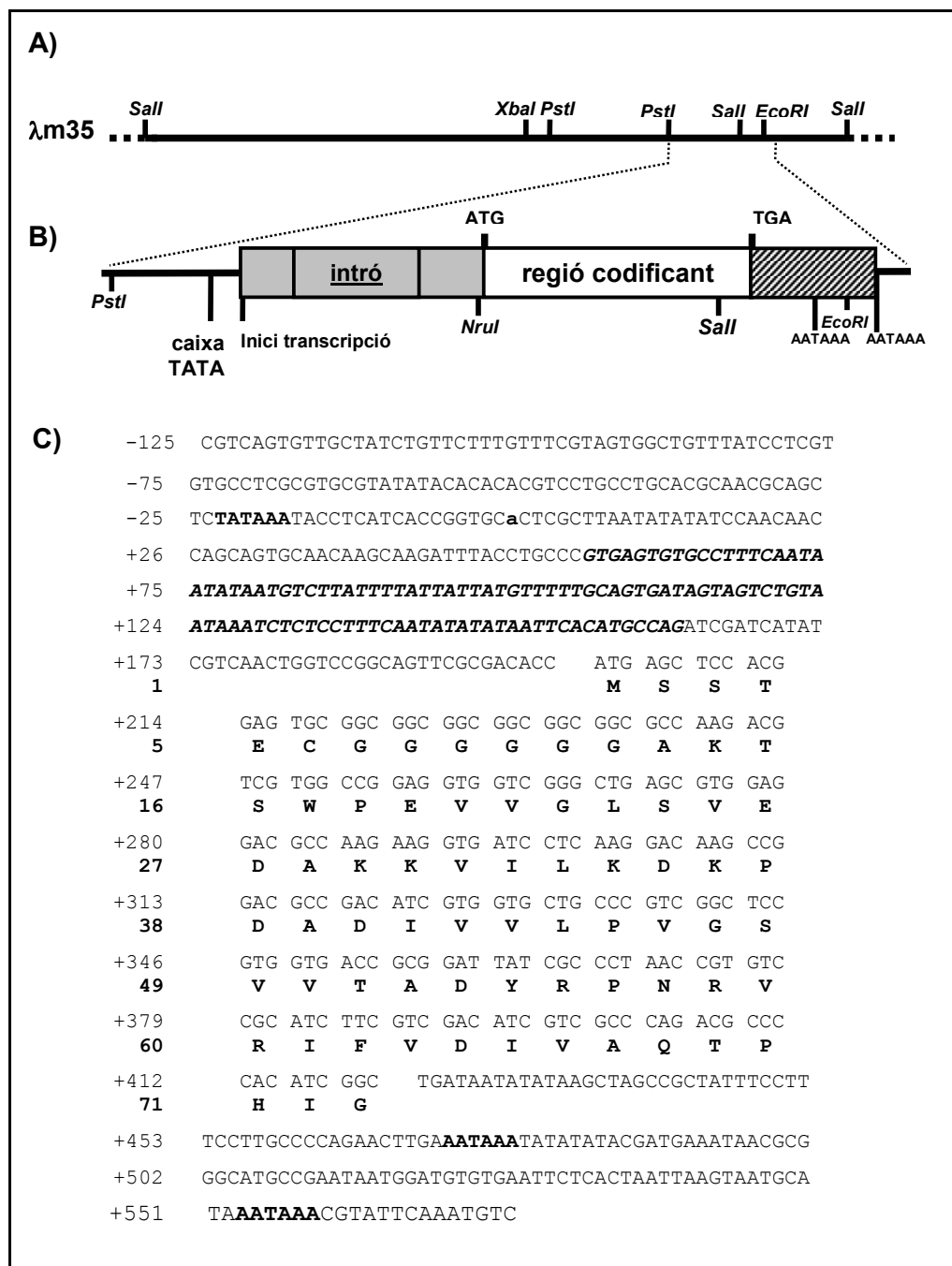
Estudis anteriors, realitzats al nostre laboratori, van permetre identificar i caracteritzar la seqüència corresponent al gen *mpi* dins un fragment d'ADN genòmic de blat de moro clonat en el bacteriòfag  $\lambda$  EMBL3; aquest clon fou anomenat  $\lambda$ m35. A la *Figura 34* es mostra la seqüència nucleotídica inicialment caracteritzada del gen *mpi*. A la regió 5' no traduïda es troba la caixa TATA (TATAAATA); així mateix es trobà un possible punt d'inici de la transcripció 23 pb, riu avall de l'esmentada caixa TATA. Cal destacar la presència d'un intró de 108 nt de longitud, situat dins la regió 5' no traduïda. La regió 3' no traduïda contenia dues senyals putatives de poliadenilació (AATAAA).

La seqüència aminoacídica que se'n dedueix presentà gran homologia amb les seqüències d'aminoàcids de la família de l'Inhibidor I de patata, raó per la qual s'anomenà MPI (*Maize Proteinase Inhibitor*). L'inhibidor MPI té 73 aminoàcids amb un pes molecular estimat de 7605 Da i un pl de 5,5. Així mateix, en el laboratori es disposava de l'ADNc complet que codifica pel gen *mpi* (Cordero *et al.*, 1994).

El fragment codificant del gen *mpi* fou clonat en un vector plasmídic anomenat pAHC17, cedit pel Dr. Tepperman (Christensen & Quail, 1996). Aquest vector consta d'un esquelet del plasmidi pUC8 i conté el promotor del gen de l'*Ubiqüitina 1* de blat de moro (promotor seguit del primer exó i el primer intró del gen *ubi*), seguit d'una diana de clonació *BamHI* i el terminador *nos*. Emprant la diana de restricció *BamHI*, es clonà l'ADNc del gen *mpi* entre el promotor *ubi* i el terminador *nos*. El promotor *ubi* de blat de moro s'utilitza de manera rutinària per a l'expressió constitutiva de gens d'interès en plantes d'arròs.

Aquesta construcció, denominada pSC22*ubi::mpi::nos* (veure la *Figura 35*), fou seqüenciada i s'utilitzà per a la transformació de plantes d'arròs de la varietat Sènia mitjançant la tècnica de bombardeig de microprojectils (veure apartat *I.1.2*).

En aquest treball, es realitzà una construcció de les mateixes característiques (promotor constitutiu *ubi*, gen *mpi* i terminador *nos*) però clonat en un vector que permet la transformació mitjançant el mètode *Agrobacterium*; el plasmidi pCAMBIA1300.

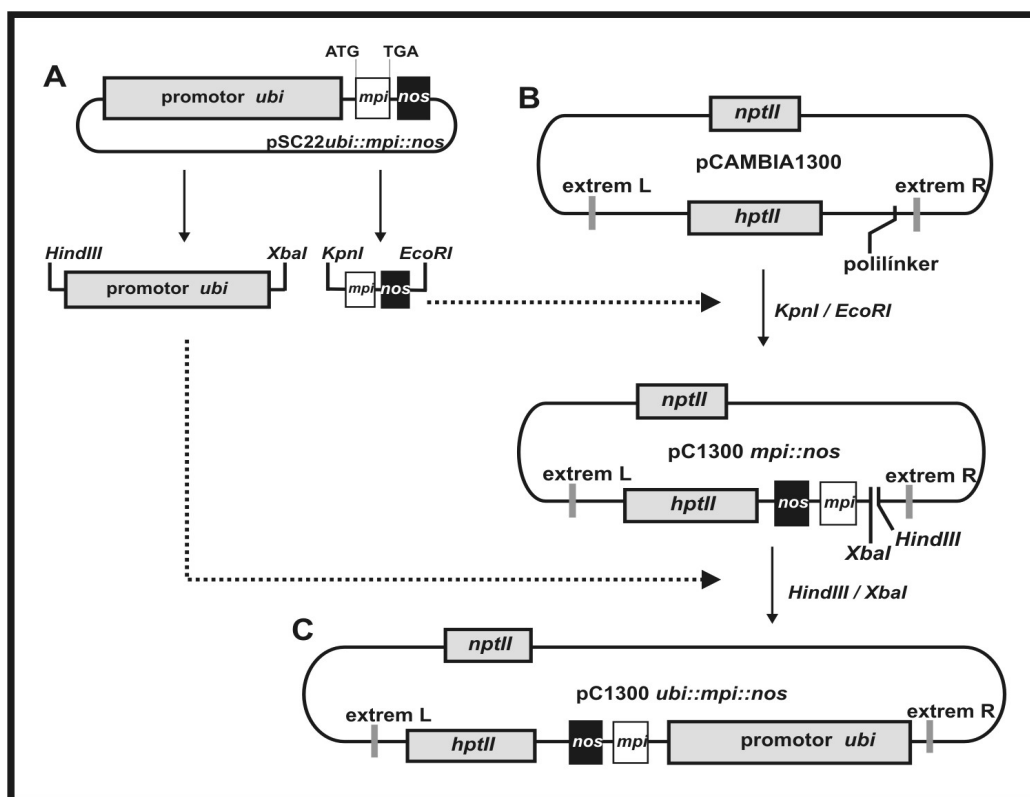


**Figura 34:** Estructura i seqüència nucleotídica del gen *mpi* (Maize Proteinase Inhibitor). **A)** Mapa de restricció parcial del clon genòmic de l'*mpi*. **B)** Zona ampliada on s'indiquen els trets més importants: en gris, zona 5' no traduïda del gen *mpi* que inclou un intró; en blanc, regió codificant del gen *mpi*; zona ratllada, regió 3'. **C)** Seqüència nucleotídica del gen *mpi*: la regió codificant es mostra amb la seqüència aminoacídica traduïda; en la zona promotora s'indica en negreta una possible caixa TATA i l'inici de transcripció putatiu en minúscula (nucleòtid número 1). L'intró de la zona 5' no traduïda s'indica en negreta. En la zona 3' no traduïda es mostra en negreta les senyals putatives de poliadenilació (AATAAA).



**Figura 35:** Construcció pSC22ubi::mpi::nos. Conté el promotor del gen de l'Ubiquitina 1 de blat de moro (inclou el promotor i els primers exó i intró del gen) seguit de la regió codificant del gen *mpi* i el terminador *nos*.

En la Figura 36 es mostra el procés d'obtenció de la nova construcció:



**Figura 36:** Obtenció de la construcció pC1300ubi::mpi::nos (C) per a l'expressió constitutiva del gen *mpi* en plantes d'arròs. Es parteix de la construcció SC22ubi::mpi::nos (A) i del plasmidi comercial pCambia1300 (B). La construcció obtinguda conté el promotor del gen de l'Ubiquitina 1 de blat de moro (inclou el promotor i els primers exó i intró del gen) seguit de la regió codificant del gen *mpi* i el terminador *nos*, dins del plasmidi pCambia1300 que permet la transformació mitjançant el mètode d'*Agrobacterium*. Extrem L i extrem R: extrems de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*; gen *nptII* confereix resistència a la kanamicina (gen de selecció en bacteris); gen *hptII* confereix resistència a l'higromicina (gen de selecció en planta).

El plasmidi comercial pCAMBIA1300 (subministrador CAMBIA, *Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture*, Camberra, Austràlia), permet la clonació del gen desitjat entre els extrems esquerra i dret (L i R, respectivament) de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*, i presenta, com a gen de selecció en planta, el gen que confereix resistència a l'higromicina (gen *hptII*).

Amb aquest objectiu, i mitjançant digestions successives de la construcció pSC22*ubi::mpi::nos*, es varen aïllar dos fragments que corresponien: a) al promotor del gen de l'*Ubiqüitina 1*; b) al gen *mpi* juntament amb el terminador *nos*. El fragment que contenia el gen *mpi* i el terminador *nos* fou clonat en el vector pCAMBIA1300 emprant les dianes de restricció *KpnI* i *EcoRI*. A continuació, emprant les dianes *XbaI* i *HindIII*, es clonà el fragment amb el promotor *ubi*, obtenint així la construcció pC1300*ubi::mpi::nos*. Aquesta construcció fou seqüenciada i emprada per a la transformació d'arròs de la varietat Ariete mitjançant *Agrobacterium*.

### **1.1.2 Transformació de plantes d'arròs (varietats Sènia i Ariete)**

Per a la transformació de plantes d'arròs de la varietat Sènia amb la construcció pSC22*ubi::mpi::nos* s'utilitzà el mètode de bombardeig de microprojectils o biolística. Aquesta tècnica permet transferir directament el plasmidi amb el gen d'interès mitjançant el co-bombardeig amb dos plasmidis independents portadors, respectivament, del gen d'interès o del gen de selecció en planta. En el nostre cas, el plasmidi portador del gen de selecció utilitzat fou pLTAB227 que conté el gen *hph* que codifica per la resistència a l'higromicina. Aquest experiment de transformació fou realitzat per la Dra. Victòria Marfà al centre CIRAD de Montpellier, França. Es seleccionaren diverses línies de plantes Sènia resistents a l'higromicina. Aquestes plantes foren transferides a l'hivernacle per a la seva regeneració i posterior anàlisi en estadi de planta adulta.

Per a la transformació d'arròs de la varietat Ariete amb la construcció pC1300*ubi::mpi::nos* s'utilitzà el mètode de transformació mitjançant *Agrobacterium*. Aquest mètode permet integrar únicament el fragment d'ADN clonat entre els extrems L i R del T-DNA, i a part del gen d'interès, inclou el gen de selecció, defugint així la introducció de seqüències plasmídiques innecessàries. La soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada va ser la soca EHA105 (desenvolupada per la Dra E. Hood, i cedida pel Dr P. Ouwkerk de la Universitat de Leiden); aquesta soca fou transformada amb la construcció pC1300*ubi::mpi::nos* i es procedí a la transformació de calls embriogènics. Aquests calls embriogènics procedien de llavors induïdes d'arròs de la varietat Ariete.

Per a aquest experiment de transformació s'utilitzaren 114 calls inicials, dels quals foren eliminats el 30% degut a la contaminació excessiva després de la cocultivació amb

*Agrobacterium*; així el 56,3% dels calls bombardejats es regeneraren fins a planta adulta, obtenint-se finalment un total de 175 plantes (T0), amb 24 esdeveniments de transformació independents (callus independents d'on s'obtenen les diferents línies de plantes transformades). Aquestes plantes foren transferides a l'hivernacle per a la seva regeneració i posterior anàlisi en estadi de planta adulta. Les dades obtingudes en aquesta experiència de transformació es resumeixen a la taula següent:

**Taula 37: Resum de l'experiència de transformació de callus d'arròs de la varietat Ariete amb la construcció pC1300ubi::mpi::nos, mitjançant el mètode d'*Agrobacterium*.**

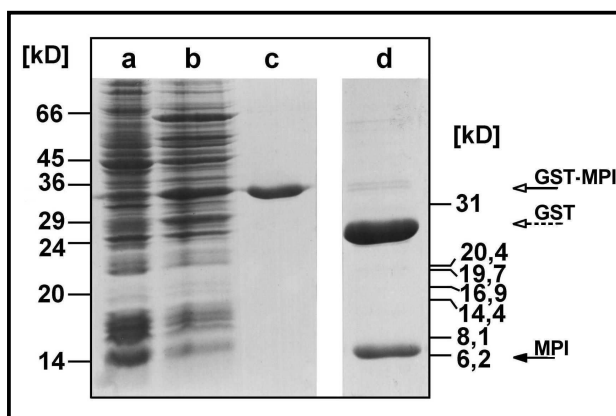
calls inicials	calls regenerats	esdeveniments independents	total plantes regenerades
114	56,3%	24	175

### **I.1.3.1 Nivells d'acumulació de la proteïna MPI en plantes transgèniques**

La primera selecció, en la generació T0, de les línies Sènia transgèniques, transformades per bombardeig, fou realitzada mitjançant anàlisis d'extractes proteics totals de fulla de les plantes d'arròs per la tècnica d'immunotransferència. S'utilitzà un anticòs anti-MPI obtingut al nostre laboratori.

Com a control en les immunotransferències i, al mateix temps, per poder estimar el contingut en proteïna MPI dels extractes a analitzar, s'utilitzà proteïna MPI recombinant, (r)MPI, expressada en *Escherichia coli*. La proteïna (r)MPI s'extragué i purificà mitjançant cromatografia d'afinitat; seguidament es digerí amb trombina per alliberar la proteïna MPI de la GST. En la *Figura 5* es mostren diferents passos de l'expressió en *E. coli* i de la purificació de la proteïna fusió GST-MPI, així com la digestió de la mateixa amb trombina.

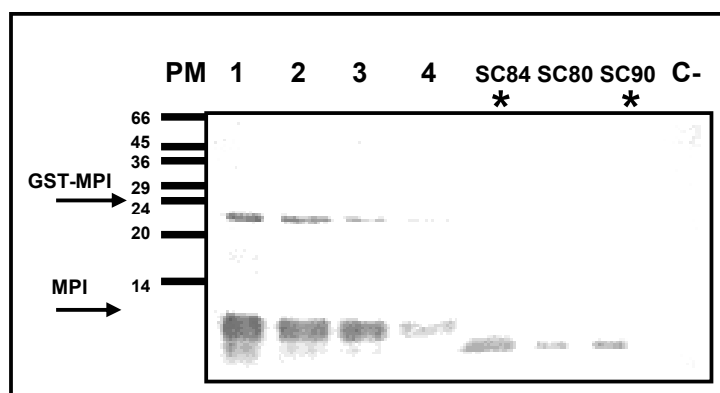
Amb aquest anàlisi s'identificaren tres línies Sènia independents, que mostraren els nivells d'acumulació de la proteïna MPI més elevats, que anomenàrem SC80, SC90 i SC84. Les 3 línies obtingudes foren seleccionades per a obtenir la següent generació (T1), on tornaren a ser analitzades, per mitjà de immunotransferència. S'obtingueren els mateixos nivells d'expressió que els observats per a la generació anterior T0. Els resultats de immunotransferència realitzada amb plantes de la generació T1 de les tres línies Sènia seleccionades (Sènia SC84, SC80 i SC90), es mostra en la *Figura 38*.



**Figura 38:** Expressió de la proteïna MPI en *E. coli*. Gels SDS tenyits amb blau de Coomassie de diferents passos de l'expressió de la proteïna fusió GST-MPI (carrils a-c, 12,5% SDS-PAGE) i purificació (carrils d i e, 18% SDS-PAGE): a, cèl·lules bacterianes no induïdes; b, cèl·lules bacterianes induïdes per IPTG; c, fracció eluïda de la cromatografia d'afinitat en glutatió-Sepharose 4B; d, productes de la digestió de la proteïna fusió amb trombina. Les fletxes indiquen la proteïna fusió GST-MPI (blanc), la GST (blanc, discontinua) i la proteïna MPI (negre). (Tamayo *et al.*, 2000)

Les línies Sènia SC80, SC90 i SC84 acumulaven, respectivament, 0,2%, 0,25% i 0,45% d'MPI en el total de proteïnes solubles extretes de mostra foliar.

A partir d'aquesta generació és continuà treballant amb les línies que acumulaven a nivells més alts l'inhibidor MPI, les línies SC90 i SC84 (0,25% i 0,45% d'MPI respectivament).



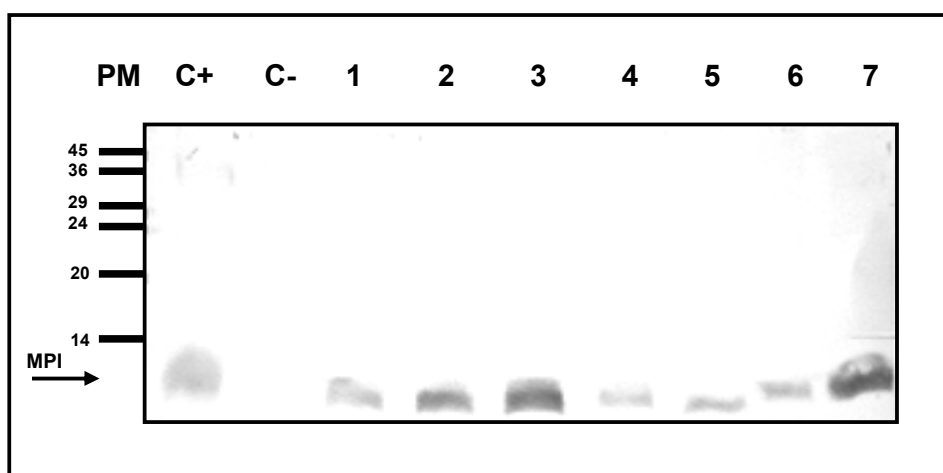
**Figura 39:** Plantes transgèniques *pSC22ubi::mpi::nos* (varietat Sènia), transformades mitjançant bombardeig, de la generació T1 analitzades per immunotransferència. S'utilitzaren 20 µg d'extracte proteic de mostra foliar. PM marcador de pes molecular (kDa). 1, 2, 3 i 4 controls positius equivalents a 0,150, 0,125, 0,1 i 0,075µg d'MPI respectivament. SC84, SC80 i SC90 provinents de plantes transgèniques *ubi-mpi-nos* ; C- control negatiu corresponent a extracte proteic de fulla de planta Sènia no transformada. Els asteriscs indiquen les línies seleccionades per a estudis posteriors.

De la mateixa manera, les 175 plantes Ariete transgèniques per el gen *mpi*, transformades mitjançant el mètode d'*Agrobacterium*, foren analitzades per immunotransferència utilitzant l'anticòs anti-MPI. Es realitzà l'extracció de proteïnes de mostres foliars de totes les plantes i s'utilitzà proteïna MPI recombinant per a estimar el contingut de MPI en els extractes proteics. El resultat d'aquest primer cribratge en la generació T0 és resumeix en la següent taula:

**Taula 40: Acumulació de la proteïna MPI en extractes proteics de mostres foliars de plantes pC1300ubi::mpi::nos de la generació T0 (varietat Ariete), transformades mitjançant *Agrobacterium*. Els valors corresponen al nombre de plantes que acumulen l'inhibidor MPI en cada un dels % indicats (% d'MPI en el total de proteïnes solubles); entre parèntesis s'indica el % del total de plantes transgèniques.**

pC1300ubi::mpi::nos ( <i>Agrobacterium</i> ) T0				
% MPI	0	< 0,1 %	0,1 - 0,2 %	> 0,2 %
nº de plantes	8	72	63	32
	(4,6 %)	(40,8 %)	(36,2 %)	(18,4 %)

La *Figura 41* mostra un exemple dels resultats de les immunotransferències realitzades amb les línies Ariete, transformades mitjançant *Agrobacterium*:



**Figura 41: Plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos (varietat Ariete) transformades mitjançant *Agrobacterium*, de la generació T0 analitzades per immunotransferència. S'utilitzaren 50 µg d'extracte proteic. PM marcador de pes molecular (kDa). C+ control positiu equivalent a 0,1µg de proteïna MPI; #1 a #7 plantes transgèniques *ubi-mpi-nos* (T0); C- control negatiu corresponent a extracte proteic de fulla de planta Ariete no transformada.**

Les plantes que presentaven una acumulació igual o superior al 0,2 % foren seleccionades per a una nova anàlisi, per tal de determinar amb més exactitud el nivell d'expressió de l'inhibidor MPI.

La següent taula mostra els resultats obtinguts per el segon cribratge d'aquest grup de plantes:

**Taula 42: Acumulació de la proteïna MPI (segon anàlisi) en mostres foliars de plantes pC1300ubi::mpi::nos de la generació T0, transformades mitjançant *Agrobacterium*. Els valors corresponen al nombre de plantes que acumulen l'inhibidor MPI en cada un dels % indicats (% d'MPI en el total de proteïnes solubles); entre parèntesis s'indica el % del total de plantes transgèniques.**

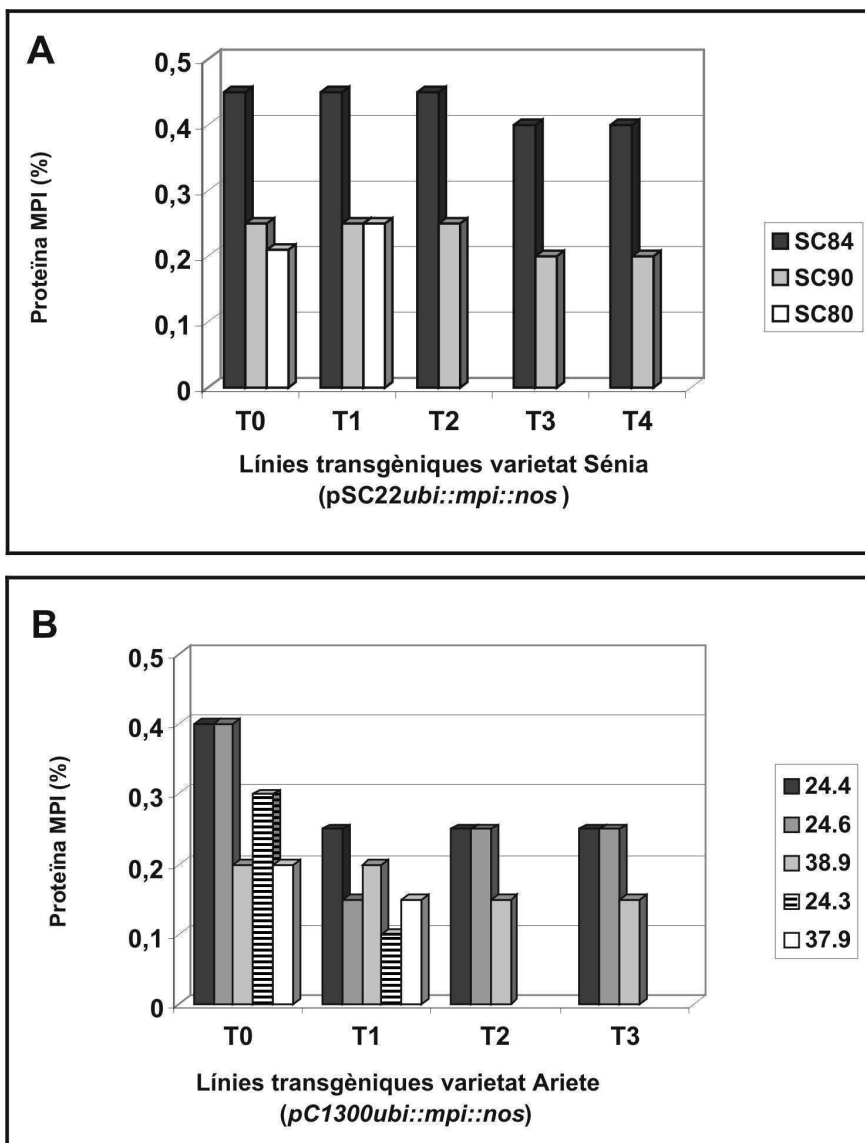
<b>pC1300ubi::mpi::nos (<i>Agrobacterium</i>) T0</b>			
<b>% MPI</b>	<b>≤ 0,25 %</b>	<b>0,25 - 0,5 %</b>	<b>≥ 0,5 %</b>
<b>nº de plantes</b>	<b>45</b>	<b>35</b>	<b>15</b>
	<b>(46,9 %)</b>	<b>(37,4 %)</b>	<b>(15,7 %)</b>

D'aquesta manera es seleccionaren 5 línies Ariete (que fossin fèrtils) per obtenir les següents generacions. Aquestes línies foren: línia 24.3, 24.4, 24.6, 37.9 i 38.9 (amb un nivell d'acumulació de l'inhibidor MPI superior al 0,2% en totes elles).

Es va estudiar si els nivells d'acumulació de l'inhibidor MPI en fulla de les línies seleccionades, tant per les línies Sénia transformades per biolística com les línies Ariete transformades per *Agrobacterium*, es mantien estables al llarg de successives generacions. El resultat d'aquest estudi es reflecteix en la *Figura 43*.

En les plantes transformades de la varietat Sénia, no s'observaren grans diferències a nivell d'acumulació de la proteïna MPI entre les diferents generacions. Els nivells d'acumulació de la proteïna MPI en Ariete variaren entre les generacions T0 i T2, fixant-se finalment a partir de la generació T2.





**Figura 43:** Nivells d'acumulació de la proteïna MPI en fulla en generacions successives de plantes d'arròs transgèniques *ubi::mpi::nos*. % de proteïna MPI en el total de proteïnes solubles de fulla, segons resultats obtinguts en les anàlisis per immunotransferència. Les successives generacions foren obtingudes de llavors germinades en presència de higromicina.

### 1.1.3.2 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies d'arròs (varietat Ariete) seleccionades

Les línies seleccionades pC1300ubi::mpi::nos, de la varietat Ariete (transformades per *Agrobacterium*) foren analitzades mitjançant la tècnica de Southern Blot.

Es va extreure l'ADN genòmic d'individus de les tres línies seleccionades (24.4, 24.6 i 38.9); 5 µg d'ADN foren digerits amb diferents enzims de restricció (veure esquema A a la

Figura 44): mitjançant l'enzim *BstEII* que talla la seqüència codificant del gen *mpi*; i amb la combinació dels enzims *BstXI* i *HindIII* que alliberen el cassette *ubi::mpi::nos*.

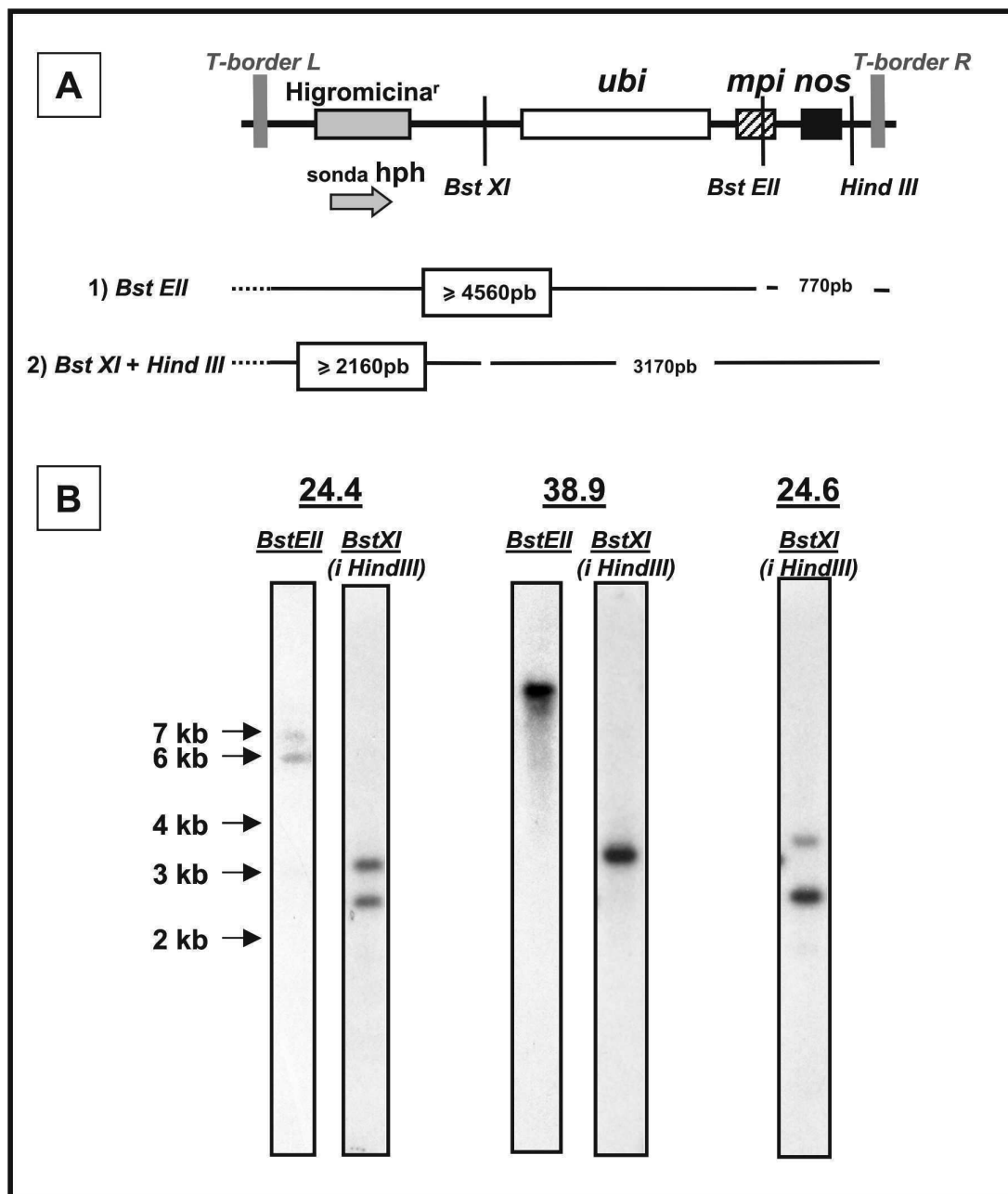


Figura 44: Anàlisi per Southern blot del perfil d'integració del transgen *ubi-mpi-nos* de les línies Ariete 24.4, 24.6 i 38.9. A) Esquema de la construcció i fragments derivats de les digestions amb els enzims de restricció *BstEII*, *BstXI* + *HindIII*. B) Resultat de la hibridació utilitzant la sonda del gen de l'higromicina (*hph*). S'utilitzaren 5 $\mu\text{g}$  d'ADN genòmic extret de fulles.

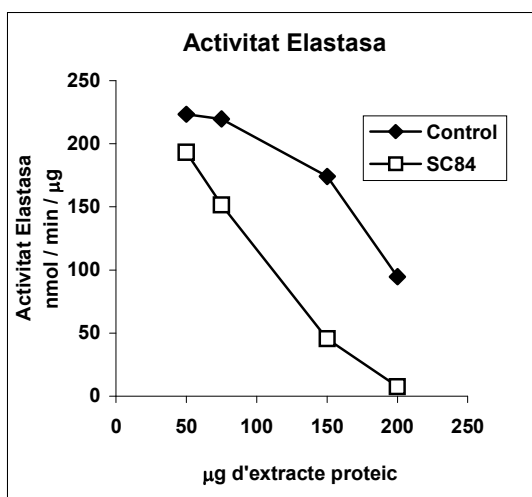
S'utilitzà com a sonda d'hibridació la regió codificant del gen de l'higromicina com a informació indirecte de la integració del cassette *ubi::mpi::nos*. El gen de l'higromicina es cointegra junt amb el cassette ja que està situat entre els dos extrems L i R del T-DNA (veure esquema a la *Figura 44*). Els resultats obtinguts es mostren a la *Figura 44*.

Per la línia 24.4 poguérem determinar la integració de dues còpies del gen de l'higromicina i per extensió del cassette *ubi::mpi::nos*. La línia 38.9 presentà una còpia única del gen de l'higromicina; mentre que la línia 24.6 tenia integrada 1 o 2 còpies.

### **I.1.3.3 Activitat de l'inhibidor MPI en extractes proteics de plantes transgèniques**

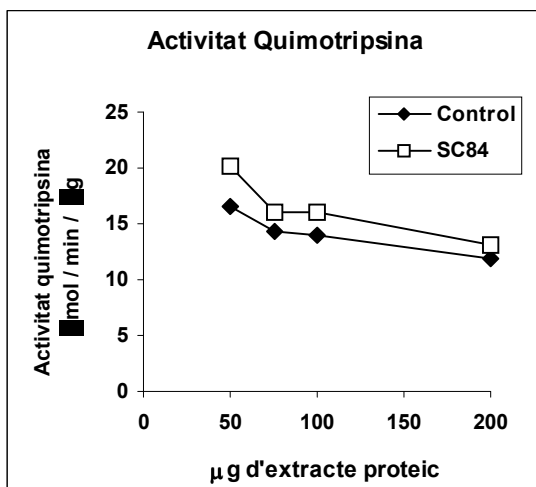
Resultats anteriors en el nostre grup, indicaren que l'MPI inhibeix l'activitat d'elastases de mamífers, mentre que resultà ser un inhibidor dèbil de les quimotripsines de mamífer (Tamayo *et al.*, 2000). Per verificar que el producte del transgen *mpi* era funcional en plantes d'arròs transformades, es realitzà un assaig per determinar la capacitat d'inhibició dels extractes proteics obtinguts de fulla de plantes transgèniques, sobre les proteases digestives elastasa i quimotripsina de mamífers. Aquests resultats es compararen amb els obtinguts emprant extractes de plantes control no transformades.

Diferents quantitats d'extracte proteic de fulla de plantes Sènia pSC22*ubi::mpi::nos* (generació T4) de la línia SC84 (que acumulava un 0,4% d'MPI en el total de proteïnes solubles) i de plantes control Sènia (no transformades) s'incubaren amb elastasa comercial (elastasa porcina). Seguidament, es realitzaren assaigs d'activitat elastasa emprant el substrat sintètic SA<sub>3</sub>pNA (substrat d'elastasa). La gràfica de la *Figura 45* mostra el resultat d'aquests assaigs.



**Figura 45:** Activitat elastasa en presència d'extractes proteics de plantes d'arròs Sènia (línia SC84 pSC22*ubi::mpi::nos*, T4) i plantes Sènia no transformades (control). Les unitats s'expressen en nmols de substrat SA<sub>3</sub>pNA degradats per min i µg d'Elastasa (elastasa porcina).

Es realitzà el mateix assaig utilitzant el substrat comercial SA<sub>2</sub>PPpNA per a activitats del tipus quimotripsina. Es va utilitzar quimotripsina bovina comercial. Els resultats d'aquest assaig es mostren a la *Figura 46*.



**Figura 46:** Activitat quimotripsina en presència d'extractes proteics de plantes d'arròs Sènia (línia SC84 pSC22ubi::mpi::nos, T4) i plantes Sènia no transformades (control). Les unitats s'expressen en μmols de substrat SA<sub>2</sub>PPpNA degradats per min i μg d' α-quimotripsina (quimotripsina bovina).

S'observà que els extractes provinents de fulles de la línia transgènica SC84 presentaren una activitat inhibidora d'elastasa però no de quimotripsina de mamífers. Aquests resultats concorden amb els esperats en funció de l'especificitat d'inhibició de l'MPI sobre elastases i quimotripsines de mamífer, i confirmen la funcionalitat de l'inhibidor MPI en plantes d'arròs.

#### **I.1.4 Bioassaigs amb plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *mpi* front larves del lepidòpter *Chilo suppressalis***

##### **I.1.4.1 Resistència a la infestació amb larves de *Chilo suppressalis* de les plantes transgèniques**

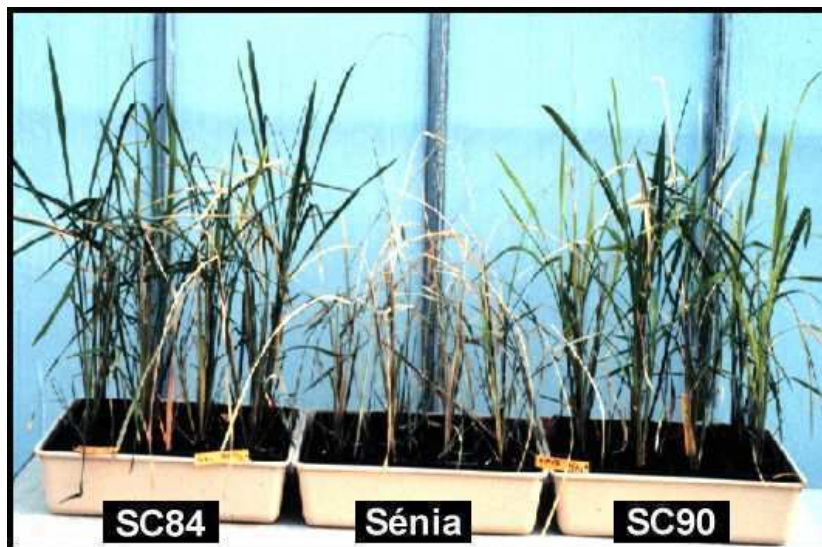
Primerament, s'utilitzaren plantes transgèniques pSC22ubi::mpi::nos (de la varietat Sènia i transformades per biolística) amb l'objectiu de determinar si la sobreexpressió de l'inhibidor MPI confereix protecció a les plantes d'arròs front larves de *Chilo suppressalis*.

Es realitzà un primer bioassaig amb plantes T1 de les línies SC84 i SC90 (que acumulaven inhibidor MPI a nivells del 0,45% i 0,25% respectivament, en el total de proteïnes solubles) i Sènia no transformada.

Llavors d'ambdues línies foren germinades en presència de l'agent de selecció higromicina; les plàntules resistents foren replantades en testos i aclimatades a l'hivernacle. Les plantes es deixaren créixer fins a l'estadi de 4 fulles i es seleccionaren 20 plantes, per a cada línia, que presentessin una talla i aspecte homogenis. Així doncs, s'utilitzaren lots de 20 plantes, agrupades per línies, i s'infestaren amb 4 larves en estadi L2, per planta. Les

larves de *Chilo suppressalis* provenien de la població mantinguda pel grup del Dr. JM. Vassal a l'insectari del centre CIRAD (Montpellier, França).

Es féu el seguiment de les plantes al llarg de dues setmanes; després d'aquest període es feu l'observació dels efectes de la infestació amb les larves de *C. suppressalis* sobre les diferents línies. Les fotografies de la *Figura 47* mostren l'aspecte de plantes de les dues línies transgèniques estudiades comparant-les amb plantes Sénia control, després de dues setmanes d'infestació.



**Figura 47:** Efecte de la infestació amb larves de *Chilo suppressalis* (estadi L2) en plantes transgèniques pSC22ubi::mpi::nos (SC84 i SC90, varietat Sénia), generació T1, i Sénia control no transformades. Aspecte de les plantes 2 setmanes després de la infestació.

Les plantes pSC22ubi::mpi::nos (línies transgèniques SC84 i SC90), mostraren resistència a l'infestació amb larves del lepidòpter *C. suppressalis*. Mentre que les plantes control presentaven la totalitat de les seves fulles i tiges assecades i amb una coloració grogosa, les plantes de les línies que expressaven l'inhibidor MPI presentaren un aspecte sa i amb la majoria de les seves fulles i tiges verdes. Únicament la fulla per on s'havien introduït les larves presentà zones més enfosquides degudes al dany produït per la larva al penetrar la tija, conduint, en algun cas, a l'assecamment de la fulla.

### **I.1.4.2 Efectes de l'expressió del gen *mpi* en plantes transgèniques d'arròs, en el pes i el desenvolupament larvari de *Chilo suppressalis***

#### **I.1.4.2.a Larves alimentades en plantes transgèniques de la varietat Sènia**

Les larves utilitzades en el bioassaig anterior foren recuperades, després de les dues setmanes d'infestació, per tal de determinar el nombre de larves que havien assolit l'estadi de nimfa. El pes assolit per una larva de lepidòpter, com és ara *Chilo suppressalis*, determina el pas d'aquesta d'un estadi larvari a un altre, fins a l'assoliment de l'estadi de nimfa. El nombre de nimfes recuperades de les plantes utilitzades en bioassaig anterior, ens varen permetre copsar l'efecte que promou l'inhibidor MPI, en el desenvolupament larvari de *C. suppressalis*.

Una partida de larves fou recuperada després d'una setmana d'infestació per a determinar-ne l'evolució i el pes. Les larves alimentades en les línies SC84 i SC90 presentaven ja un pes mitjà del 89% i 79%, respectivament, en comparació amb les larves alimentades en plantes Sènia control. Per altra banda, després de dues setmanes d'infestació, en les línies SC84 i SC90 el percentatge de nimfes recuperades del total de larves fou del 4,9% i 0% respectivament, mentre que en les plantes Sènia no transformades el percentatge de nimfes recuperades era del 35,3%. Aquestes dades es resumeixen a la *Taula 48*.

***Taula 48:* Bioassaigs amb larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs transgèniques *ubi::mpi::nos*. S'indica el pes mitjà de larves recuperades als 7 dies i el % de nimfes recuperades als 14 dies després de la infestació. Control, plantes Sènia no transformades; SC84 i SC90, plantes Sènia *ubi::mpi::nos*.**

<b><i>Chilo suppressalis</i> alimentat en plantes transgèniques <i>ubi::mpi::nos</i></b>		
	<b>Pes mitjà de les larves als 7d</b>	<b>% de nimfes recuperades als 14d</b>
<b>Control</b>	<b>100%</b>	<b>35%</b>
<b>SC84</b>	<b>89%</b>	<b>4,9%</b>
<b>SC90</b>	<b>79%</b>	<b>0%</b>

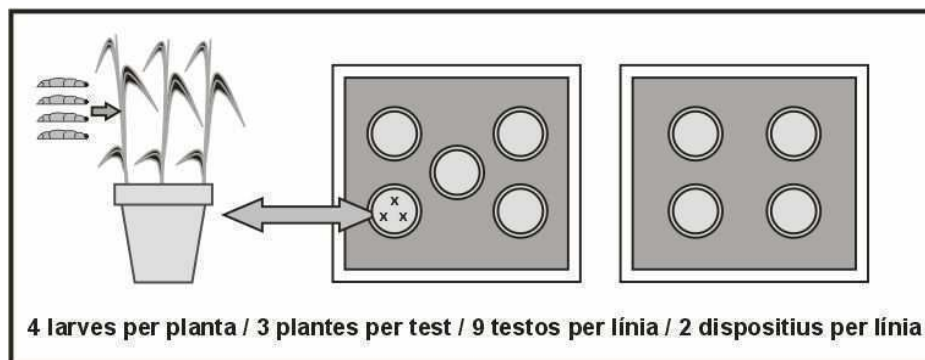
Aquest resultat ja ens indicava que el producte del transgen exercia un efecte negatiu sobre el desenvolupament de les larves de *Chilo suppressalis*.

Es va iniciar un nou bioassaig amb les plantes de la generació T3, provinents de les anteriors línies transgèniques SC84 i SC90. Així, llavors d'ambdues línies foren germinades

en presència de l'agent de selecció higromicina; les plàntules resistents foren replantades en testos i aclimatades a l'hivernacle. Es realitzaren anàlisis per immunotransferència de les diferents plantes i es seleccionaren 24 plantes, per a cada línia, que acumulaven 0,4% (línia SC84) i 0,2% (línia SC90) d'MPI en el total de proteïnes solubles; així com una talla i aspecte homogenis. Així doncs, s'infestaren les plantes amb 4 larves en estadi L2 per planta. Malauradament el material de treball d'aquest bioassaig fou destruït per l'atac ecologista als hivernacles transgènics del centre CIRAD de Montpellier (Juny, 1999) i les dades finals no pogueren ser obtingudes.

Amb llavors, corresponents a la generació T4 homozigota, germinades en presència d'higromicina, es va constituir un nou lot de plantes de les línies SC84 i SC90. En estadi de planta adulta, aquestes plantes foren analitzades per immunotransferència i es seleccionaren 27 plantes per a cada línia que presentessin els nivells esperats d'acumulació de l'inhibidor MPI (de 0,4% per SC84 i 0,2% per SC90), així com un aspecte homogeni.

Aquestes plantes (juntament amb plantes, en el mateix estadi, de la varietat Sènia no transformades) foren replantades en testos de tres en tres i aclimatades en els dispositius entomològics preparats per a la realització del bioassaig. Les plantes es separaren per línies en els diferents dispositius, establint 9 repeticions de 3 plantes per test per a cada línia d'arròs; els testos foren separats entre si per aigua evitant el contacte entre les fulles. Les plantes foren infestades manualment amb larves de *Chilo suppressalis* en estadi L2, a raó de 4 larves per planta. El dispositiu per a la realització del bioassaig es resumeix a la *Figura 49a*.

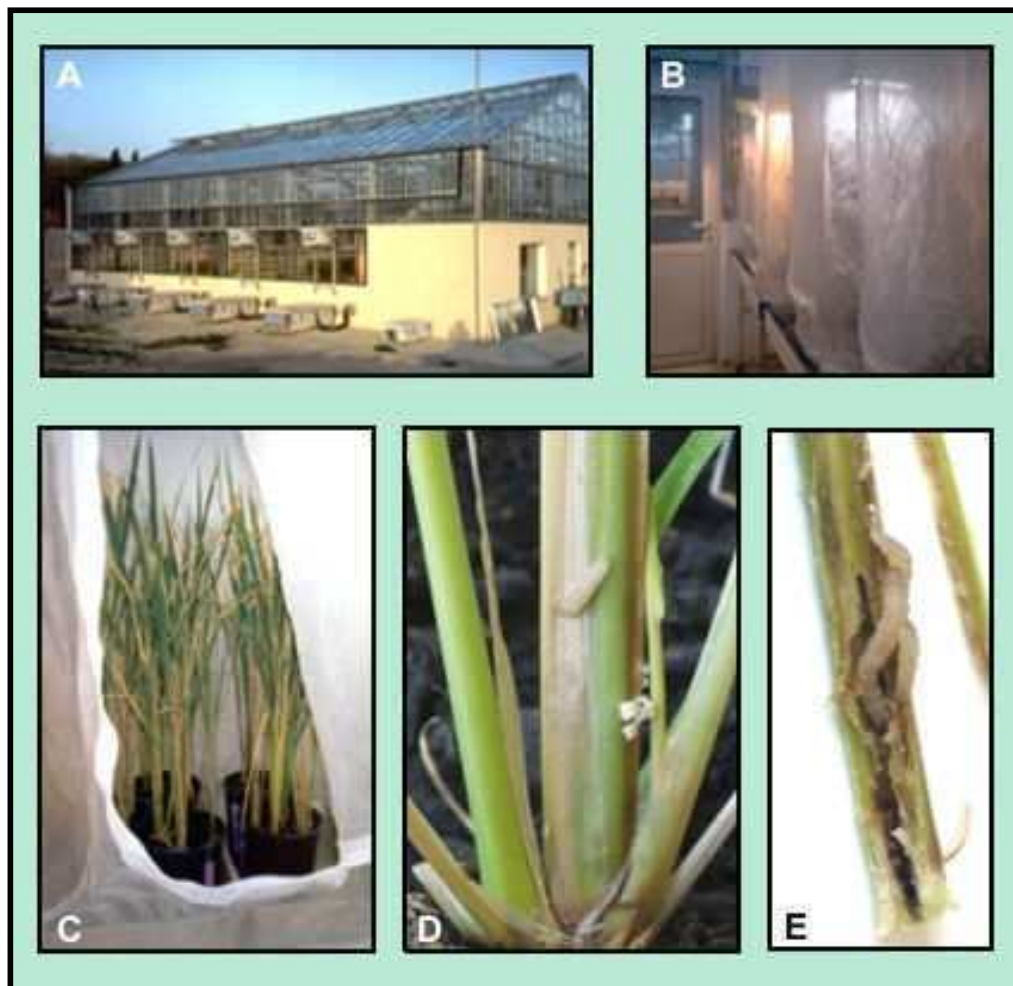


**Figura 49a:** Estructuració del bioassaig en els dispositius entomològics. Aquesta distribució es realitzà per a cada una de les línies estudiades.

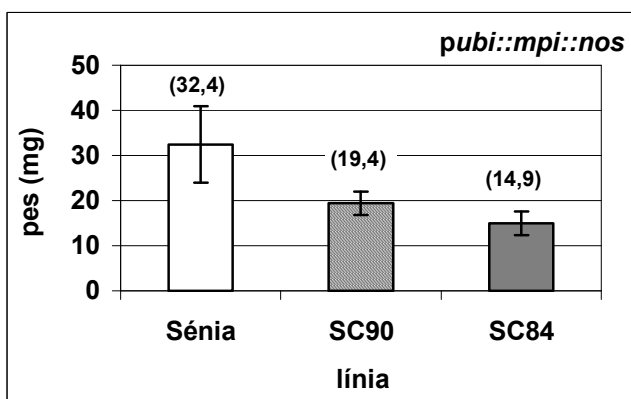
En la *Figura 49b* es mostren els dispositius entomològics utilitzats, així com l'aspecte de les plantes, després de 10 dies d'infestació amb *C. suppressalis*, i de les tiges al ser obertes per recollir les larves.

Als 10 dies després de la infestació, les larves foren recuperades de l'interior de les plantes i es pesaren individualment. Els resultats obtinguts es mostren a la *Figura 50*. A més a més, es dissecaren els intestins de totes les larves i es conservaren en solució

fisiològica (NaCl al 0,9% p/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$  per a la realització d'assaigs posteriors (determinació de les activitats proteolítiques, veure *Apartat 1.4*).



**Figura 49b:** Bioassaigs amb plantes d'arròs transgèniques i larves de *Chilo suppressalis*. A) Hivernacle per a plantes transgèniques del centre CIRAD a Montpellier. B) Dispositius entomològics amb bioassaigs en curs. C) Plantes transgèniques d'arròs *ubi::mpi::nos*, (línia SC84) 10 dies després d'infestació amb larves de *C. suppressalis*. D) Planta d'arròs infestada per larves del barrinador de l'arròs. E) Aspecte d'una tija al ser oberta per recuperar les larves.

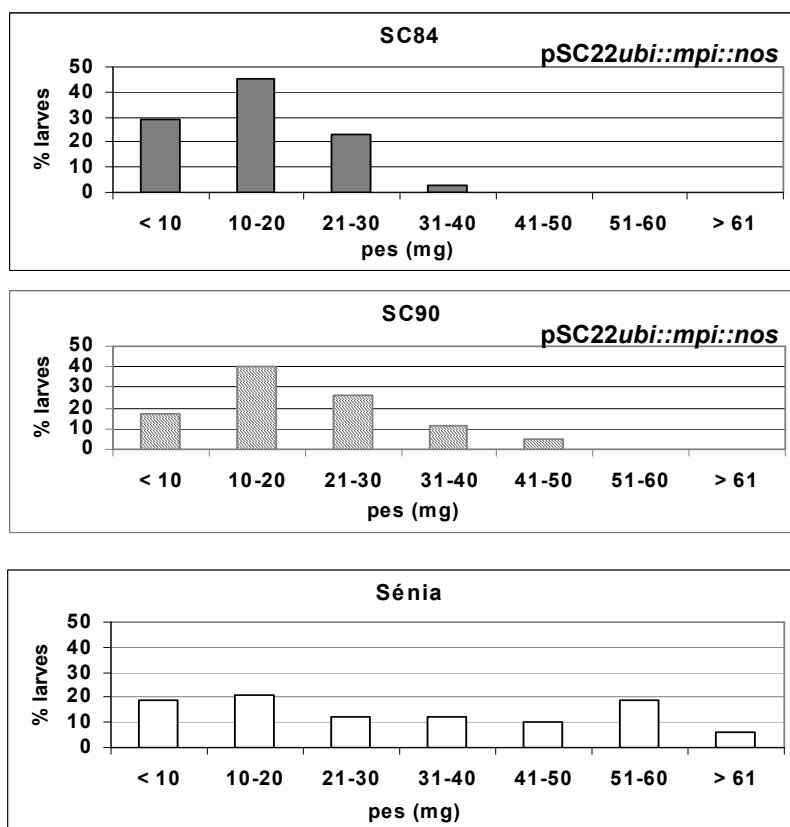


**Figura 50:** Pes mitjà de les larves recuperades de plantes transgèniques *pSC22ubi::mpi::nos* SC84, SC90 (varietat Sénia) i de plantes Sénia no transformades (generació T4). Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Entre parèntesis s'indica el pes en mg. S'indica la desviació estàndard ( $P < 0,05$ ).



Les larves alimentades en plantes transgèniques d'arròs que expressaven de manera constitutiva el gen *mpi*, mostraren una important reducció de pes respecte les larves alimentades en plantes control. Mentre que el pes mitjà de les larves alimentades en Sénia no transformades fou de 32,4 mg  $\pm$  8,4 (P<0,05), la mitjana de pes de les larves provinents de la línia SC84 fou de només 14,9 mg  $\pm$  2,6 (P<0,05). Aquesta diferència significativa de pes representa una reducció del 54% respecte les larves control. En el cas de les larves alimentades en plantes de la línia SC90, el pes mig observat fou de 19,4 mg  $\pm$  2,6 (P<0,05); el que representa una reducció del 40,1% respecte el pes de les larves control.

Es varen establir grups de pes d'una manera arbitrària, distribuint-los en intervals de 10mg de diferència entre cada grup. Estudiant la distribució de les larves recuperades en aquests grups de pes, obtinguérem els resultats que es mostren a la *Figura 51*. Les larves recuperades de plantes Sénia no transformades presentaren una distribució heterogènia, trobant-se larves de pes inferior al 10mg fins a larves de més de 61mg. Pel contrari, la distribució dels grups de pes de les larves recuperades de les línies transgèniques SC90 i SC84, resultà més restringida, i en els grups de pes més baixos.



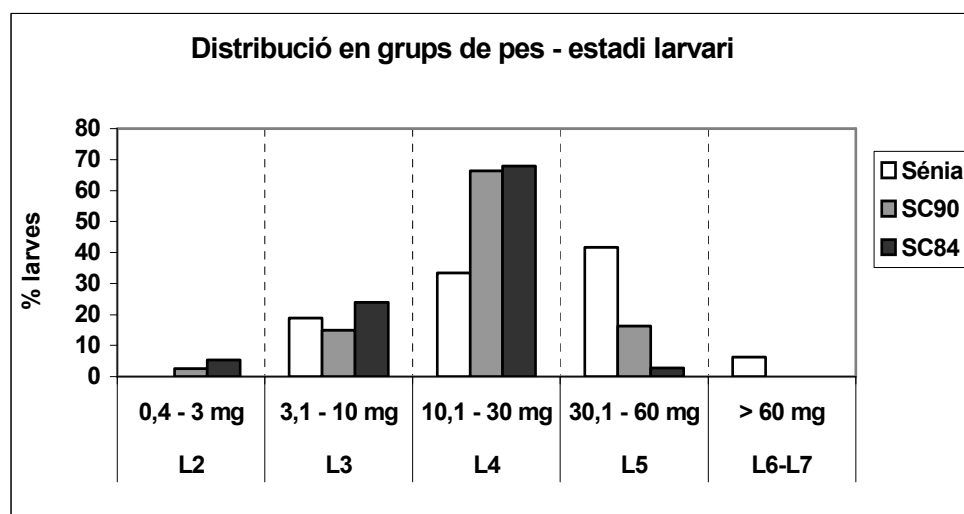
**Figura 51:** Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes transgèniques (varietat Sénia) pSC22ubi::mpi::nos (línies SC84 i SC90, generació T4) i plantes Sénia no transformades.

**transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en percentatge del total de larves recuperades per a cada línia.**

En la *Figura 52* i *Taula 53*, s'ha interrelacionat la distribució en grups pes de les larves recuperades amb l'estadi larvari. Aquesta correlació entre pes i estadi larvari es basa un estudi realitzat pel Dr. B. Vercambre del centre CIRAD de Montpellier (projecte ERRI, 2001), sobre la població de *Chilo suppressalis* habitualment utilitzada en els bioassaigs. S'observa clarament com la població de larves alimentades en plantes Sénia evolucionà normalment (no es recuperà cap individu que encara estigués en estadi L2), presentant individus en tots els grups de pes fins a estadis L6 o L7, previs a la crisalidació.

Contràriament, les dues poblacions de larves alimentades en plantes transgèniques que expressaven l'inhibidor MPI, presentaren un desenvolupament retardat que es traduí en l'absència d'individus en estadis larvaris superiors a L5. Concretament, els individus alimentats en la línia SC90 (plantes que expressaven 0,2% d'MPI) es trobaren majoritàriament en estadi L4, trobant-se una part dels individus en estadi larvari L5. Cal destacar que un 2,5% dels individus recuperats en aquesta línia no havien evolucionat més enllà de l'estadi inicial L2 (*Figura 52* i *Taula 53*).

En el cas de la població de larves alimentades en la línia SC84 (plantes que expressaven 0,4% d'MPI), la distribució de les larves en estadis larvaris s'inclina marcadament cap a estadis larvaris iguals o inferiors a L4, amb molt poques larves recuperades en L5. Els individus recuperats en aquesta línia, que no evolucionaren del seu estadi inicial L2, foren el 5,3% del total de larves recuperades.



**Figura 52:** Distribució en grups de pes–estadi larvari de larves recuperades de plantes transgèniques pSC22ubi::mpi::nos (línies SC84 i SC90, varietat Sénia) i plantes Sénia no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia. S'interrelaciona el pes en mg amb l'estadi larvari equivalent (L2 a L7).

Línia	% MPI	% larves recuperades	Estadi larvari (%)					Pes mitjà (mg)
			L2	L3	L4	L5	L6-L7	
Sénia	-	80	0	18,8	33,2	<u>41,7</u>	6,3	32,4 ± 8,4
SC90	0,2	78,7	2,5	15,1	<u>66,2</u>	16,2	0	19,4 ± 2,6
SC84	0,4	71,3	5,3	24	<u>68</u>	2,7	0	14,9 ± 2,6

**Taula 53:** Resum del bioassaig utilitzant larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs. S'indiquen els valors obtinguts per a larves recuperades després de 10 dies d'alimentació en plantes Sénia no transformades, i en les línies transgèniques SC90 i SC84 (ambdues pSC22ubi::mpi::nos, varietat Sénia, generació T4). % MPI indica el % d'inhibidor MPI detectat en el total de proteïnes solubles extretes de mostra foliar; per L2-L7 es fa referència al % del total de larves recuperades. (P<0,05).

De la Taula 53, cal comentar que el nombre de larves recuperades en les línies que expressaven l'inhibidor MPI fou inferior al nombre recuperat en les plantes Sénia control. No s'indica el percentatge de mortalitat ja que no representaria una dada significativa degut a la impossibilitat de recuperar totes les larves mortes de l'interior de les plantes (ja que al morir i assecar-se, la majoria d'elles resulten imperceptibles).

Cal esmentar que, després dels 10 dies d'infestació, totes les plantes analitzades presentaren un aspecte normal, únicament mostraren zones enfosquides a la base de les tiges, per on les larves s'havien introduït. Certes plantes, en les que hi havia panícules en creixement en el moment d'iniciar el bioassaig, varen reomplir correctament les llavors. Essent el temps d'infestació únicament de 10 dies, no s'apreciaren diferències significatives a nivell de resistència entre les línies transgèniques i les Sénia no transformades. El bioassaig fou dissenyat per poder recuperar larves vives, que a més a més de ser utilitzades per a aquest estudi, permetessin analitzar l'efecte del trasgen sobre les proteases digestives de *Chilo* (veure apartat 1.4)

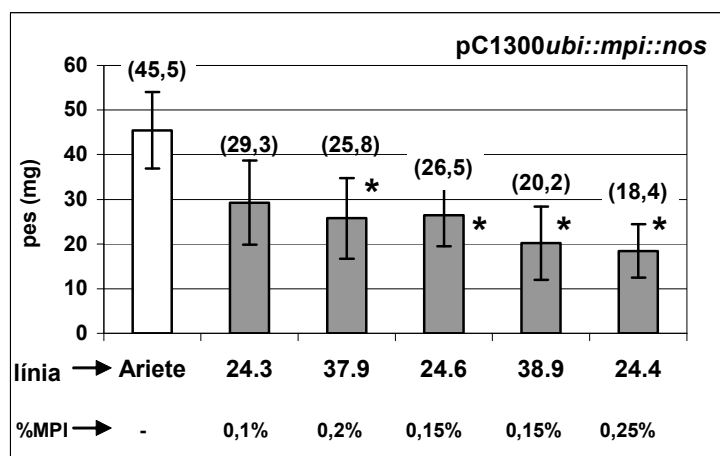
#### **1.1.4.2.b Larves alimentades en plantes transgèniques de la varietat Ariete**

Basant-nos en els paràmetres utilitzats en els bioassaigs anteriors, es procedí a realitzar un nou bioassaig amb plantes que expressaven constitutivament el gen *mpi* (pC1300ubi::mpi::nos) de la varietat Ariete (transformades mitjançant *Agrobacterium*). S'utilitzaren les línies 24.3, 24.4, 24.6, 37.9 i 38.9.

Es germinaren llavors, de la generació T1, de les diferents línies es presència de l'agent selectiu higromicina. Les plàntules resistents foren trasplantades en testos i aclimatades a l'hivernacle. En estadi de planta adulta foren analitzades per immunotransferència i es triaren 12 plantes, per cada línia, que presentessin el mateix nivell d'expressió de l'inhibidor

MPI : 0,1% per la línia 24.3; 0,15% per les línies 37.9 i 24.6; 0,2% per la línia 38.9; 0,25% per la línia 24.4.

Les plantes es separaren per línies en els diferents dispositius entomològics, establint 3 repeticions de 4 plantes per a cada línia transgènica. Així mateix, s'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a plantes control. Les plantes foren infestades manualment amb larves de *Chilo suppressalis* en estadi L2, a raó de 4 larves per planta. Després de 10 dies d'infestació, les larves foren recuperades de l'interior de les plantes i es pesaren individualment. Els resultats obtinguts en aquest bioassaig es mostren a la *Figura 54*.

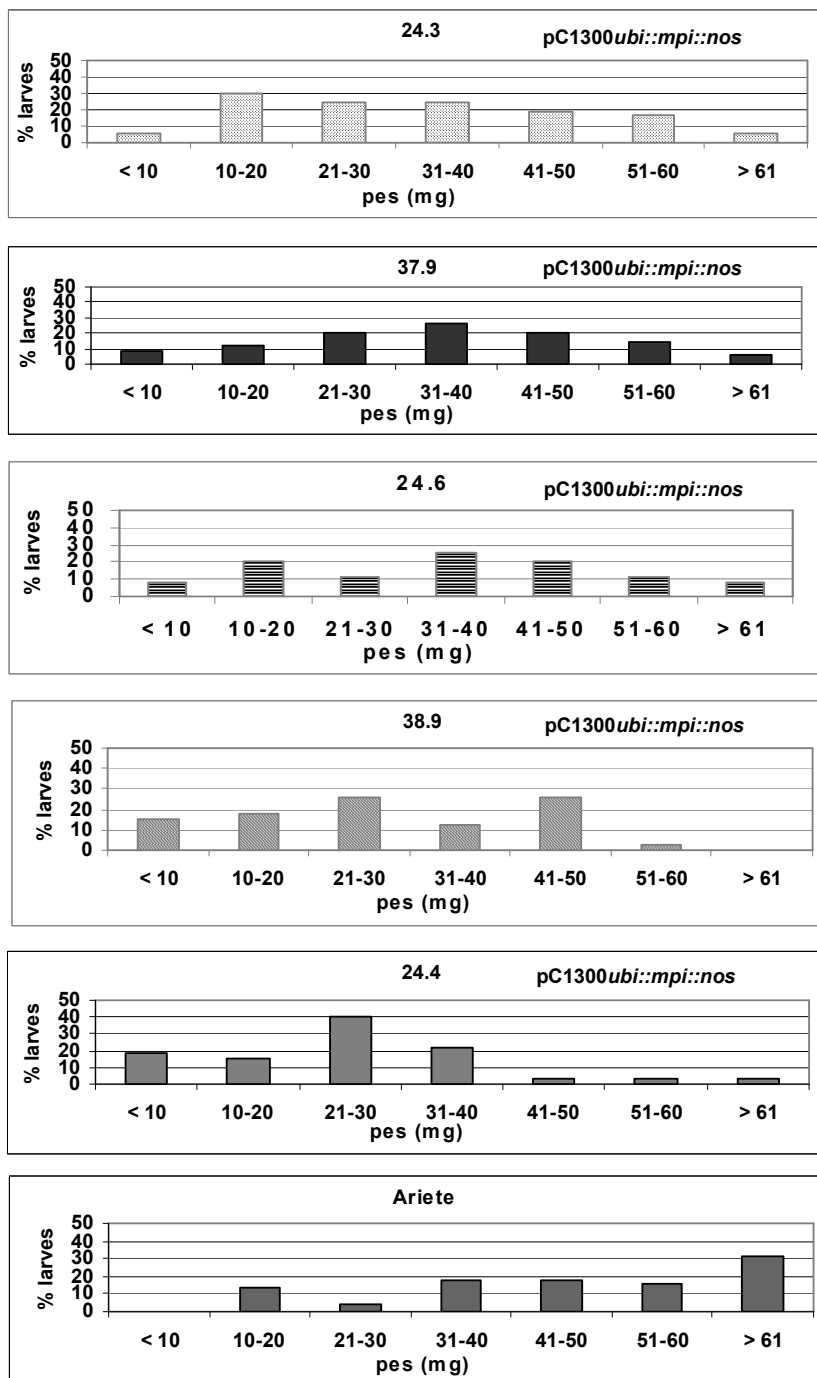


**Figura 54:** Pes mitjà de les larves recuperades de plantes d'arròs transgèniques pC1300ubi::mpi::nos (varietat Ariete) de les línies 24.3, 24.4, 24.6, 37.9 i 38.9, de la generació T1. S'indica el % d'MPI que expressaven les plantes de cada línia en el total de proteïnes solubles. S'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a controls. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Entre parèntesi s'indica el pes en mg. S'indica la desviació estàndard; (\*) indica una diferència significativa (P<0,05).

Les larves alimentades en plantes d'arròs transgèniques pC1300ubi::mpi::nos mostraren una reducció important del seu pes respecte les larves alimentades en plantes control. El pes mitjà de les larves alimentades en Ariete no transformades fou de 45,5 mg  $\pm$  8,6 (P<0,05), mentre que la mitjana de pes de les larves recuperades de les línies transgèniques fou de 25,8  $\pm$  9,0 (línia 37.9); 26,5  $\pm$  6,9 (línia 24.6); 20,2  $\pm$  8,2 (línia 38.9) i 18,4  $\pm$  5,9 (24.4); essent una diferència significativa en tots els casos (P<0,05). En el cas de les larves alimentades en plantes de la línia 24.3, que expressava l'inhibidor MPI al nivell més baix (0,1% de les proteïnes solubles), el pes mig observat fou de 29,3 mg  $\pm$  9,4 (P<0,05), essent aquesta reducció de pes no significativa.

Així mateix, l'anàlisi de la distribució en grups de pes es mostra en la *Figura 55*. Les larves recuperades de plantes control no transformades presentaren, també en aquest bioassaig, una distribució en tots els grups de pes (des de 10mg fins >61mg), amb una

important fracció de larves recuperades, dins el grup de major pes (>61mg). Les larves recuperades en les diferents línies transgèniques mostraven una distribució cap als grups de menor pes. Les línies que havien presentat una major disminució de pes mitjà (24.4 i 38.9) mostraven una distribució desplaçada a grups de pes inferiors a 50 mg.

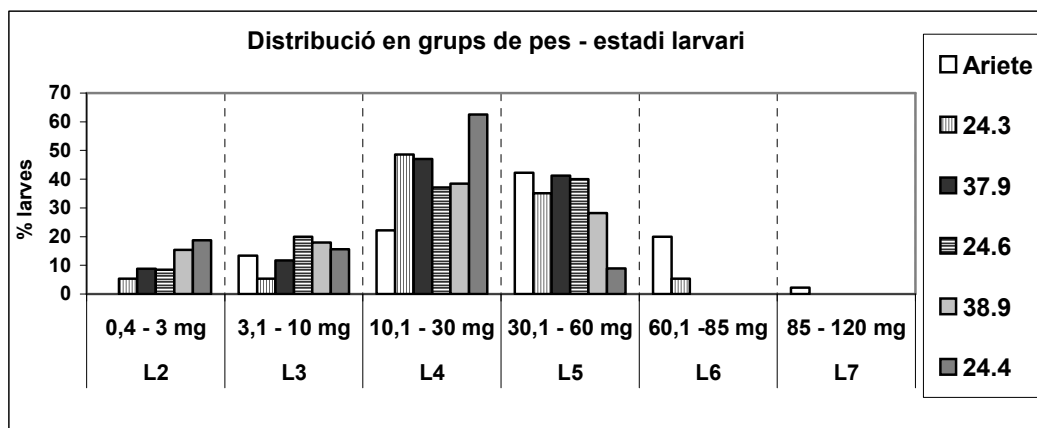


**Figura 55:** Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos T1 (línies 24.3, 37.9, 24.6, 38.9, 24.4 i varietat Ariete) i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en percentatge del total de larves recuperades per a cada línia.

Per altra banda les altres línies que presentaren una disminució de pes mitjà menys marcada (24.6 i 37.9) però igualment significativa, mostraren una distribució més àmplia, presentant més individus en grups de pes superiors a 51 mg. Les larves recuperades de la línia 24.3 (reducció de pes mitjà menor) presentaren una distribució més àmplia en tots els grups de pes.

En la *Figura 56*, s'interrelaciona els grups de pes amb l'estadi larvari. La població de larves alimentades en plantes Ariete evolucionà normalment i presentà individus en tots els grups de pes fins a l'estadi larvari L7, previ a la crisalidació. En aquesta línia control no es recuperà cap individu que encara estigués en estadi L2.

Es detectà un desenvolupament larvari clarament alentit en les larves alimentades en les línies transgèniques. Aquest alentiment es tradueix en manca d'individus en estadis larvaris superiors a L5 (línies 37.9, 24.6, 38.9 i 24.4). El cas de les larves recuperades en la línia 24.4, l'efecte és molt més dràstic ja que s'observa el màxim nombre d'individus en estadi L4, essent també molt abundants els individus que es recuperaren en el seu l'estadi inicial (L2). En la línia 24.3, on les larves no presentaren una reducció de pes mitjà tan important, es recuperaren larves encara en l'estadi inicial L2 i no es detectà cap larva en estadis superior a L6.



**Figura 56:** Distribució en grups de pes–estadi larvari de larves recuperades de plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos T1(línies 24.4, 38.9, 24.6, 37.9 i 24.3) i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia. S'interrelaciona el pes en mg amb l'estadi larvari equivalent (L2 a L7).

En la *Taula 57* es mostra el resum dels resultats obtinguts en els bioassaigs de les plantes d'arròs, varietat Ariete (generació T1), que expressen constitutivament el gen *mpi*.

Línia	% MPI	% larves recuperades	Estadi larvari (%)						Pes mitjà (mg)
			L2	L3	L4	L5	L6	L7	
<b>Ariete</b>	-	80,4	0	13,3	22,2	<u>42,2</u>	20	2,23	45,5 ± 8,57
<b>24.3</b>	0,10	77,1	5,4	5,4	<u>48,6</u>	35,1	5,4	0	29,3 ± 9,4
<b>37.9</b>	0,15	70,8	8,1	10,8	<u>43</u>	37,8	0	0	25,8 ± 9,0*
<b>24.6</b>	0,15	72,9	8,6	20	<u>37,1</u>	40	0	0	26,5 ± 6,9*
<b>38.9</b>	0,20	81,3	15,4	17,9	<u>38,5</u>	28,2	0	0	20,2 ± 8,2*
<b>24.4</b>	0,25	66,7	17,7	14,8	<u>59,0</u>	9	0	0	18,4 ± 5,9*

**Taula 57:** Bioassaig utilitzant larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs pC1300ubi::mpi::nos. S'indiquen els valors obtinguts per a larves recuperades després de 10 dies d'alimentació en plantes Ariete no transformades, i en plantes de la generació T1 de les línies 24.3, 24.4, 24.6, 37.9 i 38.9. % MPI indica el % d'inhibidor MPI detectat en el total de proteïnes solubles extretes de mostra foliar; per L2-L7 es fa referència al % del total de larves recuperades. (\*) indica una diferència significativa de pes respecte el control (P<0,05).

Tal i com s'esmentà per al bioassaig amb plantes SC84 i SC90, no s'indica el % de mortalitat ja que no representaria una dada significativa degut a la impossibilitat de recuperar totes les larves mortes de l'interior de les plantes. Tot i això, el percentatge de larves no recuperades permet fer una aproximació al nombre estimat de larves mortes. Així, cal destacar que la diferència entre el percentatge de larves recuperades en plantes control i les recuperades en la línia 24.4 fou del 14%, molt més gran que l'observat per les altres línies (0% al 11%).

En aquest bioassaig tampoc s'observaren diferències importants en l'aspecte de les línies transgèniques analitzades respecte les plantes control no transgèniques, ja que el temps d'infestació fou massa curt per a veure'n els efectes a nivell de resistència de les plantes.

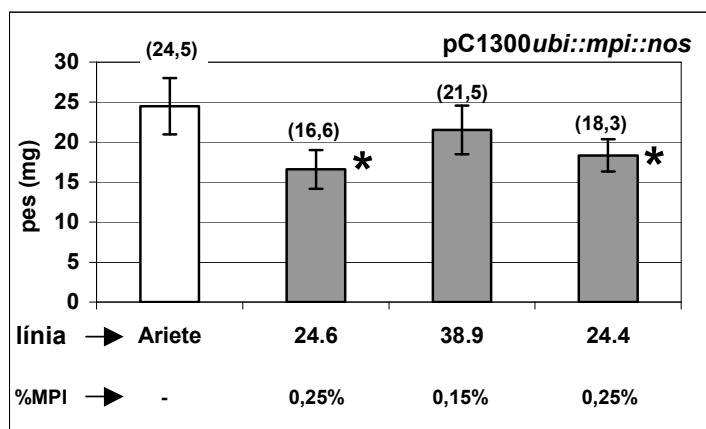
Basant-nos en els resultats obtinguts en el bioassaig anterior, seleccionarem les línies 24.4, 38.9 i 24.6 per obtenir la generació T2. Es realitzà doncs un nou bioassaig front larves del lepidòpter *Chilo suppressalis*.

Es germinaren llavors de les línies seleccionades en presència de l'agent higromicina; les plàntules resistents es trasplantaren a l'hivernacle per a la seva regeneració fins a planta adulta; posteriorment s'analitzaren totes les plantes mitjançant immunotransferència. L'acumulació de l'inhibidor MPI en extractes proteics de fulla fou de 0,25% d'MPI per les línies 24.4 i 24.6, i de 0,15% per la línia 38.9 (veure *Figura 43, Apartat 1.1.3.1*). Aquestes plantes, així com plantes, en el mateix estadi, de la varietat Ariete no transformades, foren replantades en testos de quatre en quatre i aclimatades en els dispositius entomològics per a la realització del bioassaig.

Les plantes es separaren per línies en els diferents dispositius evitant el contacte entre plantes i establint 7 repeticions de 4 plantes per a cada línia transgènica. Les plantes foren infestades manualment amb larves de *Chilo suppressalis* en estadi L2, a raó de 4 larves per planta. Després d'un període d'infestació de deu dies, les larves foren recuperades de l'interior de les plantes i foren pesades individualment.

En la *Figura 58* es mostra el pes mitjà obtingut per els diferents grups de larves.

Les larves alimentades en les línies transgèniques que expressaven 0,25% d'inhibidor MPI, línies 24.4 i 24.6, presentaren una disminució significativa del pes mitjà: 74,7% (línia 24.4) i 67,8% (línia 24.6) del pes mitjà de les larves alimentades en plantes control (25,3% i 32,2% de reducció de pes). Les larves recuperades de les plantes 38.9 presentaren una lleu disminució de pes que no resultà significativa.

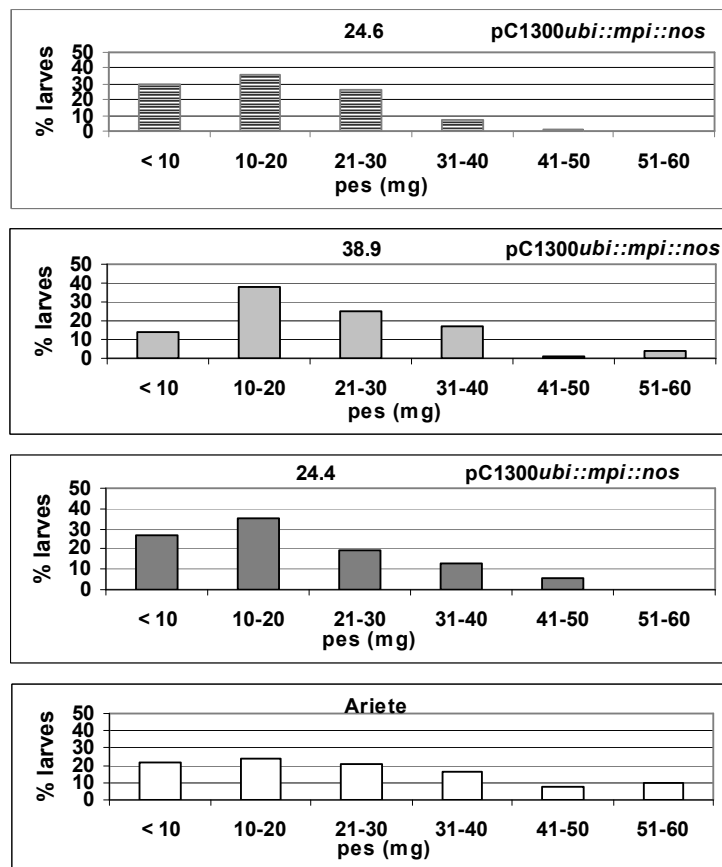


**Figura 58:** Pes mitjà de les larves recuperades de plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos (varietat Ariete) de les línies 24.6, 38.9 i 24.4, de la generació T2. S'utilitzaren plantes de la varietat Ariete no transformades com a controls. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. El pes s'expressa en mg; (\*) indica una diferència significativa ( $P < 0,2$ ).

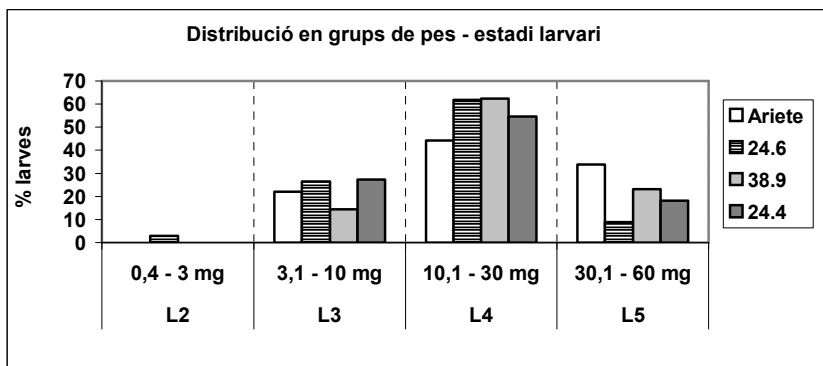
L'anàlisi de la distribució per grups de pes de les larves recuperades en aquest bioassaig es representa en les *Figures 59 i 60*.

Les larves alimentades en les plantes control no transformades es recuperaren en estadis de desenvolupament superiors a l'inicial, fins a l'estadi L5. En les línies transgèniques, la població de larves majoritària, per a les tres línies, fou en estadi L4. En la línia 24.6 també es detectà un cert nombre d'individus que no evolucionaren més enllà de l'estadi larvari inicial, L2.





**Figura 59:** Distribució en grups de pes de larves recuperades de plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos (varietat Ariete) de la generació T2 (línies 24.6, 38.9 i 24.4) i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia.



**Figura 60:** Distribució en grups de pes – estadi larvari de larves recuperades de plantes transgèniques pC1300ubi::mpi::nos T2 (línies 24.6, 38.9 i 24.6, varietat Ariete) i plantes Ariete no transformades. Les larves foren alimentades en planta durant 10 dies. Els valors s'expressen en % del total de larves recuperades per a cada línia. S'interrelaciona el pes en mg amb l'estadi larvari equivalent (L2 a L5).

En la *Taula 61* es resumeixen els valors obtinguts en el bioassaig de les línies transgèniques d'arròs, varietat Ariete (generació T2), que expressen constitutivament el gen *mpi* de blat de moro.

Línia	% MPI	% larves recuperades	Estadi larvari (%)				Pes mitjà (mg)
			L2	L3	L4	L5	
<b>Ariete</b>	-	89,47	0	22,1	44,1	33,8	24,5 ± 3,5
<b>24.6</b>	0,25	89,48	2,9	26,5	61,8	8,8	16,6 ± 2,4*
<b>38.9</b>	0,15	86,25	0	14,5	62,3	23,2	21,5 ± 3,0
<b>24.4</b>	0,25	83,70	0	27,3	54,5	18,2	18,3 ± 1,9*

**Taula 61:** Bioassaig utilitzant larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs. S'indiquen els valors obtinguts per a larves recuperades després de 10 dies d'alimentació en les línies Ariete no transformades, i en plantes de la generació T2 de les línies 24.6, 38.9 i 24.4. % MPI indica el % d'inhibidor MPI detectat en el total de proteïnes solubles extreïdes de mostra foliar; per L2-L5 es fa referència al % del total de larves recuperades. (\*) indica una diferència significativa de pes respecte el control ( $P < 0,05$ ).

Cal destacar que, en aquest bioassaig, el total de larves utilitzades (tant les alimentades en plantes transgèniques com en les plantes control) evolucionà més lentament que els bioassaigs anteriors. En aquest bioassaig només es recuperaren larves que, com a màxim, assoliren l'estadi larvari L5; mentre que en el bioassaig anterior (veure *Figura 56*) vam recuperar larves tant en estadi L6 com L7. Aquest bioassaig es va realitzar en època hivernal; s'ha pogut constatar que a l'hivern les plantes d'arròs acumulen gran quantitat d'aigua a l'interior de les tiges i això fa variar la consistència dels seus teixits. Com a conseqüència, les larves alimentades en aquestes plantes presenten un alentiment del creixement (el pes de les larves alimentades en les plantes control és menor que el de les larves control de bioassaigs anteriors), i la diferència entre les larves control i les alimentades en plantes transgèniques es fa més petita.

En aquest bioassaig el nombre de larves recuperades fou molt similar en totes les línies assajades, en tots els casos d'aproximadament el 84-90% (veure *Taula 61*); així mateix les plantes presentaren un aspecte sa amb zones reduïdes de ferida, corresponents al lloc de penetració de les larves.

Dels bioassaigs realitzats amb plantes d'arròs transgèniques que expressen constitutivament el gen *mpi* (*ubi::mpi::nos*) es pot concloure que:

- a) la sobreexpressió del gen que codifica per l'inhibidor MPI de blat de moro, en arròs, confereix protecció front larves de *Chilo suppressalis* (segons resultats mostrats a l'apartat I.1.4.1).
- b) les larves de *Chilo suppressalis* alimentades en plantes d'arròs que expressen constitutivament el gen *mpi* presenten una reducció del seu pes respecte les larves alimentades en plantes control no transformades (segons resultats mostrats a l'apartat I.1.4.2).

Així, mitjançant bioassaig amb plantes *ubi::mpi::nos* Sènia, transformades per biolística, es pogué determinar que larves de *C. suppressalis* alimentades en les línies SC90 i SC84 presentaven un 40,1% i 54%, respectivament, de reducció de pes respecte les larves alimentades en plantes control.

Els bioassaigs realitzats amb plantes *ubi::mpi::nos* de la varietat Ariete, transformades per *Agrobacterium* (generació T1), permeteren determinar que les larves de *Chilo* alimentades en plantes de les diferents línies (de 0,15% a 0,25% d'MPI en el total de proteïnes solubles) presentaven una reducció del pes d'entre el 42% i el 59,6%, respecte les larves alimentades en plantes no transformades.

## **I. 2 ANÀLISI FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *mpi* EN PLANTES D'ARRÒS**

### **I.2.1 Preparació de les construccions per a la transformació**

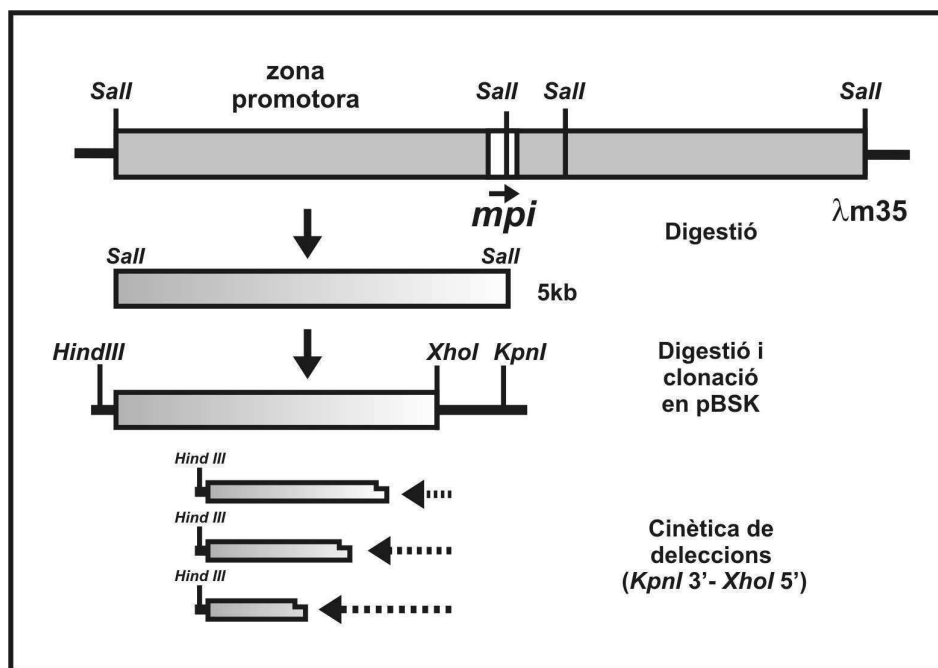
Estudis anteriors realitzats en el laboratori indicaven que l'expressió del gen *mpi* és induïda fortament mitjançant ferida mecànica i tractament amb les hormones metiljasmonat i àcid abscísic en fulles de blat de moro (Cordero *et al.*, 1994).

En la zona promotora de diferents gens vegetals, s'ha descrit l'existència de seqüències d'ADN concretes (elements *cis*) associats a resposta a jasmonat (Kim *et al.*, 1992; Rouster *et al.*, 1997; Siebertz *et al.*, 1989; Ishikawa *et al.*, 1994; Ruíz-Rivero & Prats, 1998) (veure a la *Introducció*, apartat 5.3.2). Així doncs, es va emprendre un anàlisi detallat de la regió del promotor del gen *mpi* amb l'objectiu d'identificar possibles elements potencialment implicats en la inductibilitat d'aquest gen en resposta a metiljasmonat i a ferida mecànica.

El gen *mpi* es troba dins un fragment d'ADN genòmic de blat de moro d'aproximadament 12kb, clonat en el bacteriòfag  $\lambda$  EMBL3 (anomenat  $\lambda$ m35). Per a l'anàlisi de la zona promotora del gen *mpi*, el clon genòmic inicial fou digerit mitjançant enzims de restricció per

obtenir un fragment d'ADN més curt, portador de la regió promotora del gen *mpi*. La digestió amb l'enzim de restricció *Sall* resultà ser la més adequada ja que va permetre alliberar un fragment de aproximadament 5kb, en direcció 5' de l'ADNc del gen *mpi* (veure *Figura 61*). Aquest fragment de 5kb es subclonà en el vector plasmídic pBluescript, en les dianes *HindIII* i *XhoI*. Aquesta construcció era necessària per tal de realitzar una cinètica de delecions unidireccionals, emprant com a enzims de restricció *KpnI* per 3' i *XhoI* per 5'. Aquestes delecions donaren com a resultat diferents subclons que posteriorment foren seqüenciats. Aquest procés es mostra en la *Figura 61*. El solapament de les seqüències ens permeté obtenir una seqüència d'aproximadament 4kb de la zona promotora del gen *mpi*.

Dins d'aquest fragment de la zona promotora del gen *mpi*, vàrem cercar elements descrits a la literatura com a elements *cis* involucrats en la inductibilitat de gens de defensa en resposta a metiljasmonat (o ferida).



**Figura 61:** Estratègia seguida per a l'obtenció de la seqüència nucleotídica del promotor del gen *mpi*.

La *Figura 62*, mostra la situació dels elements localitzats dins d'un fragment, d'aproximadament 2Kb, de la zona promotora del gen *mpi*. Així es localitzà, al llarg del promotor del gen *mpi*, el motiu GAGTA, descrit a la literatura com a motiu de resposta a jasmonat en patata i tomàquet (Siebertz *et al.*, 1989; Ishikawa *et al.*, 1994; Ruíz-Rivero & Prats, 1998) repetit en sis ocasions (2 motius repetits directes GAGTA, i 4 motius repetits inversos TACTC). També es localitzaren dues seqüències inverses CGTCA, descrites com a motiu de resposta a MeJA en el gen de la lipoxigenasa 1 (*lox1*) d'ordi, però en el cas del

promotor *mpi*, la distància que les separa és molt més gran que la descrita per Rouster (1997) en el gen *lox1*. Així mateix, es localitzaren dues caixes W-box ((T)(T)TGAC(C/T)), elements *cis* que permeten la unió de factors de transcripció de la família WRKY, àmpliament representada de plantes (Eulgem *et al.*, 2000). També es detectaren dues seqüències GGAAAA, corresponents a elements GT-1, descrits com a elements que permeten la unió de proteïnes nuclears del tipus GT-1 (Green *et al.*, 1988), i que s'han trobat en les regions promotores d'altres gens de defensa (Buchel *et al.*, 1996).

Amb l'objectiu de realitzar l'estudi de la funcionalitat d'aquest promotor en arròs, es va partir d'un fragment de la zona promotora del gen *mpi* que inclogués els sis motius potencialment implicats en la resposta a metiljasmonat (fragment de 1872 pb del promotor). El promotor *mpi* de 2069 pb (1872 pb del promotor + 197 pb de la zona 5' no traduïda (que inclou l'intró) que a partir d'aquí es denominarà promotor 2K) es fusionà amb el gen informador *uidA*. El gen *uidA* (a partir d'ara també l'anomenarem gen *gus*) és un gen bacterià que codifica per l'enzim  $\beta$ -glucuronidasa, capaç de metabolitzar el substrat incolor 5-bromo-4-clor-3-indolil  $\beta$ -glucurònid (X-GLU) donant, com a resultat, un compost que forma precipitats blaus. D'aquesta manera, al fusionar aquest gen a un promotor, es pot determinar i quantificar el seu patró d'expressió, ja que la coloració obtinguda és una indicació de l'expressió dirigida del gen *gus* pel promotor en estudi (Jefferson *et al.*, 1986).

Mitjançant els enzims de restricció *Scal* i *Nrul* es recuperà el fragment d'aproximadament 2kb del promotor del gen *mpi* més la zona 5' no traduïda (la seva seqüència nucleotídica es mostra a la *Figura 62*), que fou subclonat en una construcció consistent en el plasmidi pBlueScript, que contenia el gen informador *gus* i el terminador *nos* (seqüència terminadora del gen *nopalina sintasa* d'*Agrobacterium*); aquesta construcció fou anomenada p2K*mpi::gus::nos* i el seu procés de construcció s'esquematitza a la *Figura 63*.

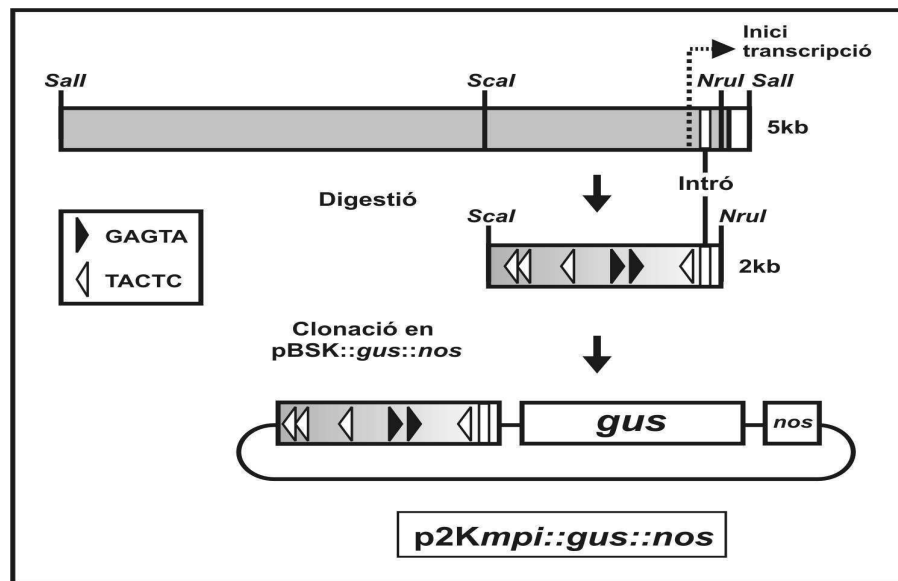
Per tal d'estudiar l'efecte de la reducció del nombre d'elements *cis* en la regió promotora del gen *mpi* potencialment implicats en la resposta a MeJA (o ferida), es realitzà a més a més una construcció que constava d'un fragment del promotor *mpi* més curt (des del nucleòtid -689 al nucleòtid +197 del gen *mpi*) que incloïa únicament un element putatiu indirecte de resposta a metiljasmonat, i la regió 5' no traduïda, unit transcripcionalment al gen informador *gus*, i al terminador *nos* (veure *Figura 64*). Aquesta construcció, que anomenarem pC1*mpi::gus::nos*, és realitzà digerint el clon genòmic  $\lambda$ m35 amb els enzims de restricció *XbaI* i *Sall*; el fragment resultant (d'1,1kb) fou de nou digerit amb els enzims *XhoI* i *Nrul*. Aquest fragment de 0,8kb, que incloïa 689bp del promotor i la zona 5' no traduïda, es clonà en una construcció consistent en el plasmidi pBlueScript que contenia el gen informador *gus* i el terminador *nos*. El procés de clonació d'aquesta construcció es mostra en la següent *Figura 64*.

```

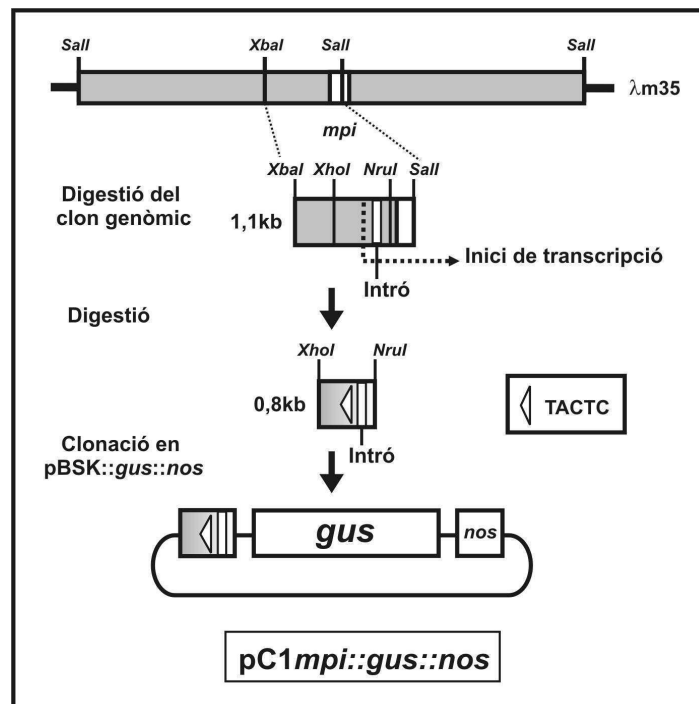
-1872 CTCAAACCTC ATGTTTTACC CTTTTACTCA AAGTTGCACT TTGTACCCTC
      CATTTCAACT CTTTTGGACT TAGTGCCTTT AAATTGCCTT CAAGTGAACC
-1772 TATGATTATA CTCATATCAA ACTAGTTAGT CAACGTTGGT GCGTTGAACA
      CTTAATCACC AAAACAGGTA GAAATGTATA TCTTGCGCAT TTCCCTTTCA
-1672 GAACATTTTG GAAACGCTGC CAATACTGCT TCTTATTCCA TTAACCCCAA
      CTGGTATGTC AACAGTGGCA CCAATGACCT TCTTACTAGC GATCTTGATC
-1572 ACCTAAGTGT CCACGAAGCG CTACACCGGC AAGGACTCCA TTTAGGTCAC
      CAGTTGCACA GGTCTGCCAA TTTCTTATAC TGGTCATTTC TTGCTTCCTG
-1472 GCTTGACTCG TCCTCTTTAC CTACTCAAATA TTTTACATGT GCCCTGGTAC
      ATGTCTGCCT ATTACATGTC TGACTCGTTT GCTTATTTGG GCTAGGGGCA
-1372 CCATAATTTT ATACCTTTTA ACATATTGAT CAAGCAGCCA TGACCGAAGA
      AAGATGCAAT CACCAAATAG CCCTTTATGA ATTAGAGTTC TAAATGGACT
-1272 ATTTTGTTGG AAAAAGTTTG GAGAACTGC AATGGGCTAG AGTTCCTAGT
      TTCGGGAACA GGGTGAGTTG TGAAATCTAT TGCTTTCTCG GAAAGACAGC
-1172 TAGTAGAACA AAGTGCTTTT GGGTTCATGA CCTCCACCAA AAGGAGGGGG
      CATGTGTTGA ACAACAAATT TGGCACTTGG ATAGTCGGAT GGTCCGGCCT
-1072 TGTGGCCCGA ACGGTCTATG CCCTGGACGA TTCGCAGGAG TAGTTCCGAA
      GGTACGCGAT TAGATTAGTT CAGGCTGGAG TCCTTATCCC ATGCGTGGTT
-972 ATCCTAACAA ACTCGGACGG AACTATTGGA TCTCGCCTAG GAATGGGTCC
      AAACCCCTCT ATATACATGA TAGGTACGAC CAAATGAGAA TACAAGATCA
-872 AATCGAAACC AATTTATTAC ATTATTTATC TTCATGCCTT AGGAGTAGAT
      GTAGTGTAGC TCTAGTTGTA GTTCCCAAAA CTCAACCTTG ACCTCTTTAG
-772 CTCTACGTCA TCTAGAGGTG CTTTAGGTGG CTTGTTGATA TCAAACAAC
      CCTATGATCT CTTCTCCCGC ACGGGGTCCT CGAGAGACGA TATTTAGGTT
-672 CTACACAAAA CCCTCTACGG CATCGTGGAT GGTCCACCAC CTACAAGTGG
      ACGGTCCACG CGCCTGCAGA GAAGAGCATA GTTATTTGCT CCATGGTGAC
-572 CTACACGCGA ACGGTCCAGT GACCTATCAC GAACCGTCA GCACCTTGCA
      GAGAGGTCTC CAAGGTCTCG ACTACTCATG AGCGGAATCT AGTGATTATT
-472 GGTGTTTAGC GCAAAAACGG CGCCAACAGT AGGTTTTACG TCGAAGTAA
      GATGGAGGGT CATAGAGTTT AAGATATAGA AATTGACAGA TTCCTCCTAT
-372 TGTGGATAA CTCGGCGGAT TTTGTTGAGA TTGATTTAGA CCATTTTCAC
      ACATATCAG ATGCCGATCC TAGCTAATGG CCAGAATCTG AGAAACAAC
-272 ACCCCGAAAC GTACAGCGGT GGGCGAGGTG GTTAGGTCAC TGTTCCACCGA
      GTTTTGATAA GTTTCTGTCC GCGTCAGCGC CACTACGCGC GCTGGAAAAT
-172 GCTGACTATT TGGGCTGCAA GCATGGGATA ACCATGGATT TTTTTTCCTG
      CAGTGTGCT ATCTGTCTT TGTTCGTAG TGGCTGTTA TCCTCGTGTG
-72 CCTCGCGTGC GTATATACAC ACACGTCTG CCTGCACGCA ACGCAGCTCT
ATAAATACCT CATCACGGT GCaCTCGCTT AATATATATC CAACAACCAG
+29 CAGTGCAACA AGCAAGATTT ACCTGCCCGT GAGTGTGCCT TTCAATAATA
      TAATGTCTTA TTTTATTATT ATGTTTTTGC AGTGATAGTA GTCTGTAATA
+129 AATCTCTCCT TTCAATATAT ATAATTACCA TGCCAGATCG ATCATATCGT
      CAACTGGTCC GGCAGTTCGC GACACCATG

```

**Figura 62:** Seqüència de la zona 5' del gen *mpi* (promotor i regió 5' no traduïda). S'indiquen els motius potencialment implicats en resposta a Jasmonat: en vermell, motius repetits directes GAGTA i motius repetits inversos TACTC; en taronja, motius inversos CGTCA. També s'indiquen: en verd les caixes W-box (CTTGACT) i, en blau, elements GT-1 (GGAAAA). En negreta, caixa TATA; doble subratllat, diana de restricció *Nru*I; subratllat, ATG. Les xifres indiquen la distància de l'inici de transcripció putatiu (en minúscula). Veure el text per explicació detallada dels diferents elements.



**Figura 63:** Obtenció de la construcció p2Kmpi::gus::nos constituïda per 2kb de la zona promotora i zona 5' no traduïda del gen *mpi*, seguit del gen informador *gus* i el terminador *nos*. S'indiquen els motius putatius de resposta a metiljasmonat directes ▶, GAGTA, i indirectes ◀, TACTC.



**Figura 64:** Obtenció de la construcció pC1mpi::gus::nos constituïda per 0,8kb de la zona promotora del gen *mpi* i regió 5' no traduïda, seguit del gen informador *gus* i el terminador *nos*. S'indica el motiu putatiu de resposta a metiljasmonat indirecte ◀, TACTC.

## **I.2.2 Transformació de plantes d'arròs**

Es realitzaren la transformació de plantes d'arròs amb les construccions del gen informador *gus* sota del promotor del gen *mpi*, fragment llarg (-1872 a +197, construcció p2K*mpi::gus::nos*) i fragment curt (-689 a +197, construcció pC1*mpi::gus::nos*). Aquestes plantes transgèniques ens permetrien determinar la funcionalitat d'aquest promotor de blat de moro en arròs així com estudiar la inductibilitat del promotor *mpi* en resposta a ferida i l'expressió en diferents teixits.

La transformació es realitzà en plantes d'arròs de la varietat Taipei 309 en el laboratori del Dr. Emmanuel Guiderdoni, del centre CIRAD-Montpellier, i en arròs de la varietat Sénia al laboratori de la Dra. Quima Messeguer, del centre IRTA-Cabrils.

S'utilitzà el mètode de bombardeig de microprojectils o biolística, per co-bombardeig de dos plasmidis, el plasmidi amb el gen d'interès junt amb un altre plasmidi que conté un gen de selecció (pILTAB227, que conté el gen *hph* que codifica per la resistència a l'higromicina).

Juntament amb aquestes construccions, es transformà també amb una altra construcció que consistia en el gen informador *gus* sota control del promotor constitutiu del gen de l'*Ubiquitina 1* de blat de moro (promotor seguit del primer intró i el primer exó del gen *ubi*). Aquesta construcció fou anomenada *pubi::gus::nos*.

Així es transformaren callus embriogènics d'arròs de les dues varietats d'arròs i foren seleccionats mitjançant medis selectius amb higromicina.

## **I.2.3 Anàlisi de les plantes transgèniques**

De les experiències de transformació realitzades amb la varietat Taipei T309, s'obtingueren 21 esdeveniments transformats independents per a la construcció p2K*mpi::gus::nos*, i 10 esdeveniments per a la construcció pC1*mpi::gus::nos*. Aquests callus transformats foren regenerats i es féu un seguiment de l'expressió GUS en diferents etapes del desenvolupament; així per a la construcció p2K*mpi::gus::nos*, el 9,5% de les línies regenerades transferides a hivernacle presentaren expressió GUS; per a la construcció pC1*mpi::gus::nos* fou el 30% de les línies transformades que expressaren la proteïna GUS (Breitler, 1999).

La transformació de callus d'arròs de la varietat Sénia, donà com a resultat 27 transformants independents. L'anàlisi de l'expressió GUS en plantes transformades i aclimatades a l'hivernacle permeté detectar expressió GUS en fulla en el 25% de les línies analitzades. Les línies seleccionades es mantingueren als hivernacles i s'obtingueren les generacions següents, que foren analitzades tal i com s'indica a continuació.



### **I.2.3.1 Anàlisi de l'ADN genòmic de les línies seleccionades**

Les línies seleccionades de les construccions pC1*mpi::gus::nos* i p2K*mpi::gus::nos*, de la varietat Taipei i transformades mitjançant la tècnica de bombardeig, s'analitzaren mitjançant transferència d'ADN. Es va digerir 5 µg d'ADN genòmic, prèviament extrets i quantificats de fulles de plantes d'ambdues construccions, amb els enzims de restricció *Kpn I* i amb l'enzim *Pvu II* (que allibera el cassette sencer).

L'anàlisi de les línies C1::*gus::nos* i 2K::*gus::nos*, utilitzant com a sonda la seqüència codificant del gen *gus*, ens va permetre l'estudi del nombre d'integracions per a ambdues construccions; l'esquema dels fragments resultants de les digestions de l'ADN genòmic amb els diferents enzims de restricció, així com un exemple del resultat de la hibridació amb la sonda *gus* per a les línies C1.46 i 2K.33, es mostren a la *Figura 65*.

Per a la línia C1.46, portadora de la construcció C1-*gus-nos*, s'observà la integració de múltiples còpies del transgen (4-6 integracions); per altra banda, la línia 2K.33, portadora de construcció 2K-*gus-nos*, mostrà un perfil d'integració més senzill (una o dues integracions).

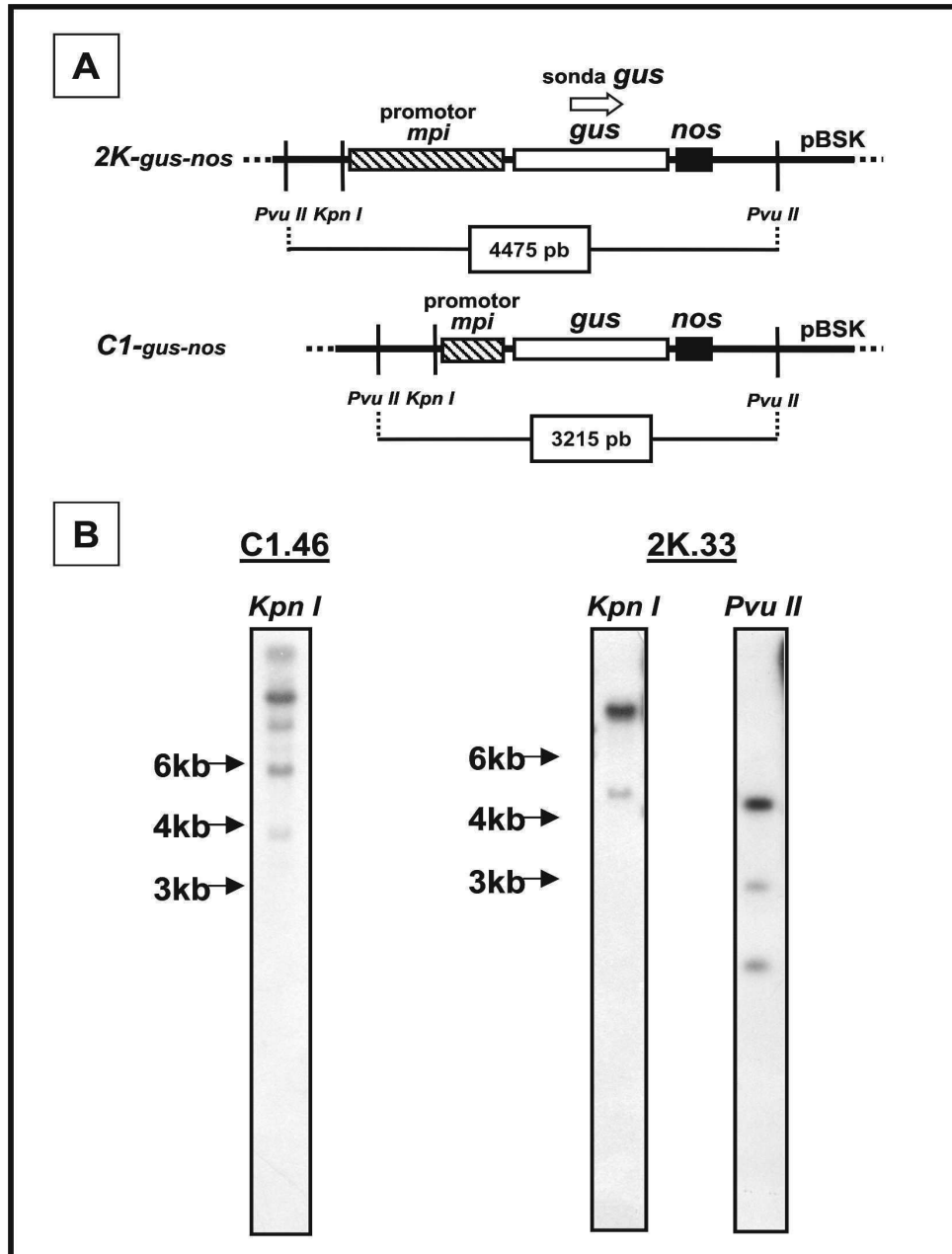
### **I.2.3.2 Anàlisi histoquímic de l'expressió del gen *uidA* (enzim GUS) en plantes transgèniques**

Es realitzaren diferents tests histoquímics per localitzar l'activitat GUS dirigida pel promotor del gen *mpi* de plantes d'arròs transgèniques (generació T2), així com estudiar la inductibilitat del promotor *mpi* i l'expressió en diferents teixits. Les plantes analitzades foren:

- Varietat Taipei T309:
- plantes *pubi::gus::nos*
  - plantes pC1*mpi::gus::nos*: -689/+197 del promotor *mpi*,  
línia 46 (1 motiu invers de resposta a metiljasmonat)
  - plantes p2K*mpi::gus::nos*: -1871/+197 del promotor *mpi*,  
línia 33 (2 motius directes i 4 motius inversos de resposta a metiljasmonat)
  - plantes control sense transformar
- Varietat Sènia:
- plantes p2K*mpi::gus::nos*: -1871/+197 del promotor *mpi*,  
línia 16.1 (2 motius directes i 4 motius inversos de resposta a metiljasmonat)
  - plantes control sense transformar

Els assaigs es realitzaren sobre 4 plantes per cada una de les línies citades, en l'estadi de 3-4 fulles. Les mostres de teixits es submergiren en substrat X-GLU i foren sotmeses al

buit, seguidament s'incubaren a 37°C durant 2 hores. Es retirà el substrat i es procedí a fer rentats amb etanol al 70% i al 90%. Finalment, les mostres foren examinades amb lupa binocular i es prengueren fotografies representatives per a cada assaig i línia analitzada.



**Figura 65:** Anàlisi per Southern blot del perfil d'integració del transgen C1::*gus*::*nos* i 2K::*gus*::*nos*, plantes Taipei. A) Esquema de les construccions i fragments derivats de la digestió amb els enzims de restricció *Kpn*I i *Pvu*II. B) Resultat de la hibridació per les línies C1.46 i 2K.33, utilitzant la sonda *gus* i els enzims de restricció *Pvu*II i *Kpn*I. S'utilitzaren 5µg d'ADN genòmic extret de fulles.