



**Desenvolupament d'un mètode per a la determinació de la
fitotoxicitat de pèptids antimicrobians**

Treball de fi de carrera d'Enginyeria Tècnica Agrícola especialitzada en Indústries
Agràries i Alimentàries de la Universitat de Girona

Realitzat per Laia Torramadé Pons sota la direcció de la Dra. Anna Nadal i la Dra.
Maria Pla

Vist i plau de,

Dra. Anna Nadal

Dra. Maria Pla

AGRAÏMENTS

Voldria expressar el meu agraïment:

En primer lloc a la tutora del meu projecte, Dra. Anna Nadal. Per la seva direcció i orientació en aquest projecte, i sobretot per la dedicació del seu temps i esforç com també per tot el que m'ha ensenyat i les facilitats que m'ha proporcionat en el transcurs de les diferents etapes d'aquest projecte.

Agrair també a la Dra. Maria Pla, directora del grup de recerca de Tecnologia Alimentària, per a donar-me la possibilitat de realitzar el treball en el seu equip i ajudar-me en totes les qüestions que he tingut el llarg del projecte.

També agrair a Núria Company i Sílvia per haver-me ajudat en diversos dels assajos realitzats durant el projecte.

També agrair a l'Esther Badosa per haver-me ajudat amb l'assaig d'infiltració en plantes de tabac.

Agrair a tots els membres del grup de Patologia Vegetal com de Tecnologia Alimentària per haver-me deixat utilitzar el seu material i laboratoris, i sobretot per crear un bon ambient de treball.

I finalment agrair a tota la meva família i amics pel seu suport i ànims constants.

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ANOVA	Anàlisi de la variància
ARN	Àcid ribonucleic
Ig	Immunoglobulina
LPS	Lipopolisacàrids
MG	Genèticament modificat
MIC	Concentració mínima inhibidora
MS	Medi Murashige i Skoog
o / n	“over – night” (unes 8 hores)
OMG	Organisme modificat genèticament
PAM o AMP	Pèptid antimicrobià
Rpm	Revolucions per minut
SD	Desviació estàndard
VHS	Virus de la immunodeficiència humana
2,4-D	2,4-Acid Diclorofenoxiacètic

ÍNDEX

I.	Introducció	1
	I.1. Pèptids antimicrobians (PAMs), 2	
	I.1.1. Aplicacions dels PAMs, 6	
	I.1.2. Cecropina A, 9	
	I.1.3. PAMs sintètics, 10	
	I.1.4. Síntesi química dels PAMs, 11	
	I.2. Plantes transgèniques, 12	
	I.3. Plantes transgèniques com a biofactories, 14	
	I.3.1. Plantes transgèniques com a biofactories que expressen PAMs, 16	
II.	Antecedents i objectius	17
	II.1. Antecedents, 18	
	II.2. Objectius, 21	
III.	Material i mètodes	22
	III.1. Material biològic, 23	
	III.1.1. Calls, 23	
	III.1.1.1. Medis per a la formació/manteniment dels calls d'arròs, 24	
	III.1.1.2. Tècniques de manipulació de calls, 24	
	III.1.2. Llavors, 24	
	III.1.3. Plantes de tabac, 24	
	III.2. Protoplasts, 25	
	III.2.1. Obtenció de protoplasts de call d'arròs, 25	
	III.2.2. Test de fitotoxicitat de PAM en protoplasts, 27	
	III.3. Germinació de llavors amb presència de PAM, 29	
	III.3.1. Desinfecció de les llavors, 29	
	III.3.2. Preparació de les dilucions de pèptids, 30	
	III.3.3. Assaig del test de germinació de les llavors, 31	
	III.4. Assaig de la fitotoxicitat de PAM en tabac, 32	
	III.4.1. Preparació dels pèptids, 32	
	III.4.2. Infiltració dels pèptids en les fulles de tabac, 33	
	III.5. Anàlisi estadística, 34	
IV.	Resultats i discussió	35
	IV.1. Determinació de la fitotoxicitat de PAMs mitjançant protoplasts, 36	
	IV.2. Determinació de la fitotoxicitat de PAMs mitjançant el test de germinació, 39	
	IV.3. Determinació de la fitotoxicitat de PAMs mitjançant plantes de tabac, 44	
V.	Discussió general	48
VI.	Conclusions	53
VII.	Bibliografia	55

I.INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

I.1 PÈPTIDS ANTIMICROBIANS (PAMs)

Els microorganismes són sistemes biològics unicel·lulars que es troben arreu en la natura, incloent molts hàbitats. La immensa majoria d'ells no són perjudicials i molts tenen un paper clau en la biosfera, descomponent la matèria orgànica, mineralitzar-la i fent-la assequible de nou als productors, tancant així el cicle de la matèria.

No obstant, hi ha microorganismes potencialment patògens per molts éssers vius que causen importants malalties. Tant plantes com animals han demostrat l'existència desenvolupant mecanismes de defensa contra aquests microorganismes patògens els quals varien en funció del grau evolutiu de l'organisme. De fet, en totes les classes de vida animal i vegetal, s'ha demostrat l'existència d'un mecanisme de defensa conegut com *immunitat innata* (Boman, 1996), resposta no específica i immediata en defensa d'un hoste de les infeccions causades per altres organismes.

Dins d'aquest sistema s'hi ha identificat molècules amb especificitat cap a components de la paret cel·lular microbiana tals com, lipopolisacàrids (LPS) de bacteris Gram-, glicolípid de microbacteris, l'àcid lipoteicoic de bacteris Gram+, beta-glucans de llevat i dobles cadenes de ARN viral, entre altres (Boman 2000). Des de ja fa uns anys, s'han descrit diverses molècules resultants del mecanisme d'acció contra patògens, entre les quals s'hi troben proteïnes de baix pes molecular (menors a 10 kDa) d'origen divers tals com, humà, plantes, invertebrats marins, amfibis, peixos i microorganismes. Són els pèptids antimicrobians (PAMs), un dels elements de la *immunitat innata* que tenen un paper crucial en el combat de les infeccions.

Els PAM són petites seqüències peptídiques d'entre uns 13 i 50 aminoàcids codificats en el genoma de l'organisme, distints d'altres substàncies antimicrobianes produïdes a partir d'enzims com és el cas de la penicil·lina. Es caracteritzen per ésser molècules molt catióniques degut al seu elevat contingut en lisina i arginina que confereix a la molècula una càrrega neta positiva (Hancock i Diamond 2000). Tenen més del 50 % dels aminoàcids amb tendència hidrofòbica, però tot i així es considera una molècula amfipàtica amb capacitat d'adoptar estructures secundàries i terciàries (Boman 2003), que els hi confereix una estabilitat en ambients aquosos i hidrofòbics.

S'acostumen a sintetitzar en els teixits epitelials en què hi ha una exposició regular de microorganismes, de manera ràpida i amb un cost metabòlic baix. Es troben disponibles per a actuar immediatament en quan les cèl·lules s'estimulen per contacte amb un ampli ventall de microorganismes com bacteris, virus i fins i tot protosaures.

Fins al moment, s'han descrit prop de 1000 PAM provinents de diversos organismes incloent humans, plantes, invertebrats marins, amfibis, peixos i microorganismes – (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). A pesar de la diversitat d'origen i les modificacions evolutives, els PAM han pogut ser classificats segons la seva seqüència, funció i estructura (Boman, 1995; Hwang, 1990).

A la següent taula I.1, hi ha citats els PAM més representatius.

Taula I.1: Classificació de pèptids antimicrobians naturals. Extret de Pérez i Albores (2002) i complementat de Vizioli i Salzet (2002)

Origen	Tipus	Activitat	Referència
<u>Plantes</u>			
Thionines	Defensina	Fongs i bacteris	Broekaert <i>et al.</i> , 1995
Heveïnes i Knottines	Defensina	Fongs i bacteris Gram ⁺	Broekaert <i>et al.</i> , 1995
Circulines A i B	Modificat	Antiviral	Tam <i>et al.</i> , 1999
<u>Insectes</u>			
Cecropines	Hèlix- α	Bacteris Gram+	Boman <i>et al.</i> , 1995
Defensines (varis)	Defensina	Bacteris Gram+	Gillespie <i>et al.</i> , 1997
Apidaecina	Alt contingut en prolina	Bacteris Gram-	Hetru <i>et al.</i> , 1998
Royalisina	Alt contingut en prolina	Bacteris Gram –	Hetru <i>et al.</i> , 1998
Atacines	Alt contingut en glicina	Sinergista	Gillespie <i>et al.</i> , 1997 Hetru <i>et al.</i> , 1998
Drosomicina	Defensina	Fungicida	Gillespie <i>et al.</i> , 1997 Hetru <i>et al.</i> , 1998
<u>Invertebrats marins</u>			
Defensines (varies)	Defensina	Ampli espectre	Saito <i>et al.</i> , 1995
Penaeïdinas	Defensina	Bacteris Gram-	Destoumieux <i>et al.</i> , 1997

<u>Vertebrats</u>			
Magainines	Hèlix α	Ampli espectre	Schröder, 1999
Defensines alfa	Defensina	Ampli espectre	Evans y Harmon, 1995
Defensina beta	Defensina	Ampli espectre	Evans y Harmon, 1995

En la actualitat es coneixen 5 grups de PAM que segons les seves característiques de seqüència i estructura es poden classificar en: 1) Hèlix- α , 2) Fulla- β , 3) Alt contingut en cisteïna, 4) Alt contingut d'un aminoàcid i 5) presència d'aminoàcids modificats.

Els pèptids hèlix- α adopten aquesta conformitat quan es troben en solvents orgànics, això explica el nivell d'acció que adopten enfront la membrana. L'hèlix presenta una superfície hidrofòbica i una altra altament positiva que permet interactuar amb els lípids de les membranes (Boman, 1995). En aquest grup hi pertanyen les cecropines i les magainines.

En els fulles- β , al tenir aproximadament uns 20 residus i un parell d'enllaços de disulfur es produeix una estabilitat en l'estructura antiparal·lela.

Els pèptids rics en cisteïna més característics són les defensines. Aquestes es poden agrupar en diversos grups en funció de la localització de la cisteïna.

Els PAM amb alt contingut d'un aminoàcid, com pot ser el triptòfan, la prolina o la histidina proporcionen una bona estabilitat enfront els fosfolípids. És el cas de les apidaecinas. Finalment, els PAM d'origen microbià, produïts per bacteris i fongs, es caracteritzen per a tenir certs aminoàcids modificats.

L'especificitat dels pèptids antimicrobians així com l'activitat que adquireixen està directament relacionada amb les propietats estructurals que els hi afecten.

Les característiques més rellevants dels PAMs són el baix potencial de resistència, l'àmplia activitat espectral i els múltiples mecanismes d'acció.

Mecanismes d'acció antimicrobiana

L'estructura que adopten els PAMs permet la interacció amb les membranes carregades negativament dels diferents microorganismes tals com virus, bacteris o fongs mitjançant un mecanisme de dany que s'inicia per interaccions electrostàtiques amb l'objectiu de combatre gran varietat de microorganismes (Van der Biezen, 2001).

El mecanisme d'acció dels PAMs amb estructura hèlix- α ha estat objecte de nombrosos estudis en els darrers anys.

L'acció antimicrobiana es basa en la permeabilització i/o disrupció de la membrana que condueix a la mort de la cèl·lula. Es coneixen altres mecanismes que actuen en diversos PAMs com la interferència en la síntesi d'enzims metabòlics o del DNA, però el model que explica millor l'activitat de la gran majoria dels PAMs coneguts és el model de Shai-Matzusaki-Huang.

Aquest model proposa la interacció del pèptid amb la membrana, quan hi ha una quantitat suficient de pèptid acumulat, de lípids són desplaçats, provocant alteracions en la membrana, que en alguns casos permet al pèptid introduir-se dins la cèl·lula diana (Zasloff 2002).

Un altre possible mecanisme d'acció és el model de formació de porus i canals que afavoreix l'alliberament del contingut citoplasmàtic i comporta a la lisis cel·lular (Christensen et al., 1988; Shai, 1995)

En general, s'ha proposat que el mecanisme d'acció dels PAMs segueix els següents passos:

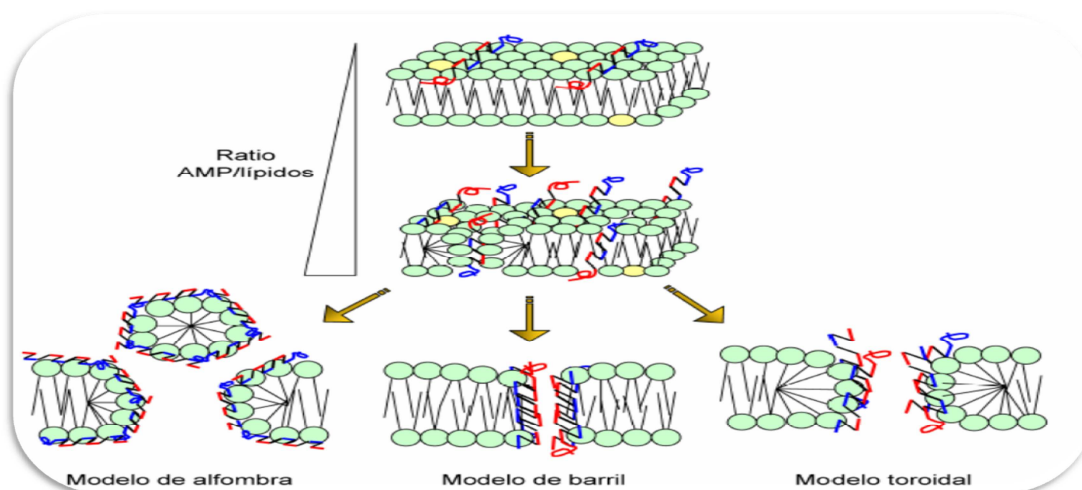


Figura I.2: Mecanismes d'acció dels PAMS.

1.- Unió del PAM i els àcids fosfolipídics de les membranes microbianes mitjançant forces electrostàtiques (en bacteris Gram-, els PAMs tenen afinitat amb els àcids fosfolipídics, mentre que en bacteris Gram+, l'afinitat és amb els polisacàrids).

Quan la concentració relativa del pèptid i el lípid de la membrana és baixa, el pèptid tendeix a orientar-se paral·lelament a la membrana i és inactiu.

2.- Quan la concentració local relativa dels PAMs augmenta, els PAMs tendeixen a posicionar-se perpendicularment a la membrana i s'introdueixen al seu interior. La capacitat d'acceptació de la membrana per una major quantitat de pèptid dependrà de la seva composició lipídica i de les propietats fisicoquímiques de la mateixa. Això explica els diferents graus de susceptibilitat d'una cèl·lula per un determinat PAM i la especificitat cap a certs bacteris.

3.- Finalment, la inserció dels pèptids en la bicapa lipídica, altera la permeabilitat de la membrana o bé condueix a la lisi cel·lular per la presència de porus. (Huang, 2000; Matzusaki, 1998; Nissen-Meyer i Nes, 1997; Shau, 1998)

Tot i que els mecanismes d'acció dels PAMs deixen a entendre que la inducció de resistències en els patògens sigui poc probable (requeriria canvis dràstics en la composició i/o conformació de la membrana externa del patogen, l'alliberació de proteïnes inhibidores o la degradació de les proteases), se n'han descrit alguns casos (Nizet, 2006).

I.1.1 Aplicacions dels PAMs

Tal com s'ha comentat, degut al seu mètode d'acció els PAM poden combatre una gran varietat de microorganismes. Així doncs, els pèptids antimicrobians poden tenir diverses aplicacions des de l'àmbit industrial, terapèutic o fitosanitari. A continuació se'n descriuen algunes de les més interessants.

Algunes aplicacions d'interès alimentari són l'ús de soques productores de PAMs en aliments amb la finalitat d'inhibir el desenvolupament de patògens. Les substàncies anomenades bacteriocines, produïdes naturalment per certes espècies bacterianes poden ser utilitzades com a substituïts de conservants tradicionals en la indústria alimentària ja que tenen la capacitat de reducció o eliminació de certs microorganismes de deteriorament i alguns patògens com *Listeria monocytogenes* (Joerger, 2003; Ogunbanwo et al, 2003). Durant els últims anys, el consumidor s'ha tornat més exigent respecte a la qualitat i expectatives d'un producte saludable i fresc i per tant la tendència és eliminar l'ús dels conservants i obtenir productes més naturals. Les bacteriocines són una via considerada benèfica per a la salut i la producció d'aliments. Fins ara, els estudis s'han centrat en bacteriocines produïdes per bacteris làctics, degut a la seva àmplia aplicació en productes làctics i fermentats (Visan et al, 2005). Dins d'aquest grup, la nisina és la més estudiada i la única autoritzada en alguns països per la *FDA-Codex Alimentarius*.

És produïda per espècies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i és efectiva contra un gran nombre de bacteris Gram +, ja sigui sobre les cèl·lules vegetatives com sobre les seves espores, com el cas de *Staphylococcus aureus* (Palavecino Prpich, 2008).

Té diverses aplicacions, especialment en productes làctics on inhibeix el creixement de *Clostridium botulinum*, en aliments enllaunats per al control de termòfils esporulats (Delves –

Broughton, 2006), en aliments carnis on es poden substituir per nitrats, en productes marinats, en aliments produïts a base d'arròs on és important controlar la presència de *Bacillus cereus* i en suc de fruita per evidenciar el control de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Hi ha altres estudis sobre l'ús d'altres bacteriocines com a conservants, com la lisostafina (Bastos et al., 2009) o la sakacina 1 (D'Angelis et al., 2009).

Existeixen també estudis en models animals on s'ha vist que l'expressió de lisostafina en glàndules mamàries de ratolins (Kerr et al. 2001), cabres (Fan et al. 2002) permet la inhibició del patògen *S. aureus* que causa mastitis i provoca grans pèrdues econòmiques en la indústria lletera.

En l'àmbit de la medicina, enfront el problema de resistència de l'ús d'antibiòtics convencionals s'ha despertat l'interès pel desenvolupament dels PAMs com agents terapèutics i profilàctics. S'han estudiat les magainines, aïllades de la pell de granota al observar que aquests animals tot i tenir ferides a la pell i viure en aigües estancades, no presentaven infeccions (Boman, 2000; Rao, 1995). El principal impediment és que aquests pèptids mostren, tot i que únicament a altes concentracions, toxicitat en models animals.

No obstant, s'han desenvolupat anàlegs de la magainina com també de la dermaseptina que mostren resultats relativament satisfactoris sense causar toxicitat. S'han provat aquests anàlegs com a tractament contra infeccions cutànies com les úlceres polimicrobianes habitual en els peus dels malalts diabètics (Gallo et al., 1998). També anàlegs de cecropines s'estan estudiant per aplicar-les contra infeccions oculars (Mannis, 2002).

S'ha vist que les cèl·lules cancerígenes presenten alteracions en la composició lipídica de la membrana fent-la més àcida que les cèl·lules normals. Sota aquest principi, s'estan avaluant com a agents anticancerígens (Hoskin i Ramamoorthy, 2009).

En el camp de l'agricultura, les malalties causades per fongs i bacteris, constitueixen el principal factor limitant de la producció agrícola mundial, disminuint la qualitat dels productes vegetals en post collita. Aquestes pèrdues poden arribar fins a un 25 % de la producció, afectant majoritàriament arbres fruiters i cereals.

Diverses de les malalties causades per organismes fitopatògens o plagues causades per insectes i nematodes s'han pogut combatre durant anys amb antibiòtics o pesticides d'origen químic que tot i ser molt eficaços, el seu ús s'està limitant.

La tendència cap a una agricultura més sostenible i les limitacions que té l'agricultura convencional com la resistència als productes esmentats anteriorment que desenvolupen

alguns patògens, o la necessitat d'aplicar compostos cada vegada més tòxics i en majors dosis, ha desencadenat l'aparició d'alternatives.

Concretament s'està treballant en el possible ús dels PAMs com a substituïts d'aquests compostos.

Actualment hi ha molts estudis científics sobre els pèptids antimicrobians en el camp de la producció vegetal. Per exemple, el grup d'E. Montesinos i d'E. Bardají de la Universitat de Girona ha desenvolupat una sèrie de pèptids antimicrobians contra el foc bacterià generat per *Erwinia amylovora*, sovint presencial en pomeres i pereres (Badosa et al; 2007). Aquests pèptids han demostrat un alt potencial antibacterià. El mateix grup de recerca, també ha desenvolupat un altre conjunt de pèptids amb activitat antifúngica pel control de la podridura per *Penicillium* en poma (Badosa et al., 2009).

En biotecnologia vegetal s'obre la possibilitat de produir plantes transgèniques resistentes a malalties i plagues a través de la introducció de gens que expressin PAMs (Broekaert et al., 1995). A la taula I.2 se'n mostren alguns exemples.

Taula I.3: Exemples de plantes transgèniques que expressen PAMs com a mecanisme d'autoprotecció contra diferents infeccions.

PAM	Origen	Font	Aplicació	Referències
Cecropines A i B	Insecte	<i>Hyalophora cecropina</i> (papallona de la seda)	Efecte antibacterià en arròs transgènic.	Sharma <i>et al.</i> , 2000
Cecropina A	Insecte	<i>Hyalophora cecropina</i>	Efecte antifúngic en arròs transgènic	Campo <i>et al.</i> , 2008
Cecropina B	Insecte	<i>Hyalophora cecropina</i> (papallona de la seda)	Efecte antibacterià en tomata transgènic	Jan <i>et al.</i> , 2010
Attacina E	Insecte	<i>Hyalophora cecropina</i>	Activitat antibacteriana en pomers i perers transgènics	Norelli <i>et al.</i> , 2000 Reynold <i>et al.</i> , 1999
Cecropina P1	Insecte	<i>Sus crofa</i> (porc domèstic)	Tabac transgènic amb activitat antibacteriana	Zakharchenko <i>et al.</i> , 2005
AlfAFP	Vegetal	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Efecte antifúngic en patata transgènica	Gao <i>et al.</i> , 2000
Tanatina	Vegetal	<i>Podisus maculiventris</i> (classe d'escarabat)	Efecte antifúngic en arròs transgènic	Imamura <i>et al.</i> , 2010

Tionina	Vegetal	<i>Hordeum vulgare</i>	Efecte antifúngic en patata dolça	Muramoto <i>et al.</i> , 2012
Pn-AMP2	Vegetal	<i>Pharbitis nil</i> (morning glory)	Efecte antifúngic en tabac transgènic	Koo <i>et al.</i> , 2002
MSI-99	Sintètic	Anàleg de la magainina (derivat sintètic de la magainina II)	Activitat antifúngica i antibacteriana en plantes transgèniques de tabac, tomàquet, parra i banana.	Chakrabarti <i>et al.</i> , 2003; Vidal <i>et al.</i> , 2003; Alan <i>et al.</i> , 2004
CEMA	Sintètic	Híbrid cecropina-melitina	Activitat antifúngica en plantes transgèniques de tabac	Yevtushenko <i>et al.</i> , 2005
Polioxines	Microbià	<i>Streptomyces cacaoi</i>	Fungicida, insecticida	Reuveni <i>et al.</i> , 2000; Arakawa, 2003
AFP	Microbià	<i>Aspergillus giganteus</i>	Activitat antifúngica en arròs transgènic	Coca <i>et al.</i> , 2004

Cal mencionar, però, que la majoria de possibles aplicacions que els pèptids antimicrobians proporcionen, es troben en etapes inicials de desenvolupament o limitades a nivell legislatiu a causa de l'estricta normativa que regula els organismes modificats genèticament a la Unió Europea. En el cas de les aplicacions mèdiques es requereixen d'exhaustius controls i exigents estudis.

I.1.2 Cecropina A

La cecropina A és un vigorós pèptid antimicrobià natural produït per l'insecte *Hyalophora cecropia*, amb capacitat d'inhibir infeccions bacterianes ja que presenta una estructura lineal de 37 aminoàcids catiònics i hidrofòbics i una conformació alfa-hèlix amfipàtica al interaccionar amb membranes microbianes.

En concret, la cecropina A no té afectes citotòxics contra cèl·lules eucariotes i eritròcits humans com és el cas de la cecropina B. La base d'aquesta selectivitat ha estat atribuïda a l'absència d'àcids fosfolípids i la presència d'esterols en cèl·lules eucariotes (Ferrer *et al.*, 2006). De manera que es considera un bon aspirant per a la seva aplicació en el camp de

l'agricultura, a més de què en diversos estudis s'ha determinat la seva gran activitat lítica contra bacteris Gram+ i Gram -, tot i així presenta una sèrie de desavantatges, descrits més endavant.

A més, s'ha demostrat que la seva expressió en plantes d'arròs *Oriza sativa* L. augmenta la seva resistència davant del fong *Magnaporthe grisea*, l'agent causant de la piriculària en l'arròs (Coca et al., 2006).

I.1.3 PAMs sintètics

Tot i els vigorosos efectes que presenten els PAMs naturals, per la seva aplicació en la protecció vegetal s'hi troben certs inconvenients. Els baixos nivells de producció d'aquests en els organismes que els produeixen, la sensibilitat a la degradació per part de les proteases actives en les plantes i la baixa estabilitat, han encarat la recerca científica cap a la modificació dels PAMs naturals. A partir de la química combinatòria, aquests s'utilitzen de base per al disseny de nous pèptids sintètics curts, més potents, estables, amb baixa citotoxicitat no específica (principal inconvenient que presenten molts PAMs naturals) i amb una major activitat antimicrobiana i d'espectre més ampli o més selectiu, en funció de les necessitats (Ferre et al., 2006). D'aquesta manera es pot incrementar o mantenir l'efectivitat dels pèptids antimicrobians tot conservant les característiques estructurals que els defineixen.

A partir de la cecropina A, per exemple, s'han dissenyat híbrids cecropina A - melitina més actius, amb major espectre antimicrobià que la cecropina A i sense els efectes citotòxics de la melitina. D'aquests híbrids es van dissenyar nous PAMs més curts derivats dels híbrids anteriors amb característiques més bones per combatre diversos fitopatògens. És el cas de la seqüència curta d'11 aminoàcids Pep 3 amb una major estabilitat i manteniment de l'activitat antibacteriana i incorporació d'activitat antifúngica, demostrada en diversos estudis (Ferrer *et al.*, 2006).

També s'han estudiat derivats de Pep3, com el Bp100, dissenyats per a millorar la selectivitat contra patògens d'interès fitosanitari, a més de mostrar també major resistència davant les proteases i tenir efectes citotòxics més baixos (Ferrer *et al.*, 2006; Badosa *et al.*; 2007). A la taula I.4 es mostra la seqüència d'aquests pèptids sintètics esmentats.

Taula I.4: Seqüència del pèptid antimicrobià cecropina, del seu derivat i els híbrids pèptids esmentats anteriorment.

Nom	Seqüència	Activitat
Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	Antibacterià
Cecropina A (1-7) – melitina (2-9)	KWKLFKKIGAVLKVL	Antibacterià
Pep 3	WKLFKKILKVL	Antibacterià i antifúngic
BP100	KKLFKKILKYL	Antibacterià

I.1.4 Síntesi química de PAMs

A partir de la química combinatòria és possible obtenir un gran ventall de PAMs més o menys modificats en la seqüència d'aminoàcids amb l'objectiu d'estudiar i avaluar l'activitat antimicrobiana de molts pèptids de característiques desitjables alhora (Bondelle et al., 2000). L'avantatge respecte la biosíntesi és de que permet un estudi ràpid de l'activitat antimicrobiana.

Si l'objectiu és obtenir grans quantitats d'un pèptid per ser emprat en el sector agrícola, la síntesi química no és assequible. L'elevat cost que comporta aquesta tècnica tant sols té viabilitat en aplicacions d'elevat valor afegit com les mèdiques.

L'alternativa és l'aplicació de processos biotecnològics com les fermentacions en cultius cel·lulars o les plantes transgèniques com a biofactories per a la producció de PAMs (Montesinos, 2007).

I.2 PLANTES TRANSGÈNIQUES

Les plantes transgèniques són plantes en els quals s'ha incorporat en el seu genoma un o més transgens mitjançant tècniques d'enginyeria genètica.

L'enginyeria genètica de plantes va sorgir a principis dels anys 80, quan es va descobrir com transferir fragments d'informació genètica d'un organisme vegetal a un altre, concedint l'expressió de caràcters desitjables. Des de llavors, el desenvolupament de les tecnologies de transformació i regeneració de plantes ha permès la realització de modificacions que semblaven impensables.

L'obtenció de les plantes transgèniques comporta diverses etapes: 1) identificació i aïllament del gen d'interès 2) construcció d'un plasmidi que tingui el gen d'interès i el gen de selecció 3) transformació de les cèl·lules vegetals 4) Selecció i regeneració de les cèl·lules transformades 5) Cultiu i avaluació de la planta transferida

Per a la introducció del gen d'interès en el genoma de les cèl·lules vegetals s'han desenvolupat diferents mètodes: l'electroporació, la microinjecció, la biolística i el més comú la transformació mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*.

Si bé les plantes transgèniques han tingut un ús molt important en el camp de la investigació bàsica, en aquest treball s'esmentaran les aplicacions amb finalitat comercial.

La primera generació de plantes MG comercials s'encamina a l'obtenció de cultius amb avantatges agronòmics com tolerància a herbicides, resistència a plagues i patògens o tolerància a condicions adverses tals com la salinitat o sequera. El cultiu d'aquestes plantes proporciona beneficis als agricultors, augmentant el rendiment del cultiu i disminuint el cost de producció.

La segona generació permet l'obtenció de plantes amb majors propietats organolèptiques i nutritives, destinades a l'elaboració d'aliments per humans i animals. Les modificacions que pateix la planta són més complexes ja que hi ha implicat un major nombre de gens. Aquestes plantes aporten un guany cap als productors d'aliments i al consumidor final.

Existeix una tercera generació de plantes transgèniques destinades a produir compostos d'alt valor afegit. En aquesta generació no es busca la producció d'aliments sinó que la intenció és que la planta es converteixi en una biofàctoria de productes d'interès en els camps biosanitari,

farmacèutic i industrial (Basaran I Rodriguez-Cerezo 2008; Paul i Ma 2001; Obembe *et al*; 2011).

Les finalitats de les plantes transgèniques poden ser diverses, a continuació se 'n descriuen algunes aplicacions amb exemples.

Taula I.5: Aplicacions de les plantes transgèniques.

Aplicacions	Exemples
Agronòmiques	El blat de moro BT (<i>Zea mays ssp.</i>) Mon810: que té incorporat un gen de <i>Bacillus thuringiensis</i> per a la reducció del dany causat per plagues d'insectes com el cuc barrinador Europeu que ataca a la tija. La tomata (<i>Solanum lycopersicum</i>) tolerant a les glaçades. La soja (<i>Glycine max L.</i>) incorpora un gen de <i>Streptomyces spp.</i> per al control de les males herbes.
Alimentàries	La tomata de maduració retardada, <i>Flavr Savr</i> (retirat del mercat). Arròs daurat, arròs (<i>Oryza sativa</i>) enriquit amb provitamina A. Increment d'aminoàcids essencials en la patata (<i>Solanum tuberosum</i>).
Aplicacions farmacèutiques	Producció de vacunes, per exemple contra hepatitis B, en tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>) i patata (<i>Solanum tuberosum</i>). Producció d'anticossos pel tractament de càries dental en tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>).
Aplicacions mediambientals	Producció de bioplàstics, per exemple polihidroxibutirat (BHT) en <i>Arabidopsis thaliana</i>.

I.3 PLANTES TRANSGÈNIQUES COM A BIOFACTORIES

La utilització de les plantes transgèniques com a biofactories de productes d'alt valor afegit han despertat un elevat interès, degut als avantatges de tipus econòmic, tècnic i de seguretat que tenen les plantes per a ser utilitzades com a sistemes de producció.

Quan parlem de plantes com a biofactories ens referim al cultiu a escala agrícola de plantes superiors que han estat transformades de manera que passen a expressar productes que no expressaven anteriorment (o que expressaven en quantitats molt petites) i que posseeixen un elevat valor afegit (Gago et al., 2005).

Aquests productes d'interès són proteïnes per aplicacions biomèdiques o industrials com la síntesi d'additius alimentaris, vacunes, anticossos (planti cossos), biofàrmacs i biopolímers, o bé enzims que modifiquen una ruta metabòlica de la planta i com a conseqüència aquesta expressa un compost que anteriorment no produïa.

Actualment, la producció de proteïnes recombinants d'interès biosanitari i industrial és l'aplicació que concentra major nombre d'empreses i major quantitat de productes propers a la comercialització (Revisió: Lico *et al.*, 2012; Obeme *et al.*, 2011).

En alguns d'aquests camps s'ha avançat notablement i molts productes sintetitzats per plantes ja han arribat al mercat.

A continuació es mostren algunes aplicacions.

Taula I.6: Vacunes, anticossos, biofàrmacs i enzims expressats en plantes transgèniques (Streatfield i Howard, 2003; Daniell *et al.*, 2001; Biesgen *et al.*, 2002)

Agent patogen	Antigen	Planta transgènica
<i>Vibrio cholerae</i>	Subunitat B de la toxina colèrica	Patata, tabac, tomata
Virus de l'hepatitis B	Antigen de superfície	Tabac, enciam, patata
Virus del xarampió	Hemaglutinina	Tabac
Antigen - Anticòs	Aplicació	Planta transgènica
Antigen estreptococ superficial I/II – Guy 13 (IgAS)	Tractament contra la càries dental	Tabac
Antigen de superfície – CO17 1A (IgG)	Tractament del càncer de còlon	Tabac

Proteïna HSV2 – Anti-HSV-2 (IgG)	Tractament d'herpes simple 2 (VHS-2)	Soja
Biofàrmac	Aplicació	Planta transgènica
Proteïna C humana	Anticoagulant	Tabac
Factor de necrosis tumoral α	Tractament contra tumors i malalties infeccioses	Patata
Albúmina sèrica humana	Tractament cirrosis hepàtica	Tabac
Enzim	Aplicació industrial	Planta transgènica
Lacasa	Indústria tèxtil i clarificació de sucs	Blat de moro
α -amilasa	Processament del midó, clarificació de vins i sucs, indústria detergent	Tabac
Quimosina	Elaboració de formatges	Tabac, patata

És evident que les plantes són una alternativa per expressar de manera eficient i econòmica proteïnes recombinants i ofereixen avantatges sobre altres sistemes d'expressió. En la taula següent se'n descriuen alguns.

Taula I.7: Avantatges de la utilització de plantes biofactoria. (Gago et al., 2005)

Econòmic	Tècnic	Seguretat
Permet la utilització dels recursos i infraestructures existents. Baix cost de producció. Gran quantitat de biomassa on s'hi acumulen grans quantitats de proteïnes recombinants. El manteniment no és costós.	Les plantes són sistemes fàcils de transformar. Augment de l'estabilitat a causa de l'acumulació en compartiments cel·lulars. Hi ha sistemes d'emmagatzament de proteïnes en diversos òrgans o teixits.	Les proteïnes procedents de plantes no són susceptibles d'estar contaminades per virus, animals o humans que puguin afectar al ser humà o als animals.

Encara que aquest sistema d'expressió presenti importants avantatges, existeix una sèrie de factors crítics que són necessaris conèixer per a la bona pràctica de l'agricultura molecular. Aquests factors es refereixen a la seguretat ambiental, possibles efectes sobre la salut humana

i animal i reptes tècnics dins la producció i la purificació. Cal tenir en compte que els OMGs destinats a la comercialització i /o consum estan subjectes a una legislació que té com a objectiu assegurar la innocuïtat per el consumidor i el medi ambient.

I.3.1 Plantes transgèniques com a biofactories que expressen PAMs

Fins al moment, l'expressió de pèptids antimicrobians en plantes transgèniques s'ha centrat en la producció de les plantes contra patògens. D'aquesta manera la cecropina i els seus anàlegs s'han pogut expressar en tabac, arròs i tomata transgènic conferint a la planta, tot i els baixos nivells d'expressió, una resistència a fongs i/o bacteris (Yev; Coca *et al.*, 2006; Jan *et al.*; 2010)

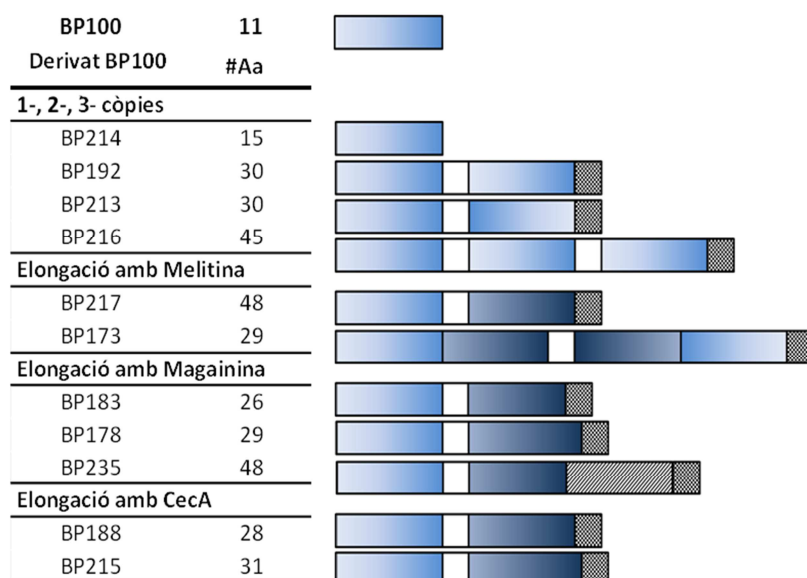
La síntesi de pèptids antimicrobians en plantes transgèniques comporta certa complexitat. Per una banda la mida petita dels pèptids i la susceptibilitat de la degradació enfront les proteases de la planta els fa molt inestables *in planta*. Per altra banda degut a les seves propietats físico-químiques (altament catiónics) poden ésser tòxics per a la planta que els sintetitza. Per aquesta raó els estudis van dirigits a estratègies d'acumulació del pèptid dins la cèl·lula en certs compartiments cel·lulars, en determinats teixits o en resposta a certs estímuls.

II. ANTECEDENTS I OBJECTIUS

II. ANTECEDENTS

Els grup de Patologia Vegetal (INTEA, UdG) juntament amb el grup del LIPPSO (UdG) van dissenyar i sintetitzar una llibreria de 125 pèptids lineals utilitzant com a base la seqüència del PAM sintètic Pep3 (un híbrid de 2 PAMs naturals, Melitina i Cecropina A). Un dels objectius era trobar un o varis PAMs significativament actius contra tres patògens d'interès fitosanitari: *Erwinia amylovora* (causant del foc bacterià en fruiters), *Pseudomonas syringae* (necrosi bacteriana de la perera) i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (causant de la taca negra de la tomatera). BP100 va ser seleccionat com a més interessant d'acord amb les característiques següents: pèptid amb major activitat antibacteriana contra aquests patògens i molt biocompatible, és a dir amb activitat hemolítica i toxicitat aguda en ratolí molt baixes (Ferré *et al.*, 2006; Badosa *et al.*, 2007). La producció massiva de BP100 mitjançant síntesi química resulta econòmicament inviable ja que es tracta d'un pèptid amb aplicacions en el camp de l'agricultura. Una alternativa econòmicament més viable podria ésser la síntesi en planta. Cal tenir en compte que la síntesi d'aquests tipus de pèptids en plantes presenta una sèrie de reptes importants degut a la mida petita dels pèptids (en dificulta l'expressió), la seva vulnerabilitat a la degradació per proteases de la planta i la toxicitat que poden presentar els pèptids per la pròpia planta que els sintetitza.

El grup de recerca on he realitzat aquest treball (grup de Tecnologia dels Aliments), en col·laboració amb el grup de Patologia Vegetal van dissenyar una sèrie de derivats de BP100 per a ser expressats en planta, concretament en arròs transgènic. Per tal de resoldre el problema de la mida es va optar per allargar la seqüència de BP100, ja fos afegint còpies de BP100 en tàndem o allargant-lo amb seqüències d'altres PAM naturals. A l'esquema següent es mostren els pèptids estudiats



Tots onze derivats de BP100 es van dissenyar de manera que el pèptid podés acumular-se en un compartiment subcel·lular, el reticle endoplasmàtic, per tal de minimitzar la toxicitat del pèptid i alhora la degradació per proteases vegetals. En l'assaig de caracterització *in vitro*, realitzat amb pèptids sintètics, tots els derivats van mostrar forta activitat contra els tres fitopatògens prèviament esmentats, i alhora una activitat hemolítica relativament baixa en comparació amb la Melitina, un pèptid fortament hemolític, tot i que els diferents derivats de BP100 presentaven diferents nivells d'activitat hemolítica.

Mitjançant tècniques de biotecnologia es va transformar arròs amb 11 construccions gèniques, que codificaven els 11 derivats de BP100, amb la finalitat d'obtenir plantes que els expressessin. Si bé es van obtenir plantes per a la majoria de pèptids, remarcar que no se'n van poder obtenir pels pèptids BP192 i BP216; i que pels pèptids BP214, BP213 i BP217, el nombre de plantes obtingut va ésser molt inferior a l'esperat. Així, es va evidenciar que l'obtenció de plantes MG que expressin aquests tipus de pèptids no és fàcil, i que fins i tot per alguns pèptids no és possible ja que compromet la viabilitat de la planta hoste. Per tant, aquest tipus de pèptids poden ésser fitotòxics per a la planta que els està sintetitzant.

El procés d'obtenció d'una planta transgènica és laboriós i requereix temps, i el grup de recerca ha comprovat amb aquest estudi que en molts casos no és fins al final del procés de transformació que no es pot saber si les plantes transgèniques seran viables o no, i amb quina eficiència podran obtenir-se. És per això que seria molt interessant tenir un mètode per a poder determinar, abans d'iniciar el procés de transformació, si el pèptid serà molt o poc

fitotòxic per a la planta hoste, per tal de poder predir si es podran o no obtenir plantes transgèniques.

Actualment, la toxicitat d'un pèptid es determina mitjançant l'activitat hemolítica. Es tracta d'un assaig de citotoxicitat que consisteix en incubar el pèptid sintètic amb eritròcits humans i determinar el percentatge d'hemòlisi. Tot i que les activitats hemolítiques de tots onze derivats de BP100 eren relativament baixes, en alguns casos no ha estat possible obtenir plantes MG que els expressin. Aquest treball s'emmarca dins un estudi que pretén avaluar diversos mètodes que permetin analitzar la toxicitat de pèptids front a cèl·lules vegetals, de manera que estimi directament la fitotoxicitat.

II.2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest estudi són els següents:

- Analitzar la fitotoxicitat d'onze pèptids antimicrobians derivats de BP100, utilitzant diferents mètodes d'estimació de toxicitat sobre cèl·lules vegetals
- Estudiar si els resultats de fitotoxicitat obtinguts, permeten predir la possibilitat d'obtenir plantes transgèniques que expressin constitutivament aquests pèptids.

III. MATERIAL I MÈTODES

III. MATERIAL I MÈTODES

III.1 MATERIAL BIOLÒGIC

III.1.1 Calls

Un call de planta és una massa de cèl·lules somàtiques indiferenciades provinents del teixit vegetal del parènquima d'una planta adulta. No és necessàriament homogeni perquè sovint està fet de teixit estructural no pas de cèl·lules individuals, tot i que els calls es consideren similars a efectes de les anàlisis científiques.

Els calls es van obtenir al laboratori a partir de llavors d'arròs (*Oryza sativa* L. var Sènia). Utilitzant un medi de creixement compostat per a diversos components vitals i hormones els calls que s'indueixen i creixen sense patir una diferenciació (Figura 3.1).



Figura 3.1. Inducció de call a partir de llavor d'arròs.

III.1.1.1 Medi per a la formació/manteniment dels calls d'arròs

Medi MS-2

MS	2.2 g
2,4-D $5 \times 10^{-4} M$	1 mg
Sacarosa (20%)	10 g
Ajustar a pH 5.8 amb NaOH o HCl	
Gelrite (agar)	1 g
Volum final	500 mL

Un cop preparat el medi s'esterilitza en autoclau 20 minuts a 121 °C.

El medi MS (Murashige i Skoog) està compostat per macronutrients i micronutrients formats per diversos sulfats, nitrats, halògens, fosfats, ferro i vitamines.

L'addició de l'hormona en pols cristal·litzada 2,4-Dichlorophenoxyacetic àcid (2,4-D) té la funció de regular el creixement de les cèl·lules, i induir i mantenir les estructures de call. La sacarosa és la font d'energia i l'agent osmòtic. El pH s'ha de situar a 5.8, valor mig entre el

rang apte de creixement (entre 5,0 – 6,5), sinó compleix hi ha possibilitat de que algunes sals (fosfats o ferro) precipitin i l'agar perdi rigidesa.

III.1.1.2 Tècniques de manipulació de calls

Un cop realitzada la inducció del call, les cèl·lules transformades es mantenen en creixement *in vitro* en plaques MS-2 a una temperatura de 28 °C dins incubador i en condicions de foscor (la llum estimula la fotosíntesi i la diferenciació del call). Aquest medi s'utilitza per a la inducció i el manteniment dels calls, i subministra nutrients, hidrats de carboni, vitamines i sals minerals per al seu correcte desenvolupament. Un dels components fonamentals que ha de contenir és l'aigua, el solvent biològic principal.

El manteniment dels calls es realitza cada 6 setmanes mitjançant transferència en medi nou per assegurar el seu creixement continuat. Es realitza en condicions estèrils, per tant sota campana i cal la utilització de la flama i les pinces estèrils. Es transfereixen petites parts de call (aproximadament 2 mm) a noves plaques de medi MS-2 i es retornen a l'incubador. D'aquesta manera es va disposant constantment de material vegetal sobre el qual es poden fer els assajos necessaris.

III.1.2 Llavors

Les llavors amb les quals es treballa són d'arròs (*O.sativa*) varietat Sènia. Varen ser obtingudes de plantes crescudes a l'hivernacle del Parc Tecnològic i Científic de la Universitat de Girona. S'utilitzen llavors per a la formació de call i per els assajos de germinació.

III.1.3 Plantes de tabac

La planta de tabac utilitzada correspon a l'espècie *Nicotiana Benthiana*. S'ha obtingut a l'hivernacle de l'Escola Politècnica de la Universitat de Girona.

Aquest gènere és considerat per la comunitat científica com a un organisme model per a dur a terme determinats assajos *in planta*. Presenta certs avantatges com a creixement ràpid i elevada massa foliar (fulles d'aproximadament 16 mm de llarg).

A més les fulles són relativament fràgils i per tant és una planta excel·lent per a realitzar assajos d'infiltració (Figura 3.2)



Figura 3.2 Plantes de tabac que es van realitzar els assajos.

III.2 PROTOPLASTS

III.2.1 Obtenció de protoplasts de call d'arròs

El material de partida per a l'obtenció dels protoplasts va ser el call. Els protoplasts són cèl·lules vegetals que se'ls hi ha extret la paret cel·lular per processos mecànics o enzimàtics, en aquest estudi s'utilitza una solució enzimàtica. D'aquesta manera, la única barrera entre el protoplasma cel·lular i el medi extern és la membrana plasmàtica, que es troba totalment exposada. Per tant, són cèl·lules fràgils i fàcils de ser danyades, però el seu estat transitori els hi permet ser manipulades tot conservant les potencialitats com a cèl·lules vegetals.

Material de laboratori:

Guants sense pols
Plaques de Petri
Agitador
Centrífuga
Incubador
Alcohol de desinfecció de superfícies i mans
Malla estèril (22 μm)
Microscopi, portaobjectes i cobreobjectes

Material de laboratori estèril (autoclavat 20 minuts a 121°C):

Espàtula
Erlenmeyer de 250 mL (estèril)
Tubs Falcon (estèrils)

Solució enzimàtica:

2% (p/v) Cellulase RS
0.5 % (p/v) macerozyme R10
13 % (p/v) Mannitol
Enrasar fins a 100 mL amb aigua Milli-Q
Ajustar a pH 5.6
Esterilitzar per filtració (0,22 µm)

Solució de rentat:

NaCl 9 g / L
CaCl₂ · 2H₂O 18,3 g / L
KCl 0,37 g / L
Glucosa 0,99 g / L
Afegir aigua Milli-Q fins a 200 mL.
Ajustar pH 6 amb KOH
Autoclavar durant 20 minuts a 121 °C

Nota important: durant tot el procés d'obtenció dels protoplasts, es treballa en condicions estèril

Protocol:

- 1) Passar 16 masses de call d'uns 2 cm de diàmetre (Figura 3.3) a una placa estèril sense medi amb l'ajuda d'una espàtula. Disgregar fins a obtenir un puré.



Figura 3.3: Exemple de masses de call de 2 cm de diàmetre crescudes en medi MS-2

- 2) Dividir el puré en dos parts i posar cada part dins d'un Erlenmeyer de 250 mL.
- 3) Afegir a cada Erlenmeyer 50 mL de la solució enzimàtica encarregada de digerir la paret cel·lular.
- 4) Incubar 18h, amb agitació suau, 50 rpm a 22-24 °C i a la foscor.

- 5) Filtrar la solució de protoplasts a través d'un filtre de malla de diàmetre 22 μm . Guardar a 4°C dins d'un tub eppendorf, una petita quantitat de la massa retinguda en el filtre per una posterior observació.
- 6) Rentar el filtre amb 15 mL amb la solució de rentat.
- 7) Recollir el líquid filtrat i distribuir-lo en 8 tubs estèrils Falcon.
- 8) Centrifugar 5 min a 800 rpm a 4 °C per sedimentar els protoplasts.
- 9) Aspirar el sobrenedant amb una pipeta de 5 mL (el pèl·let és de color beix). Anar amb molt de compte per no emportar-se els protoplasts. Guardar una alíquota de 100 μL de sobrenedant en un tub eppendorf estèril per a posterior observació.
- 10) Ressuspendre el pèl·let de 4 tubs Falcon amb 200 μL de la solució de rentat. Per tant al final tenim 2 tubs de 200 μL .
- 11) Observar la viabilitat dels protoplasts al microscopi.

III.2.2 Test de fitotoxicitat de PAM en protoplasts

El test de fitotoxicitat en protoplasts es realitza amb dos pèptids antimicrobians coneguts. El BP100, com a model de derivats del pèptids estudiats en aquest estudi, i la Melitina com a control positiu, descrit com a PAM molt fitotòxic, que permetrà visualitzar el comportament dels protoplasts danyats i fer una comparació crítica envers els resultats de fitotoxicitat de l'altre pèptid. Per tal d'observar l'afectació dels protoplasts per part dels pèptids, es treballa a concentracions de pèptid de 0 μM , com a control de viabilitat dels protoplasts, 100 μM , 250 μM i 500 μM .

El BP100 va ser sintetitzat per el LIPPSO (Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona) i la Melitina comprat a Sigma.

Material de laboratori:

Microtubs plàstic (estèrils)
Melitina
BP100
Tampó de rentat
Microscopi, portaobjectes i cobreobjectes

Protocol:

- 1) S'incuben 20 μL de pèptid durant 1 hora a temperatura ambient amb 80 μL de protoplasts. Com a control negatiu (0 μM), s'incuba el mateix volum de protoplasts amb 20 μL De tampó de rentat durant 1 hora.

Es van analitzar les següents concentracions:

Concentració final de pèptid	Volum pèptid	Volum protoplasts	Volum final
0 μM	–	80 μL	100 μL
100 μM	20 μL (500 μM)	80 μL	100 μL
250 μM	20 μL (1250 μM)	80 μL	100 μL
500 μM	20 μL (2500 μM)	80 μL	100 μL

Nota: les concentracions són les mateixes per el BP100 com per la Melitina.

- 2) S'analitzen al microscopi òptic i a 20.000 augments les següents mostres:

Taula III.4: Motius d'observació en cada mostra de l'assaig.

Mostra	Motiu d'observació
Temps= 1 hora $\rightarrow$ 0 μM	Constatar que després d'1 hora d'incubació, el % de viabilitat no ha canviat.
Temps= 1 hora $\rightarrow$ Melitina	Control positiu de lisi. Visualització de la forma dels protoplasts lisats al microscopi.
Massa de call després de la lisi enzimàtica (punt 5, apartat III.2.1)	Comprovació que l'estructura de call ha alliberat els protoplasts.
Sobrenedant (punt 9, apartat III.2.1)	Comprovació que els protoplasts han sedimentat.
Temps=1 hora $\rightarrow$ BP100	Analitzar la fitotoxicitat produïda pel BP100.

III.3 GERMINACIÓ DE LLAVORS D'ARRÒS EN PRESENCIA DE PAM

III.3.1 Desinfecció de les llavors

El material vegetal requereix ser desinfectat superficialment abans d'utilitzar-lo en assajos. Hi ha diverses substàncies químiques desinfectants que destrueixen un gran nombre de microorganismes. El tipus i la concentració del producte químic utilitzat com el temps d'exposició es decideix empíricament. En aquest estudi s'utilitza una solució d'hipoclorit sòdic (NaClO), que permet reduir els nivells de contaminació per fongs i bacteries en les llavors.

Material autoclavat (durant 20 minuts a 120 °C):

Vas de precipitats de 0,5 L i 1 L
Caixetes blanques per a posar-hi les llavors
Aigua destil·lada estèril (rentats)
Aigua Milli-Q estèril (preparació de l'etanol, lleixiu...)
Pinces
Paper de filtre
Proveta 100 mL

Reactius i altres:

Lleixiu
Tween 20
Etanol

Protocol:

- 1) Pelar aproximadament unes 760 llavors d'aspecte blanc. Evitar les enfosquides.
- 2) Posar les llavors en les caixetes (un màxim de 30 llavors/caixeta) i retolar amb llapis.
- 3) Submergir-les amb etanol 70 % (70 mL etanol + 30 mL aigua) en un vas de precipitats estèril de 1 L. Cada quatre caixetes s'introdueixen uns 200 mL. És molt important que quedin totalment cobertes en la solució de desinfecció perquè el tractament sigui eficaç.. A continuació agitar durant 1 minut.
- 4) Es decanta l'etanol i es submergeixen les caixetes en una solució de lleixiu 30 % (30 mL lleixiu + 70 mL aigua) a la qual prèviament se li han afegit 3 gotes de Tween 20 per cada 100 mL. Cada 4 caixetes es necessita 200 mL de lleixiu. S'agita exactament 30 minuts a 120 rpm. No sobrepassar el temps indicat ja que podria afectar seriosament l'estat de les llavors.

- 5) S'esbandeixen les caixetes amb aigua destil·lada durant 4 vegades seguides. Es necessita un volum d'aigua de 300 mL per a cada quatre caixetes.
- 6) Es deixen reposar les caixetes en aigua destil·lada estèril neta en agitació durant 1 hora a 120 rpm.
- 7) Es tornen a rentar les caixetes amb aigua destil·lada 4 vegades. El volum d'aigua per a cada 4 caixetes és de 300 mL.
- 8) En cas de no utilitzar les llavors de seguida, mantenir-les dins un vas de precipitats amb aigua destil·lada neta, així s'evita l'assecamment i el deteriorament.

III.3.2 Preparació de les dilucions de pèptids

La possible fitotoxicitat dels PAMs es va analitzar en assajos de germinació de llavors d'arròs en presència de diferents concentracions de pèptid. El pèptid BP100 i els seus derivats van ésser sintetitzats per el LiPPSO (Universitat de Girona). Els PAMs són proporcionats amb pols liofilitzada, es ressuspenen amb aigua Milli-Q a una concentració de 1 mM i es guarden a -20°C.

L'assaig es va dur a terme en dos dies diferents i els pèptids es van agrupar de la següent manera:

GRUP 1	BP100, BP134, BP192, BP213, BP214, BP216, BP217
GRUP 2	BP100, BP183, BP188, BP173, BP178, BP215 i BP235

Material:

Filtre estèril 0,22 µm
 Xeringa
 Tubs Falcon estèrils
 Aigua Milli-Q estèril

Protocol:

- 1) Descongelar la solució de 1 mM de pèptid i per a cada pèptid, fer una dilució a 64 µM en un volum de 5 mL.
 Esterilitzar per filtració amb un filtre estèril de diàmetre de porus de 0,22 µm el 5mL.
 Un cop filtrat, fer dilucions seriades 1:2 amb aigua Milli-Q estèril per tal d'obtenir la resta de concentracions. Treballar sota campana d'esterilitat.
 Nota: en el cas del grup 2 de pèptids, les dilucions testades van ser 16 µM, 32 µM i 64 µM, ja que s'espera que aquests pèptids siguin menys fitotòxics.

III.3.3 Assaig del test de germinació de les llavors

Aquest assaig s'ha realitzat per avaluar la germinació de les llavors Sènia amb presència dels pèptids escollits a les diferents concentracions mencionades anteriorment. D'altra banda, es fa un control amb aigua Milli-Q esterilitzada, és a dir sense pèptid per seguir el creixement natural de les llavors. La fitotoxicitat es determinarà comparant la mida del brot al cap de 7 dies de germinació. S'utilitzen microplaques estèrils de 24 pous, que faciliten la distribució dels 12 replicats (12 llavors) en 4 pous per a cada concentració. Es treballa en condicions i material estèrils, per evitar la contaminació de fongs i bacteris.

Material de laboratori:

Microplaques de 24 pous estèrils
Pinces estèrils
Paper de filtre 15cm x 15cm estèril
Parafilm
Incubador
Llavors desinfectades

Protocol:

- 1) S'agafen microplaques estèrils, es retolen les concentracions en les columnes i el nom del pèptid que s'incorporarà a la microplaca.
- 2) S'agafa una caixeta blanca amb les pinces, es posa sobre una capa de paper de filtre i s'obre la caixeta. Es reparteixen 3 llavors a cada pou. S'agafa una altre caixeta i es segueix al mateix procediment. Així fins a omplir totes les plaques.
- 3) S'introdueix 500 μ L d'aigua Milli-Q estèril a cada pou de la concentració de 0 μ M.
- 4) S'addiciona un volum de 500 μ L de cada dilució de pèptid en els diversos experiments. Per reutilitzar la punta estèril de la pipeta, es comença per la dilució més concentrada fins a la més diluïda, de manera que només es canvia la punta quan es canvia de pèptid.

A continuació es mostren dos exemples de distribució de les mostres a la microplaca:

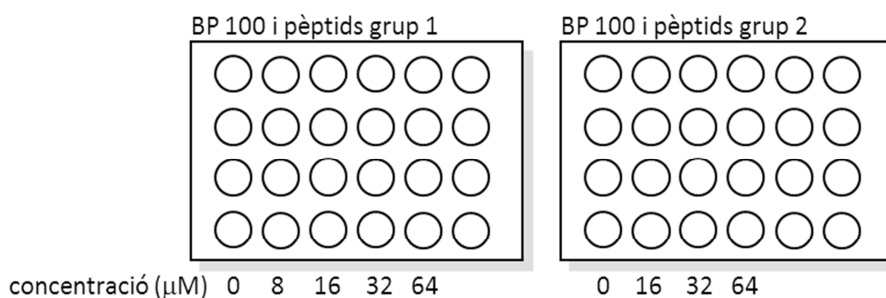


Figura 3.5: Representació de les microplaques de 24 pous

- 5) Es tanquen les microplaques amb Parafilm per evitar que s'obrin i es contaminin.
- 6) S'incuben a 28 °C amb llum (16 h de llum i 8 h de foscor) durant 7 dies.

Nota important: durant el procés de preparació de les microplaques s'ha de treballar en condicions màximes d'esterilitat. Això implica treballar amb material estèril, preparar les plaques sota campana i ser molt curós durant tot el procés de manipulació. Qualsevol petita contaminació pot interferir en la interpretació dels resultats.

III.4 ASSAIG DE FITOTOXICITAT DE PAM EN TABAC

El tercer assaig d'avaluació de la fitotoxicitat generada pels pèptids antimicrobians, es va dur a terme sobre fulles de la planta de tabac *Nicotiana benthamiana*. Tot i que es va utilitzar fulles, l'assaig es va realitzar *in planta*, no *ex vivo*.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, les plantes van ésser crescudes a l'hivernacle de l'Escola Politècnica de la Universitat de Girona i es van recollir a les 4 setmanes després de la germinació. En l'elecció de les plantes, es va intentar que les fulles fossin el més similar possible tant en forma, mida i color (indicador de la maduresa de la fulla). Per a cada concentració de pèptid es van fer tres replicats. Aquests replicats es van distribuir en plantes diferents per tenir replicats biològics reals.

Els pèptids que es van utilitzar per l'experiment van ser: BP100, BP134, BP214, BP216, BP173, BP178, BP183, BP188, BP215, BP235, BP192, BP217 i BP213.

III.4.1 Preparació dels pèptids

Material:

Tubs eppendorf
Aigua Milli-Q

Protocol:

- 1) Inicialment els pèptids es trobaven a una concentració de 1 mM, de manera que es van fer 3 dilucions a les concentracions de 50 µM, 100 µM i 150 µM.

En aquest cas no és necessari que els PAM siguin estèrils, així que no es van filtrar.

III.4.2 Infiltració dels pèptids en les fulles de tabac

Un cop els pèptids es van trobar en les concentracions escollides per a ser assajats en les fulles, es va procedir a realitzar la infiltració.

Material:

Agulla
Xeringues
Paper de filtre

Protocol:

- 1) Es dissenya l'ordre d'aplicació dels diferents pèptids en les fulles, com es mostra en la imatge següent:



Figura 3.6 : Distribució de tots els pèptids en les fulles.

- 2) Es seleccionen les fulles en què s'hi aplicaran els replicats biològics de cada concentració de pèptid, que sempre es faran en plantes diferents.
- 3) Es fa una petita punxada el revers de la fulla amb l'ajuda d'una xeringa (sense agulla) s'infiltra el pèptid curosament fins a un volum de 100 µL.



Figura 3.7: Infiltració del pèptid

Es repetirà en els 3 replicats d'igual manera. També s'infiltrarà aigua per avaluar la capacitat d'infiltració de la fulla.

- 4) S'eixuguen les fulles per evitar degoteig.
- 5) Al cap de 2 dies, s'observa l'àrea de lesió provocada per a cada pèptid a les diferents concentracions. Es mesura el diàmetre d'aquesta lesió.

III. 5 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Per a l'anàlisi estadística s'ha utilitzat el programa IBM SPSS Statistics versió 19.0. Concretament s'ha realitzat l'anàlisi per a determinar el nivell de significació de la semblança entre grups de mostres: l'anàlisi de la variància (ANOVA). També s'han realitzat anàlisis *post-hoc* amb el test de Tuckey.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.1 DETERMINACIÓ DE LA FITOTOXICITAT DE PAMs MITJANÇANT PROTOPLASTS

Tal com s'ha descrit a l'apartat de material i mètodes, l'assaig de fitotoxicitat en protoplasts és una de les tècniques que s'ha valorat per avaluar la possible toxicitat que generen diversos pèptids antimicrobians en material vegetal. En totes les tècniques proposades en aquest treball, la via d'aplicació dels pèptids és exògena. Les cèl·lules vegetals estan composades per la paret cel·lular, que protegeix la cèl·lula i funciona com a barrera medidora per a totes les relacions de la cèl·lula amb el seu entorn i per tant quan el pèptid es vol aplicar des de l'exterior es troba amb aquest impediment. D'aquesta manera, es va decidir extreure la paret cel·lular i treballar directament amb els protoplasts, que al estar exempts de la barrera protectora, potser permeten millor la simulació de quan els pèptids són sintetitzats per la pròpia cèl·lula de manera endògena.

El material vegetal de partida per a l'obtenció dels protoplasts, han estat calls frescos d'arròs *O.sativa*, que van ser aïllats amb èxit aplicant un mètode enzimàtic. Existeix un altre procés per aïllar aquestes fraccions, i és a partir d'un mètode mecànic, com els ultrasons però comporta un alt risc de danyar els protoplasts. A més, tal com s'indica a l'apartat de material i mètodes, durant el procés d'aïllament es van recollir diferents mostres per tal d'avaluar l'eficiència d'obtenció de protoplasts. Les observacions fetes al microscopi indiquen que els enzims han degradat la major part de la paret cel·lular ja que quan s'observa la massa de call després de la lisi enzimàtica en el microscopi, es verifica que l'estructura de call ha alliberat els protoplasts, ja que l'estructura és completament buida (Figura 4.1). Aquest fet significa l'alta eficàcia del tractament enzimàtic i la possibilitat d'obtenir els protoplasts en una altre fase. En la imatge següent es pot contemplar una massa de call plena en el seu interior i tres masses buides on únicament hi queda la paret cel·lular. Es van mirar diversos camps per assegurar que el tractament enzimàtic funcionés.

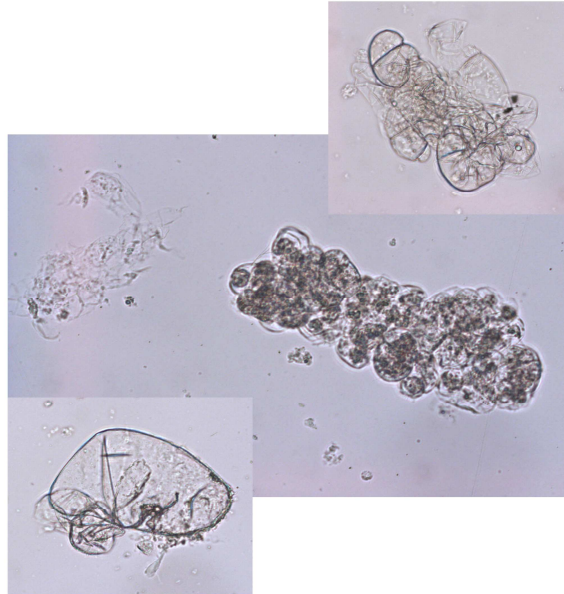


Figura 4.1: Massa de call plena al centre de la imatge i als laterals, dues masses de call buides.

Un altre control al microscopi ha estat el del sobrenedant. Un cop s'ha filtrat la solució de protoplasts, els protoplasts es centrifuguen per tal de que sedimentin i així poder-los recuperar i alhora concentrar. S'ha recollit sobrenedant a diferents profunditats i s'ha comprovat la no presència de protoplasts.

S'han obtingut aproximadament uns 10^5 protoplasts/ml amb una viabilitat del 85 %. Durant i amb posterioritat a la digestió de la paret cel·lular, el protoplast esdevé molt sensible a l'estrès osmòtic. I tot i que la digestió i l'emmagatzemament s'han de fer en una solució de pH isotònic per evitar la ruptura de la membrana plasmàtica tenir un 100 % de protoplasts viables és complicat. Per tant el percentatge de viabilitat entra dins dels valors esperats. S'han obtingut, però, pocs protoplasts. Per la quantitat de call què s'ha partit, s'esperava obtenir de l'ordre de 10^7 protoplasts/ml.

A continuació es presenten els resultats d'incubació dels protoplasts amb els pèptids. Aquest assaig només es va dur a terme amb BP100 com a model dels derivats de BP100 i amb la Melitina, com a control positiu de lisi. Els protoplasts es van incubar durant 1 hora amb BP100 o Melitina a les diferents concentracions descrites a material i mètodes. A $0 \mu\text{M}$ de PAM es pot constatar que després d'una hora d'incubació, el percentatge de viabilitat dels protoplasts no ha canviat, fet que fa pensar que el manteniment i emmagatzematge durant aquest temps s'ha fet correctament a pesar de la sensibilitat dels protoplasts (Figura 4.2).

En canvi, quan els protoplasts s'incuben amb les diferents concentracions de BP100 sí que s'observen protoplasts lisats (Figura 4.2).

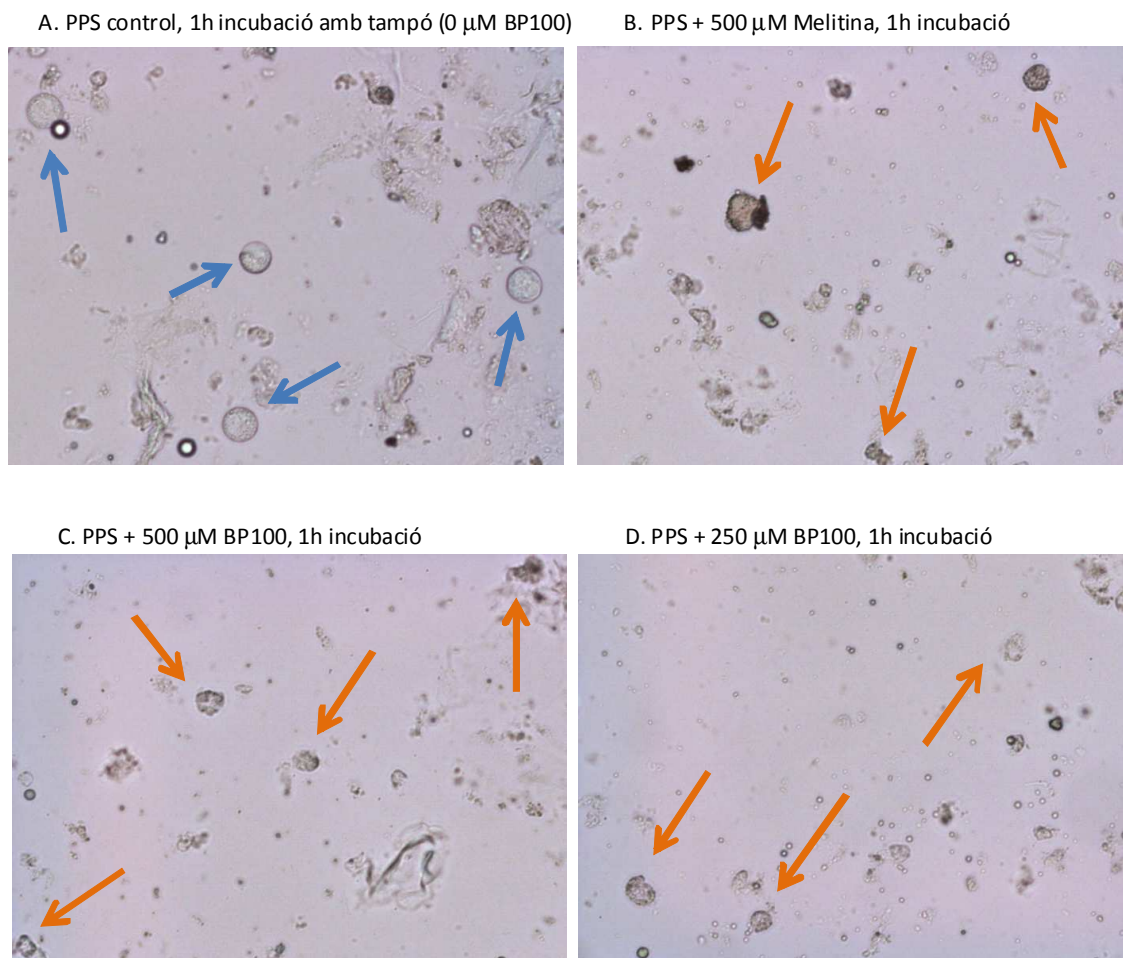


Figura 4.2. Fotografies d'observacions fetes al microscopi òptic i a 20.000 augments. (A) Exemple d'imatges de protoplasts (PPS) viables en el control sense pèptid (fletxes blaves). (B-C-D) Imatges de protoplasts lisats (fletxes taronges).

Quan l'aplicació ha estat a 0 μ M de BP100, els protoplasts es troben en el seu estat normal, amb una forma rodona i turgent, és a dir viables. En canvi, a 500 μ M de BP100 es pot comprovar com el pèptid ha afectat a les cèl·lules, danyant la membrana i lisant la cèl·lula. Tot i que només es mostra la fotografia presa a un camp es van analitzar molts camps diferents assegurar el màxim possible que el pèptid provocava aquests danys i que no s'hi trobaven protoplasts sense ser danyats. En el cas de la concentració de 500 μ M, amb els resultats obtinguts es pot constatar que BP100 és fitotòxic. D'altra banda, es va assajar el BP100 a les concentracions de 100 μ M i 250 μ M, veient també una afectació similar a la de 500 μ M. Per tant, la relació dosi de pèptid – lisi dels protoplasts no permet diferenciar entre les diferents concentracions de pèptid amb suficient claredat. Comentar que en alguns casos, determinar la

lisi ha estat difícil. Potser la utilització d'algun tipus de colorant específic per a cèl·lules viables o no viables, hagués facilitat la interpretació dels resultats.

IV.2 DETERMINACIÓ DE LA FITOTOXICITAT DE PAMs MITJANÇANT EL TEST DE GERMINACIÓ

Per tal de determinar la fitotoxicitat dels pèptids estudiats, s'ha emprat un altre assaig, el test de germinació en llavors. En aquest experiment, el material vegetal de partida són les llavors, que un cop desinfectades tal com s'explica a material i mètodes, es fan germinar en presència dels pèptids a diferents concentracions. Transcorreguts 7 dies de l'aplicació del pèptid en les llavors, es procedeix a mesurar la llargada del brot germinat, que està directament relacionada amb la concentració i el pèptid emprat com es veurà més endavant. D'altra banda, també s'han analitzat les arrels formades a la llavor, tot i que es va acordar, mesurar únicament la mida del brot ja que la mesura de l'arrel era dificultosa (hi ha arrel principal i arrels secundàries) i no es notaven dissemblances entre llavors.

Prèviament al meu treball, es va realitzar un assaig de fitotoxicitat amb el pèptid model BP100 i la Melitina amb llavors Sènia per tal de comparar el dany que provocava cada pèptid en relació al control negatiu, es a dir a llavors germinades en aigua. Cal dir, que la Melitina és un pèptid molt fitotòxic, i per això es va utilitzar el control positiu.

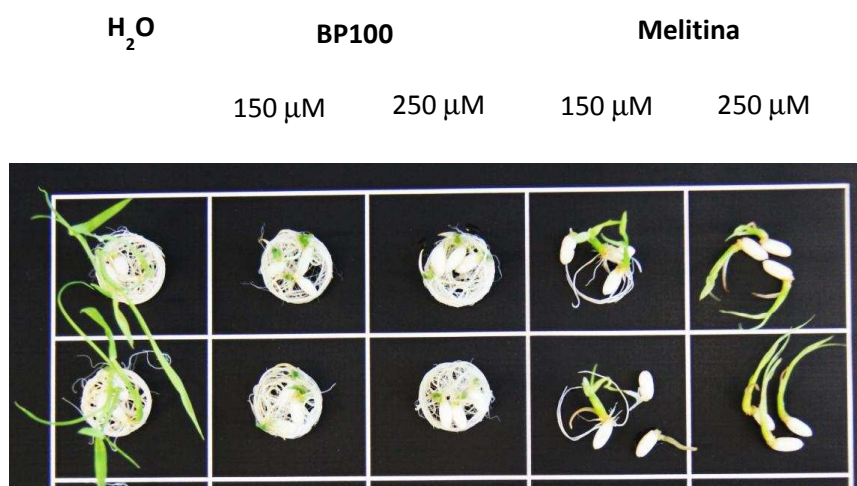


Figura 4.3: Creixement del brot i les arrels en aigua (control negatiu), BP100 i Melitina a 150 μM i 250 μM .

Com es pot veure a la Figura 4.3, els dos pèptids són fitotòxics a les dues concentracions emprades, i fins i tot és difícil distingir canvis entre elles. Això segurament és degut a que s'han aplicat concentracions molt elevades i per això no hi ha dessemblances. El que sí s'observa amb facilitat, és el tipus d'afectació provocat per a cada pèptid. La toxicitat del BP100 afecta el creixement del brot i no afecta les arrels, que morfològicament semblen iguals que les que han germinat en aigua. De manera inversa, en la Melitina hi ha creixement del brot, tot i que sempre inferior que en el control negatiu, però el desenvolupament de les arrels és pràcticament nul.

Aquest assaig va permetre establir les concentracions dels pèptids en què vaig treballar, de manera que es van aplicar concentracions menors a 150 µM, per determinar la dosi mínima que representés un canvi en el creixement de la llavor. En l'assaig anterior, només es pot evidenciar que els dos pèptids són fitotòxics, però el que s'ha buscat és la concentració mínima d'afectació de cada pèptid.

Per tal de complir amb l'objectiu proposat, durant la meua estada al laboratori vaig preparar les dilucions dels diversos pèptids en què es va treballar en aquest assaig, proporcionats pel LIPPSO. Aquest assaig sí que es va dur a terme amb el BP100 i derivats. Després dels dies establerts per avaluar el creixement, es va mesurar la llargada del brot per relacionar-la amb la toxicitat de cada pèptid. Els resultats es mostren a la taula següent:

Taula 4.1: Mesura de la llargada del brot (cm) i la seva desviació estàndard a les diferents concentracions de cada pèptid assajades.

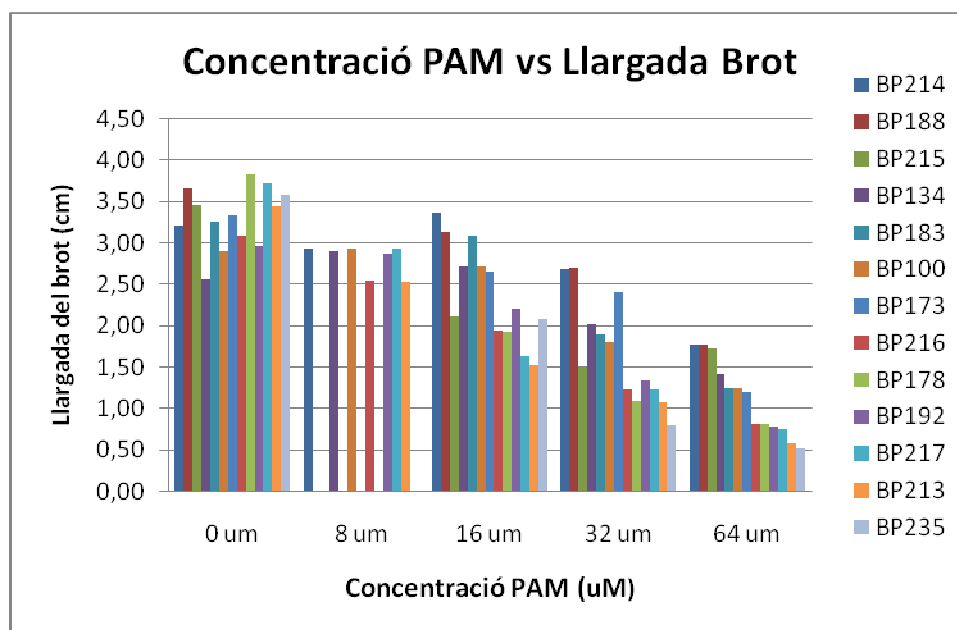
Pèptid expressat	Concentració pèptid (µm)				
	0 µm	8 µm	18 µm	32 µm	64 µm
BP100	2,9 ± 0,26	2,93 ± 0,39	2,72 ± 0,35	1,80 ± 0,71	1,25 ± 0,60
BP134	2,56 ± 0,53	2,9 ± 0,31	2,72 ± 0,47	2,03 ± 0,68	1,42 ± 0,73
BP192	2,96 ± 0,27	2,88 ± 0,36	2,21 ± 0,67	1,34 ± 0,29	0,78 ± 0,41
BP213	3,44 ± 0,24	2,53 ± 0,57	1,52 ± 0,55	1,08 ± 0,43	0,58 ± 0,13
BP214	3,22 ± 0,24	2,94 ± 1,02	3,36 ± 0,30	2,69 ± 0,93	1,78 ± 0,55
BP216	3,1 ± 0,30	2,54 ± 0,42	1,94 ± 0,56	1,23 ± 0,25	0,82 ± 0,20
BP217	3,73 ± 0,34	2,93 ± 0,52	1,63 ± 0,55	1,24 ± 0,42	0,75 ± 0,17
BP183	3,26 ± 0,49	n.r.	3,09 ± 0,27	1,9 ± 0,80	1,25 ± 0,72
BP188	3,66 ± 0,25	n.r.	3,13 ± 0,48	2,7 ± 0,68	1,77 ± 0,44
BP173	3,33 ± 0,46	n.r.	2,65 ± 1,23	2,41 ± 0,50	1,2 ± 0,48
BP178	3,83 ± 0,25	n.r.	1,93 ± 0,48	1,09 ± 0,27	0,81 ± 0,40
BP215	3,46 ± 0,24	n.r.	2,1 ± 0,98	1,5 ± 0,56	1,73 ± 0,37
BP235	3,58 ± 0,31	n.r.	2,08 ± 0,69	0,8 ± 0,21	0,53 ± 0,23

(n.r.) indica assaig no realitzat.

Com es pot observar, per a cada pèptid la mida del brot varia en funció de la concentració del pèptid. Es van realitzar diversos controls negatius amb aigua, amb l'objectiu de conèixer la germinació natural de la llavor i poder-ho comparar amb la resta d'experiments. La llargada del brot és major a concentracions més petites i a mesura que es va augmentant, el creixement del brot disminueix.

Tal com s'ha comentat a material i mètodes, s'han agrupat els pèptids en dos grups per facilitar el procediment de l'assaig i la manipulació de les llavors i dels pèptids, així com per evitar utilitzar pèptids sintetitzats químicament si no es preveia necessari. El disseny dels grups es va fer sabent amb anterioritat que el grup 1 de pèptids eren potencialment més fitotòxics que els del grup 2, ja que el % d'obtenció de plantes que expressaven aquests pèptids oscil·lava entre <1% i el 10%, mentre que els del grup 2 es situava entre el 20 i el 50 %. Així, es va eliminar la concentració de 8 μM en els pèptids del grup 2 ja que si no eren potencialment menys fitotòxics, se'n necessitaria una concentració més elevada per a determinar la concentració mínima d'afectació.

Per facilitar la visualització dels resultats es van representar els valors de la taula 4.1 en una gràfica.



Gràfica 4.1: Creixement del brot d'arròs a diferents concentracions de pèptids..

Aquest gràfic ha estat dissenyat i ordenat pensant amb la mida del brot a la concentració de 64 μM , des del més alt al més baix. L'ordre dels pèptids en la resta de concentracions ha estat el mateix. D'aquesta manera es pot apreciar més fàcilment l'afectació que genera cada pèptid a

les diverses concentracions i el patró d'afectació que segueixen tots els pèptids a una mateixa concentració.

S'observa que les llavors que han tingut la llargada màxima del brot han estat les controls (0 μ M de PAM). A 8 μ M i 16 μ M els brots més desenvolupats han estat en contacte amb el BP214, mentre que els menys crescuts, els amb el BP213. Si ens fixem en la concentració de 16 μ M, continua essent el BP214, el pèptid que presenta menys afectació i el BP213, com el que més. En canvi a 32 μ M i 64 μ M, el BP235 és el que ha permès un menor creixement a la llavor i el BP214 BP188 els que més.

No hem de deixar en segon terme, que tots els pèptids estudiats són derivats del pèptid model BP100 i per tant es poden fer dos tipus de comparacions. Per una banda, es pot comparar per a cada pèptid el valor obtingut a cada concentració amb l'obtingut al control. I per l'altre, comparar els valors amb els del pèptid model, el BP100 (Figura 4.4). Tot i que s'intueix en el gràfic i en el cas concret de BP213 també a la figura, que tots els pèptids tenen un cert grau de fitotoxicitat (sobretot a la concentració més alta), es va dur a terme una anàlisi estadística per a veure si aquestes diferències observades eren significatives.

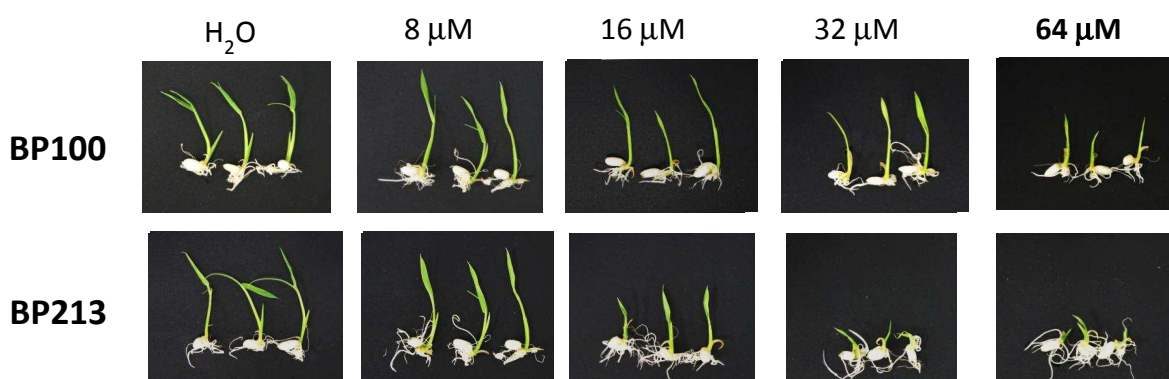


Figura 4.4: Desenvolupament del brot a les concentracions de 0 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 32 μ M i 64 μ M de BP100 i BP213.

Es va realitzar l'anàlisi estadística ANOVA d'un factor a partir de la comparació de mitjanes, d'aquesta manera es determina el nivell de significació de la semblança entre grups de mostres.

Inicialment es va voler saber quina era la concentració mínima d'afectació de la germinació de cada pèptid. Es va escollir un nivell de significació ($\alpha=0.05$). Per a cada pèptid, es va comparar la mitjana de cada concentració amb els valors del control (0 μ M).

A la taula següent es mostra la concentració mínima d'afectació de cada pèptid i el seu valor-p (taula 4.2).

Taula 4.2: Concentració mínima d'afectació de cada pèptid sobre la llargada del brot d'arròs, i el valor-p corresponent

Mida pèptid (nº aa)	Pèptid	Concentració mínima d'afectació (µM)	valor- p
11	BP100	64	0,000
15	BP134	64	0,000
15	BP214	64	0,001
26	BP183	32	0,000
28	BP188	32	0,000
29	BP173	64	0,008
29	BP178	16	0,000
30	BP192	16	0,000
30	BP213	8	0,000
31	BP215	16	0,001
45	BP216	8	0,000
48	BP217	8	0,000
48	BP235	16	0,000

L'anàlisi estadística indica que tots els pèptids són fitotòxics a la concentració més elevada assajada, 64 µM (valor-p < 0,05). Si bé hi ha pèptids que a concentracions més baixes ja mostren afectació. Segons aquesta anàlisi doncs, els pèptids menys fitotòxics serien: BP100, BP134, BP214 i BP188 i els més fitotòxics ja que mostren afectació a concentracions més baixes: BP213, BP216 i BP217. No es pot descartar que BP215 i BP235 també formessin part dels més fitotòxics. S'ha de recordar que en el disseny de l'experiment no es va incloure una concentració inferior a 16 µM. L'ANOVA acoblada al test de Tuckey (prova post-hoc) genera subconjunts homogenis. Amb aquesta eina s'ha analitzat, per a cada pèptid, la correlació dosi-nivell d'afectació. Així s'ha determinat que existeix certa correlació entre aquests dos paràmetres, tot i que per exemple en el cas de BP215, no es mostren diferències entre les tres concentracions assajades; i en el cas d'altres pèptids com BP178, BP183, BP192, BP217 i BP235, l'afectació de 64 µM no difereix significativament de la de 32µM. De l'anàlisi també es dedueix que segons aquest assaig 9 dels 12 derivats de BP100 són més fitotòxics que el pèptid del qual deriven (BP100). Finalment, comentar que si es compara el grau de fitotoxicitat amb la mida del pèptid, s'observa que poden estar relacionats, encara que segurament hi ha altres

factors que poden ser importants, especialment la pròpia seqüència del pèptid, ja que s'observa que pèptids de mida molt semblant presenten nivells de fitotoxicitat diferents. Aquest mètode doncs permet observar de toxicitat entre els pèptids a baixes concentracions, i es pot considerar reproduïble, ja que la desviació estàndard dels replicats és baixa. A més el seu ús no comporta gaires dificultats.

IV.3 DETERMINACIÓ DE LA FITOTOXICITAT DE PAMs MITJANÇANT PLANTES DE TABAC

En l'últim assaig d'avaluació de la fitotoxicitat dels PAMs, es van utilitzar plantes de tabac com a material vegetal de partida. Un cop seleccionades com s'indica a l'apartat de material i mètodes s'hi van infiltrar els pèptids sintètics. Durant el procés d'infiltració no es va treballar en condicions estèrils atès que s'infiltra un material vegetal que no és estèril. Al cap de 2 dies de la infiltració, la zona de lesió ja era visible i es van poder avaluar els diàmetres de lesió provocats pels diferents pèptids testats.

Per tal d'establir les condicions de treball dels pèptids es va tenir en compte un assaig fet a priori en què els pèptids utilitzats van ser el BP100 a les concentracions de 100 µM, 250 µM i la Melitina a 100 µM.

En la figura 4.5 s'il·lustra la lesió causada a les diferents concentracions de BP100 i Melitina.

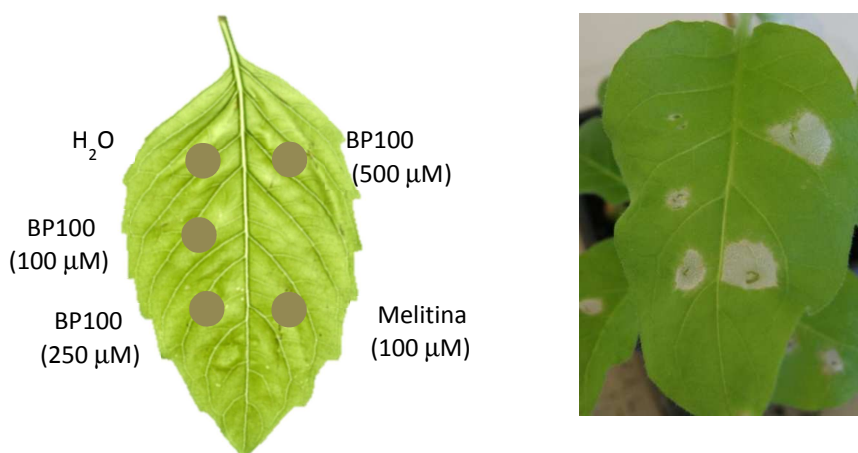


Figura 4.5: Representació dels punts d'infiltració (esquerra) i imatge real de l'àrea de lesió en fulla de tabac.

Tal com es pot apreciar a la figura anterior i pel que s'ha comentat, la Melitina és un pèptid molt fitotòxic. Aquest assaig ho demostra clarament. A més l'assaig manifesta que infiltrar

directament pèptid al mesòfil de la fulla és vàlid per observar fitotoxicitat. A la concentració de 100 μM , la Melitina provoca una àrea de lesió més gran que BP100 a les concentracions de 250 μM i 500 μM . Veient el resultat obtingut de la Melitina, si es compara amb el BP100 a 500 μM , es veu que la lesió és similar. Per tant, 500 μM sembla una concentració molt elevada per ser aplicada en els derivats de BP100. Llavors, es va decidir disminuir les concentracions a testar, ja que el ens interessava observar diferències entre els pèptids. Les concentracions utilitzades van ser, 50 μM , 100 μM i 150 μM . A la figura 4.6 es mostra un exemple d'un dels resultats obtinguts.



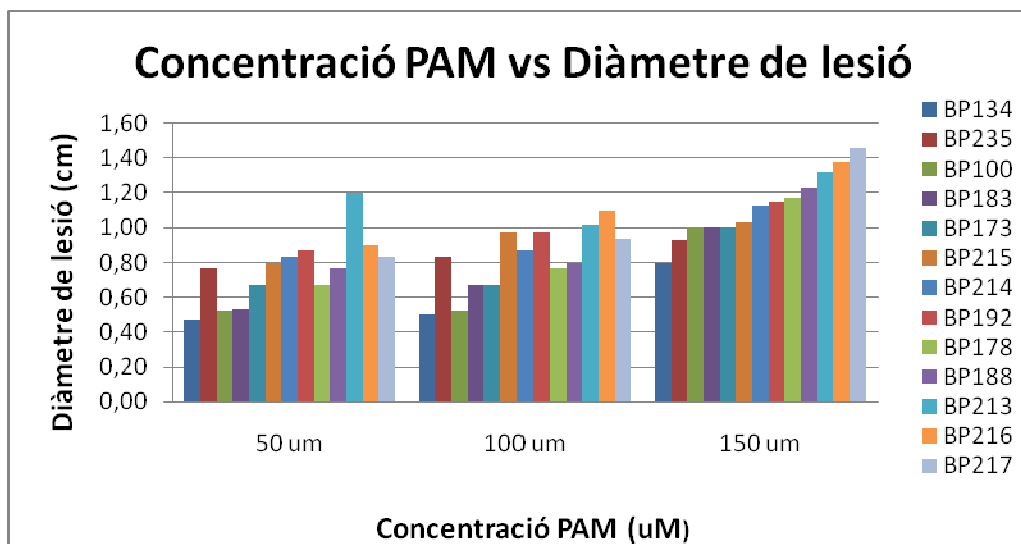
Figura 4.6: Exemple d'un replicat biològic on es mostren les àrees de lesió de diferents PAMs a diferents concentracions (esquerra). A la dreta disseny de l'experiment on s'indiquen els pèptids assajats.

En la taula següent (Taula 4.3) es mostra la mitjana dels diàmetres (cm) de lesió dels tres replicats biològics per a cada pèptid i concentració. També s'indiquen les desviacions estàndard.

Pèptid	Concentració pèptid (μM)		
	50 μM	100 μM	150 μM
BP100	$0,52 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,10$
BP134	$0,47 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,09$	$0,80 \pm 0,00$
BP192	$0,57 \pm 0,15$	$0,97 \pm 0,16$	$1,15 \pm 0,12$
BP213	$1,2 \pm 0,14$	$1,02 \pm 0,07$	$1,32 \pm 0,10$
BP214	$0,83 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,12$	$1,13 \pm 0,15$
BP216	$0,9 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,14$	$1,38 \pm 0,07$
BP217	$0,83 \pm 0,15$	$0,94 \pm 0,07$	$1,46 \pm 0,21$
BP183	$0,53 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,10$
BP188	$0,77 \pm 0,12$	$0,80 \pm 0,10$	$1,23 \pm 0,15$
BP173	$0,67 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,10$
BP178	$0,67 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,15$
BP215	$0,8 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,15$	$1,03 \pm 0,06$
BP235	$0,77 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,12$	$0,93 \pm 0,12$

Com es pot contemplar a la taula anterior, el diàmetre de la lesió varia en funció de la concentració de pèptid testat, i de cada pèptid. Tot i així, en general, a concentracions menors el diàmetre de la lesió és més petit.

Amb l'ajuda de la gràfica següent i les gràfiques dels annexos podem comparar com es comporta cada pèptid a les diferents concentracions.



Gràfica 4.2: Diàmetre de la lesió en fulla de tabac respecte el PAM infiltrat i la concentració utilitzada.

La gràfica anterior s'ha dissenyat segons la fitotoxicitat dels pèptids a 150 µM, essent el primer pèptid a 150 µM, el menys fitotòxic. A partir d'aquesta disposició, la resta de concentracions han estat ordenades d'igual forma.

Considerant totes les dades es pot dir que tots els pèptids són fitotòxics segons aquest assaig, ja que tots provoquen lesió a la fulla de tabac. El control d'aigua no produeix lesió (veure un exemple a figura 4.6).

Si es compara estadísticament (ANOVA) cada un dels derivats de BP100 amb BP100, s'observa que els derivats de BP100 tenen igual o major fitotoxicitat que el pèptid model.

L'anàlisi estadística de cada pèptid a les diferents concentracions mostra que en la majoria dels casos el diàmetre de lesió a 50 µM i 100 µM no és diferent (mitjana valors $p > 0,05$). En la majoria dels pèptids, el canvi significatiu es troba a 150 µM ja que el test *post-hoc* de Tuckey forma dos subconjunts que són estadísticament diferents (valor- $p < 0,05$). Remarcar però que

alguns pèptids no segueixen aquest patró. És el cas de BP215 i BP235 on no s'observen diferències entre les concentracions assajades. De tots aquests resultats es dedueix doncs, que si bé si que es pot detectar fitotoxicitat, amb aquest model vegetal i amb les concentracions utilitzades és difícil establir una correlació concentració pèptid-lesió, com també ho és classificar els pèptids segons el nivell de toxicitat. Tot i així, l'anàlisi ANOVA de les dades de tots els pèptids a 50 μ M i 150 μ M indica que a la concentració de 50 μ M, BP134, BP183, BP173 i BP178 presenten la mateixa fitotoxicitat que BP100. S'agrupa en un subconjunt totalment diferent, BP213, que a aquest concentració seria el més fitotòxic. Els altres pèptids presenten fitotoxicitats intermitges difícils de diferenciar. A la concentració de 150 μ M, l'agrupament és el següent: BP134, BP235, BP173, BP183 i BP215 presenten la mateixa fitotoxicitat que BP100; i BP217, BP216, BP213 i en cert grau BP188 serien els més fitotòxics.

V. DISCUSSIÓ GENERAL

V. DISCUSSIÓ GENERAL

Un dels objectius generals d'aquest treball ha estat analitzar la fitotoxicitat d'onze pèptids antimicrobians derivats de BP100, utilitzant tres mètodes alternatius d'estimació de toxicitat sobre cèl·lules vegetals. En tots tres casos, l'aplicació dels PAM ha estat exògena i s'han utilitzat pèptids sintetitzats químicament. A partir dels resultats inicials amb aigua, el propi BP100 i el pèptid fortament tòxic Melitina, s'han determinat les concentracions més adequades de derivats de BP100 per assajar amb cada un dels mètodes. A continuació es presenten els principals avantatges i inconvenients de cada un d'ells, alhora que es discuteixen els resultats de fitotoxicitat obtinguts per als derivats de BP100 estudiats.

Utilització de protoplasts: aquest assaig va ésser escollit per la tipologia de les cèl·lules, sense paret cel·lular, ja que representa un bon model per avaluar la possible fitotoxicitat dels pèptids sobre cèl·lules vegetals que els han de sintetitzar. En eliminar la barrera protectora (paret cel·lular), semblaria que el pèptid es pot introduir dins la cèl·lula amb major facilitat, de manera que seria una simulació més realista del dany que pot provocar el pèptid quan la cèl·lula el sintetitza de manera endògena (el cas de les plantes transgèniques).

El mètode emprat per tal de degradar la paret cel·lular va ser eficaç, els enzims de la Cellulase RS i el Maceroenzim van aconseguir eliminar-la. Si bé el percentatge de protoplasts viables va ésser correcte (~ 85%), no ho va ser el nombre de protoplasts obtinguts i això va dificultar bastant l'experiment i la interpretació dels resultats. El poc rendiment en el procés d'aïllament de protoplasts, però, no està relacionat amb l'anàlisi de pèptids sinó amb la tècnica experimental en sí.

Tot i així, aquesta tècnica ens ha permès constatar que el pèptid model BP100 és tòxic a les concentracions assajades, que per altra banda són elevades. Seria convenient trobar un altre mètode que fos més sensible i que aportés canvis més significatius a concentracions més baixes per tal de saber en quin moment el pèptid comença a ser fitotòxic per a les cèl·lules i sobretot per poder comparar el grau de fitotoxicitat de diferents PAMs.

Assaig de germinació: és un mètode que ha demostrat permetre treballar a dosis bastant més baixes que el mètode anterior, és sensible a aquestes concentracions. Per exemple, s'han pogut establir diferències significatives de fitotoxicitat entre 0,8 μM i 16 μM per a alguns derivats de BP100. A més, aquest assaig ha permès diferenciar els tipus de toxicitat de Melitina i BP100, sobre la rel o el brot. Les dades obtingudes mitjançant aquest assaig també revelen que el nivell de fitotoxicitat està relacionat amb la seqüència d'aminoàcids específica de cada pèptid, encara que també hi podria tenir un paper la mida de cadascun. Es podria pensar que aquells pèptids amb cadenes d'aminoàcids més petites són més vulnerables a degradació per part de les proteases i que per tant es necessita una concentració més elevada per a observar un efecte significatiu. Cal recordar, però, que el BP100 ja va ésser seleccionat tenir relativament poca sensibilitat a proteases.

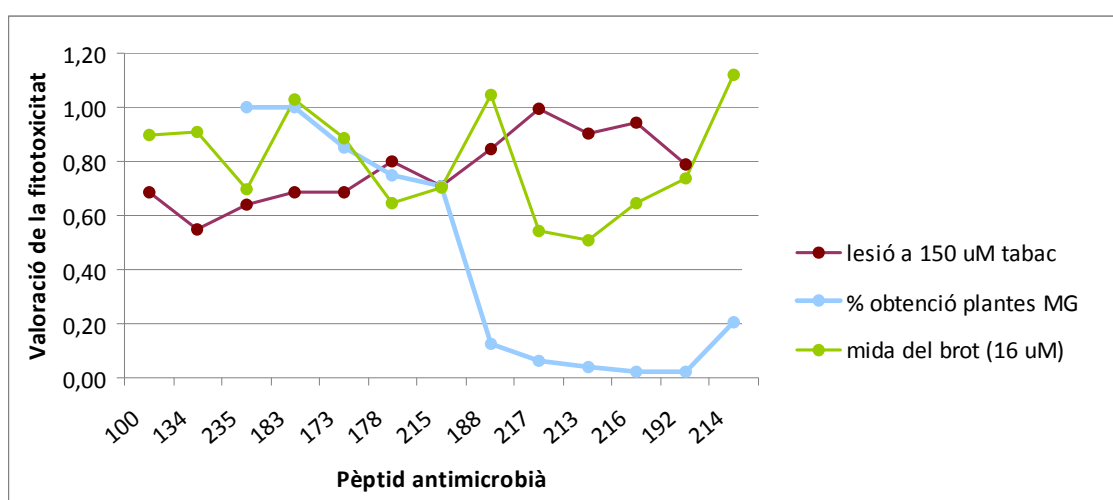
Fitotoxicitat sobre fulles de tabac: el maneig de la infiltració de pèptids químicament sintetitzats al material vegetal és fàcil i simple, i presenta l'avantatge (com el test de germinació) de ser un mètode en què es treballa en plantes *in vivo*. Sovint, la mesura del diàmetre de lesió no és complexa d'interpretar, però en alguns casos, s'ha trobat en què els nervis de la fulla dificultaven la infiltració i per tant la mesura. En les condicions assajades, però, els resultats de fitotoxicitat s'han d'interpretar majoritàriament de forma qualitativa.

Tots els derivats de BP100 assajats han mostrat tenir fitotoxicitat igual o major que el propi BP100, i menor que la Melitina. S'ha pogut comprovar, després de realitzar els diversos assajos, que alguns pèptids semblen potencialment més fitotòxics en un assaig determinat que en un altre. Aquest fet s'explica ja que s'utilitza material vegetal diferent. Per exemple, les característiques morfològiques de la llavor d'arròs són molt diferents a les del mesòfil de la fulla de tabac a les dels protoplasts d'arròs. Com a conseqüència, els pèptids poden actuar de forma diferent sobre aquests materials. S'ha de tenir en compte que es coneix el mode d'acció de pèptids concrets, com la Cecropina A, però aquest no és el cas de la majoria de pèptids. Saber doncs perquè uns pèptids són més fitotòxics que altres o perquè els derivats de BP100 afecten el creixement del brot i no l'arrel és complicat i necessitaria un estudi molt exhaustiu. No era l'objectiu d'aquest treball. En canvi sí que s'ha determinat amb tres mètodes totalment diferents que els derivats de BP100 són fitotòxics.

El treball pretenia també estudiar si els resultats de fitotoxicitat obtinguts permeten predir la possibilitat d'obtenir o no plantes transgèniques que expressin constitutivament aquests pèptids. Seria molt interessant tenir un mètode que permetés avaluar la fitotoxicitat dels PAMs abans de produir una planta transgènica que els expressi. Tal com s'ha comentat anteriorment, això representaria un estalvi de econòmic i de temps.

Així, s'han comparat els resultats de fitotoxicitat dels onze derivats de BP100 obtinguts en aquest treball mitjançant l'assaig de germinació i el d'infiltració de fulles, amb uns resultats obtinguts prèviament en el laboratori en què es van preparar plantes MG que expressessin aquests onze derivats de BP100, i es va calcular l'eficiència de transformació de cadascun d'ells (Nadal et al., enviat; N. Company, comunicació personal) (Gràfica 5.1).

Els dos mètodes que s'han utilitzat en aquest treball per determinar la fitotoxicitat dels onze derivats de BP100, l'assaig de germinació i el d'infiltració de fulles, no semblen bons previsors de la fitotoxicitat sobre plantes transgèniques que produeixen aquests pèptids. En el gràfic que es mostra a continuació es resumeixen els resultats obtinguts en aquest treball, i es comparen amb el percentatge d'obtenció de plantes transgèniques (l'eficiència d'obtenció de plantes transgèniques). En el cas del test de germinació de llavors, s'observen dades discordants: BP188 va permetre créixer fàcilment els brots (llargada de brot elevada), el que indicava poca afectació en la germinació, però gairebé no van poder-se obtenir plantes MG que l'expressessin (l'eficiència de transformació va ser només d'un 6 %). D'altra banda, diferents pèptids que permetien créixer el brot d'arròs fins a mides semblants, mostren eficiències d'obtenció de plantes MG molt diferents.



Gràfica 5.1. Fitotoxicitat dels derivats de BP100 obtinguda mitjançant els assajos de germinació d'arròs, infiltració de fulles de tabac i eficiència en l'obtenció de plantes MG (aquesta darrera, dades cedides per N. Company, UdG).

Respecte als assajos amb planta tabac i tal i com s'ha comentat anteriorment, l'inconvenient és la linealitat és a dir poca diferència de fitotoxicitat mostrada entre els diferents pèptids.

Aquests mètodes, doncs, permeten determinar la fitotoxicitat dels pèptids sota certes circumstàncies (teixits, etc.) però no són adequats per a predir l'eficiència d'obtenció de plantes transgèniques que els expressin de forma constitutiva. En el laboratori s'està assajant la utilitat de mètodes alternatius, com per exemple el grau d'hemòlisi, per predir l'èxit en l'obtenció de plantes MG que expressen derivats de BP100.

VI. CONCLUSIONS

V.I CONCLUSIONS

Aquest estudi ens ha permès extreure les següents conclusions:

- Tot i que l'assaig de fitotoxicitat de PAM mitjançant protoplasts sembla un dels mètodes més interessants per la manca de paret cel·lular, que pot dificultar l'accés del pèptid a la membrana cel·lular o al citoplasma, només hem pogut constatar el fort impacte de BP100 sobre els protoplasts a concentracions elevades. Caldria millorar l'obtenció de protoplasts i testar-ne la viabilitat a concentracions inferiors de PAMs.
- L'assaig de germinació permet constatar la toxicitat dels pèptids, i diferenciar-ne el tipus (afectació de la rel o el brot) i el nivell (a través de la relació dosi – efecte). Tant el BP100 com tots els derivats de BP100 assajats afecten el brot.
- L'assaig de fitotoxicitat en tabac és un mètode de fàcil utilització, però només permet avaluar de forma qualitativa la toxicitat dels pèptids a elevades dosis.
- Tots els derivats de BP100 assajats han mostrat tenir fitotoxicitat igual o major que el propi BP100, i menor que la Melitina.
- No s'ha pogut correlacionar el valor de fitotoxicitat dels derivats de BP100 obtingut amb aquests assajos, amb la possibilitat d'obtenir plantes transgèniques que expressin aquests pèptids.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- **Agrios, G.N.** 1998. Plant pathology, 4th ed. Academic Press, San Diego, Calif.
- **Badosa, E., Ferré, R., Planas, M., Feliu, L., Besalú, E., Cabrefija, J., Bardají, E i Montesinos, E.** 2007. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides*. 28:2276-2285.
- **Benítez Burraco, A.** 2005. Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas. *Editorial Reverté*.S.A. Barcelona.
- **Biesgen, C., Hillebrand, H. i Herbers. K.** 2002. Technical enzymes produced in transgenic plants. *Phytochemistry Reviews*. 1:79-85.
- **Boman, H.G.** 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:61-92.
- **Boman, H.G.** 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*. 254:197-215.
- **Castañeda, C.J., Ortega, R.J.A., Marcela, V.A.M., Aquino, A.A., Serafín, L.J., Estrada, P.S., Estrada, I.** 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con multiples funciones. Artículo de revision. 18:16-29.
- **Cavallerín, L., Andreu, D. i San Segundo, B.** 1998. Cecropin A-derived Peptides Are Potent Inhibitors of Fungal Plant Pathogens. *The American Phytopathology Society*. 11(3):218-227.
- **Chawla, H.S.** 2009. Introduction to Plant Biotechnology, 3th ed. *Science Publishers*, New Hampshire.
- **Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R.B. i Mauzerall, D.** 1998. Channelforming peptides cecropin and related model compound incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. 85:5072-5076.
- **Daniell, H., Streatfield, S.J I Wycoff, K.** 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceutical and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*. 6:219-226.

- **Galan, O., Garcia, I.E., Gago, C.L., González, R.V.** 2005. Plantas biofactoría. Informe de Vigilancia Tecnológica. *Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica*. Parque Científico de Madrid.
- **Hancock, R.E.W.** 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1:156-164.
- **Hancock, R.E.W. i Diamond, G.** 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*. 8(9):402-410.
- **Imamura T, Yasuda M, Kusano H, Nakashita H, Ohno Y, Kamakura T, Taguchi S, Shimada H.** 2010. Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. *Transgenic Res.* 19(3):415-24.
- **Jacyn, B., Mock, N.M.** 1994. An improved method cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39:7-12.
- **Jan PS, Huang HY, Chen HM.** 2010. Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. *Appl Environ Microbiol.* 76(3):769-75.
- **Lico, C., Santi, L., Twyman, R.M., Pezzotti, M., Avesani, L.** 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Rep.* 31:439-451.
- **Ludevid, M.D., Torrent, M.** 2010. Biofactories: Producció de proteïns recombinants en plantes. Treball de la SCB. 61:73-91.
- **Montero, M.** 2007. Producció de pèptids antimicrobians en plantes transgèniques: estratègia de clonatge. TIR, UdG.
- **Montesinos, E. i Bardají, E.** 2008. Syntetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control. *Chem. Biodivers.* 5:1225-1237.
- **Muramoto N, Tanaka T, Shimamura T, Mitsukawa N, Hori E, Koda K, Otani M, Hirai M, Nakamura K, Imaeda T.** 2012 Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Rep.* 31(6):987-97.
- **Nadal, A., Montero, M., Company, N et al.** Constitutive expression of transgenes encoding derivatives of the synthetic antimicrobial peptide BP100: impact n rice host plant fitness. Enviat.
- **Nizet, V.** 2006. Antimicrobial peptides resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8:11-26.
- **Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S y Reddy SV.** 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances.* 29, 210–222.

- **Pérez, K.M i Albores, F.V.** 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*. 27(1):21-27.
- **Saladrigues, J.** 2009. Producció de pèptids antimicrobians en plantes transgèniques: transformació de calls d'arròs I assaigs preliminars d'activitat. TIR, UdG.
- **Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R.** 2003. Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants. *Oxford University Press*.
- **Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M.** 1992. Recombinant DNA, 2nd ed. *Scientific American Books*, New York.
- **Yevtushenko DP, Romero R, Forward BS, Hancock RE, Kay WW y Misra S.**2005. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. *J Exp Bot.* 56, 1685-1695