# Efecto de la luz ultravioleta A en la capacidad infectiva de *Monilinia* con pétalos de melocotonero "*Merril O'Henry*"

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado de Biotecnología

2 de Septiembre 2019

Tarragona

Dirigido por Núria Vall-llaura Espinosa

Tutorizado por Maria Montserrat Poblet Icart



**UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI** 

Ángela Cava Camí

# Índice

D	atos de	el centro	1
A	gradec	imientos	1
Re	esume	n	2
1.	Intr	oducción	3
	1.1.	Producción mundial de fruta de hueso	3
	1.2.	Podredumbre marrón	3
	1.2.	1. Ciclo de la enfermedad	4
	1.2.	2. Factores ambientales que favorecen la infección de <i>Monilinia</i>	6
	1.2.	3. Factores de la postcosecha que afectan en la infección de <i>Monilinia</i>	7
	1.3.	Medidas actuales en precosecha y postcosecha	7
	1.4.	Interacción huésped-patógeno	10
	1.4.	1. Mecanismos de virulencia del patógeno	10
	1.4.	2. Factores de resistencia del huésped	11
2.	Hip	ótesis del trabajo γ objetivos	14
3.	Met	todología	15
	3.1.	Material vegetal	15
	3.2.	Patógenos	15
	3.3.	Preparación de los medios de cultivo	15
	3.4.	Mantenimiento y siembra de los hongos	16
	3.5.	Preparación del inóculo	17
	3.6.	Determinación de la germinación	17
	3.7.	Infección del material vegetal	18
	3.8.	Determinación de la incidencia	19
	3.9.	Inoculación de pétalos para el posterior análisis de la expresión génica	19
	3.10.	Trituración y conservación de las muestras	20
	3.11.	Extracción de ARN de los pétalos infectados con M. laxa ML8L	20
	3.12.	Electroforesis de ácidos nucleicos	21
	3.13.	Tratamiento con ADNasas	23
	3.14.	Síntesis de ADN complementario (ADNc)	24
	3.15.	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	25
	3.16	Diseño de genes diana y validación	26

	3.17. Determinación de la temperatura óptir		erminación de la temperatura óptima de hibridación de los primers	26
	3.18. conce	Dete ntrac	erminación de la eficiencia de los primers y determinación de la ción óptima de las muestras para la qPCR	28
	3.19.	Aná	lisis de la expresión génica de las muestras	30
	3.20.	Aná	lisis de los datos	30
4.	Res	ultad	OS	31
	4.1.	Ger	minación en condiciones de luz blanca y UVA	31
	4.2.	Dete	erminación de la incidencia de pétalos infectados	32
	4.3.	Aná	lisis de la expresión génica	33
	4.3.	1.	Obtención de las muestras de ARN	33
	4.3.	2.	Electroforesis del ARN	34
	4.3.	3.	Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los primers	35
	4.3.	4.	Determinación de la cantidad óptima de ADNc	36
	4.3.	5.	Determinación de la eficiencia de los primers	36
	4.3.	6.	Análisis de la expresión génica	37
5.	Disc	cusió	n	39
6.	Con	clusi	ones	46
7.	Aut	oeva	luación	47
8.	Bibl	iogra	fía	48
	Anexc	) 1		52
	1.1.	Tab	las materiales y métodos	52
	1.2.	Figu	ras materiales y métodos	54
	Anexo	2		55
	2.1.	Resu	ultados de la cuantificación de ARN	55

#### Datos del centro

La institución en la que se realizó este estudio es el *"Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries"* (IRTA), localizado en el Parque de Gardeny, Edificio Fruitcentre (25003) en Lleida. El IRTA es una empresa pública de la *"Generalitat de Catalunya"* y a su vez sometida a derecho privado. Actualmente esta institución está formada por un total de 17 centros, 10 de los cuales son propios y los 7 restantes consorciados. Fue fundada por Josep Tarragó y Colominas, y actualmente, desde julio de 2018, el Dr. Josep Usall y Rodié ocupa el puesto de director general. En total disponen de 5 áreas de investigación: Producción Vegetal, Industrias Agroalimentarias, Producción Animal, Economía Agroalimentaria y Medio Ambiente y Cambio Global. En mi caso, formé parte del departamento de Producción Vegetal del subgrupo de Patología de la Poscosecha liderado por Neus Teixidó Espasa. A partir de los datos obtenidos durante la realización de las prácticas, se realizó el siguiente proyecto bajo la supervisión de Rosario Torres Sanchis, Núria Vall-llaura Espinosa y Sandra Serrano Prieto.

#### Agradecimientos

Por una parte me gustaría agradecer al IRTA por proporcionarme todas las facilidades y equipamiento necesario durante la realización de este proyecto. Por otra parte, me gustaría agradecer de forma especial a varias personas que me han aportado todo su esfuerzo y ayuda durante la realización de este trabajo:

- A Neus Teixidó Espasa por dejarme formar parte del grupo.
- A Rosario Torres Sanchis por permitirme a su vez formar parte de estudio y ayudarme en todo momento durante la redacción del trabajo.
- A Núria-Vall-llaura por su gran paciencia y dedicación durante toda la realización de las prácticas, y a su vez, en la redacción del proyecto.
- A Sandra Serrano Prieto por enseñarme perfectamente el proceso de análisis de expresión génica.
- Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia por todo el apoyo que han aportado en todo momento.

#### Resumen

La podredumbre marrón es una enfermedad que afecta principalmente a la fruta de hueso y que está causada por hongos del género *Monilinia* y concretamente por 3 especies: *M. fructigena, M. fructicola* y *M. laxa*. La capacidad de *Monilinia* spp. de sobrevivir durante el invierno y de formar estructuras denominadas momias, le permite ser fuente primaria de inóculo en los años posteriores. Es por ello que actualmente, se utilizan medidas para intentar minimizar las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad. No obstante, es necesario buscar otras alternativas debido a su parcial ineficiencia.

El objetivo de este estudio es analizar el efecto de la luz ultravioleta A (UVA) en la virulencia de *Monilinia* spp. en el proceso de germinación y en su interacción con pétalos de la variedad del melocotonero *"Merril O'Henry"*. Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vitro* de la germinación inoculando cada uno de los patógenos objeto de estudio (*M. laxa* y *M. fructicola*) a diferentes condiciones de luz (blanca y UVA). Además, para analizar el efecto en la interacción pétalo-*Monilinia*, se infectaron pétalos con cada una de las condiciones mencionadas. Posteriormente, se determinó la incidencia y se analizó la expresión de genes de la familia de las pectina metil esterasas (PMEs), unas enzimas degradadoras de la pared celular que podrían actuar como factores de virulencia en *Monilinia* spp..

Los resultados referentes a la germinación demostraron que la luz UVA disminuía el número de conidios germinados. Sin embargo, durante proceso de interacción pétalo-*Monilinia*, le provocaba una mayor virulencia que en parte podría explicarse por un consciente aumento de la expresión génica de las PMEs en condiciones de luz UVA.

Palabras clave: Podredumbre marrón, *Monilinia*, luz ultravioleta A, germinación, interacción patógeno-huésped

#### 1. Introducción

#### 1.1. Producción mundial de fruta de hueso

La fruta de hueso es el nombre que recibe al conjunto de especies del género *Prunus*, y de la familia *Rosaceae* caracterizadas por disponer la semilla protegida por una capa rígida denominada endocarpio. En este grupo se incluyen los melocotones, las nectarinas, las cerezas, los albaricoques, las cerezas y las ciruelas (Mayer et al. 2017). Entre las diferentes especies mencionadas, los melocotones y las nectarinas son las más producidas a nivel mundial por parte de China con un valor de 14,29 MT (millones de toneladas). Además, España ocupa la segunda posición en cuanto a la producción de las mismas (1,8 MT), seguido de Italia (1,25 MT), Grecia (0,94 MT) y Estados Unidos (0,77 MT). Respecto al área cultivada, China es el líder con 781.882 ha (hectáreas), seguido de España (84.219 ha), Italia (67.021 ha), Turquía (46.299 ha) y Estados Unidos (45.0304 ha) (FAOSTAT, 2017).

A su vez, los melocotones y las nectarinas son las especies con mayor producción a nivel estatal, con un 48 % y 32 %, respectivamente. En ambos casos la mayor producción se da en Cataluña seguido de Aragón y Murcia. Cabe destacar, que entre las diferentes provincias de Cataluña, Lleida es la responsable del 89 % del rendimiento en su comunidad autónoma (Avance Anuario de Estadística, 2018).

#### 1.2. Podredumbre marrón

La podredumbre marrón es la responsable de las mayores consecuencias económicas a nivel mundial, y aunque puede aparecer durante la precosecha, afecta de manera importante durante la poscosecha, y mayoritariamente, está provocada por patógenos pertenecientes al género *Monilinia* (Baró-Montel et al. 2019). Las pérdidas económicas asociadas al patógeno *Monilinia* spp se asocian a 1,7 billones de euros anuales. Asimismo, en otros casos, ha sido la responsable de provocar el 80 % de las pérdidas frutícolas durante el periodo de poscosecha (Obi et al. 2018). La mayor parte de estas pérdidas están asociadas al transporte y almacenaje, y ocasionalmente afecta durante su procesado (Villarino et al. 2016).

*Monilinia* es un hongo necrotrofo, es decir, que una vez producida la penetración del hongo a su respectivo huésped, coloniza su tejido para aprovechar los nutrientes con

la finalidad de reproducirse y alimentarse (Garcia-Benitez et al. 2019). De las 35 especies de *Monilinia*, principalmente, se describen 3 patógenos involucrados en esta enfermedad: *Monilinia fructigena*, *M. fructicola* y *M. laxa*, siendo ésta última la mayor causante de podredumbre marrón en Europa (Baró-Montel et al. 2019). Desde 2006, en la zona de Lleida (Cataluña), *M. fructicola* ha reemplazado a *M. fructigena*, coexistiendo con *M. laxa* (Villarino et al. 2016).

Los diferentes patógenos presentan características intrínsecas propias que las diferencian de las demás. *M. laxa* se distingue por poseer conidiósporas de coloración gris verdosa, mientras que *M. fructicola* presenta una coloración amarronada junto a un punteado negro. En cuanto a *M. fructigena* dispone de un color comprendido entre el blanco al gris claro (Figura 1). No obstante, en muchas ocasiones no se puede distinguir con claridad entre *M. laxa* y *M. fructicola*, para lo que es necesario proceder a técnicas moleculares. Entre éstas podemos encontrar el método de detección de hongos mediante microsatélites, y otros basados en polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados, entre otros (Oliveira Lino et al. 2016).



Figura 1. Melocotón infectado por diferentes especies de Monilinia (M. laxa, M. fructicola, M. fructigena) Fotos cedidas por el laboratorio de Poscosecha del IRTA

#### 1.2.1. Ciclo de la enfermedad

*Monilinia* se caracteriza por ser un patógeno policíclico ya que a lo largo del año realiza numerosos ciclos. Su capacidad de sobrevivir durante el invierno le permite infectar en los años posteriores entre las diversas variedades de fruta de hueso mencionadas anteriormente (Casals et al. 2015).

Este patógeno forma estructuras específicas denominadas momias que sirven como fuentes primarias de inóculo y que suelen encontrarse en el suelo, en las ramas o en la fruta (Martini et al. 2014). Estudios previos han demostrado que las momias son capaces de infectar en todos los estadios de formación del fruto, pudiendo incluso estar presentes en su época de floración (Casals et al. 2015). Las momias cuando se encuentran en el árbol son las productoras de las estructuras asexuales (esporodochias) y las esporas (conidias). A su vez, también pueden localizarse en la superficie del suelo donde producen la formación de las estructurales sexuales (apotecia) y las esporas (ascosporas)(Oliveira Lino et al. 2016). Durante la primavera, comienza la esporulación por parte de los micelios y la producción de abundantes conidios (Bernat et al. 2017). Posteriormente, tiene lugar la diseminación de *Monilinia* a través del agua, lluvia, viento, ser humano o a partir de diversos animales, así como insectos y pájaros hasta alcanzar los respectivos huéspedes (Martini et al. 2014).



Figura 2. Ciclo de la podredumbre marrón (Obi et al. 2018)

A continuación, se produce la infección, es decir, la entrada del patógeno en el correspondiente huésped, estableciendo así una relación de parasitismo. Este proceso está formado por tres etapas consecutivas: pre-penetración, penetración, y postpenetración. En la primera fase mencionada, se produce la adhesión de los conidios a la cutícula, el crecimiento del tubo germinativo y la síntesis enzimática para degradar la superficie del huésped (Oliveira Lino et al. 2016). Posteriormente, en la fase de penetración, tiene lugar la formación del apresorio, el desarrollo del tubo germinativo, y la penetración del hongo en el huésped (Usall et al. 2016). Finalmente, en la post-penetración, se observa la colonización del patógeno en la epidermis del respectivo huésped por medio de las hifas y el desplazamiento del mismo hacia la hipodermis y el mesocarpo. Además, se produce la necrosis y la ruptura de la

epidermis acompañada de la degradación celular y de una excesiva esporulación hacia el exterior (Oliveira Lino et al. 2016). Cabe destacar, que hay casos en los que entre la fase de pre-penetración y penetración, se produce una infección latente, que puede ser debida a condiciones climáticas desfavorables o bien a que la infección ocurre en la etapa todavía inmadura del fruto (Garcia-Benitez et al. 2016). Durante el verano, de nuevo las esporas son desprendidas por parte de las partes infectadas y posteriormente son transportadas a nuevos huéspedes, comenzando de nuevo el ciclo (Obi et al. 2018)(Figura 2).

#### 1.2.2. Factores ambientales que favorecen la infección de Monilinia

Para favorecer el desarrollo de la podredumbre marrón por parte de *Monilinia* spp. es necesario que ciertos factores abióticos del entorno se manifiesten. Entre éstos, la humectación y la temperatura (T) son los dos factores más importantes que influyen en la germinación de los conidios, en el desarrollo de la podredumbre y en la esporulación (Bernat et al. 2017). Por lo general, un ambiente con una HR entre el 80 % y 100 % (Villarino et al. 2010) acompañado de lluvia abundante propicia su desarrollo (Martini et al. 2014).

La temperatura juega un importante papel en la supervivencia de *Monilinia* spp. (Bernat et al. 2017). Las tres especies mencionadas son capaces de germinar entre 0 °C y 35 °C, específicamente, siendo la temperatura óptima de 24,5 °C y 19,8 °C para el caso *M. fructicola* y *M. laxa*, respectivamente (Obi et al. 2018). No obstante, ambas cepas no son capaces de germinar ni a temperaturas muy altas (38 °C) ni a menores de 0°C (Martini et al. 2014). Los efectos dañinos visuales de la infección aparecen entre 48-72 horas posteriores a su infección (Garcia-Benitez et al. 2016).

El desarrollo de la misma enfermedad está influenciado por otros factores, así como el pH, que afecta tanto al crecimiento y a la reproducción como a la actividad del patógeno. El crecimiento de *Monilinia* spp. se encuentra favorecido en condiciones ácidas, debido a su intrínsecas características acidófilas. Por ejemplo, en el caso de la infección en nectarinas y melocotones, el pH cambia de 4,45 y 4,5 a 3,9 y 3,75, respectivamente (De Cal et al. 2013).

#### 1.2.3. Factores de la postcosecha que afectan en la infección de Monilinia

La fruta de hueso se caracteriza por poseer una vida relativamente corta durante la poscosecha, que viene determinada por su estado de madurez en el momento de su respectiva cosecha. Una madurez avanzada está relacionada con una mayor decadencia del fruto y a su vez, una escasa madurez del mismo se asocia con una disminución de su calidad en cuanto a su textura y sabor. La susceptibilidad a la podredumbre marrón aumenta durante el periodo de poscosecha, concretamente durante su almacenado y transporte, y provoca daños más severos en comparación con la etapa de precosecha. Otros factores que pueden afectar durante la etapa de la poscosecha son la temperatura, el tiempo de almacenaje y su excesiva manipulación (Bernat et al. 2017).

#### 1.3. Medidas actuales en precosecha y postcosecha

Con la finalidad de controlar la podredumbre marrón e intentar minimizar sus grandes consecuencias económicas, se han desarrollado algunas medidas tanto en precosecha como en poscosecha (Usall et al. 2016).

Durante la precosecha los fungicidas son comúnmente utilizados para controlar la aparición de la podredumbre causada por *Monilinia* en los campos de cultivo (Egüen et al. 2016). Los mejores fungicidas aplicados para controlar esta enfermedad dependen de las condiciones climáticas de la zona (Martini et al. 2014), y a su vez, su utilización depende de la autorización de cada país (Obi et al. 2018). A nivel europeo el uso y la comercialización de los productos fitosanitarios se controla de acuerdo al Reglamento (CE) 1107/2009, en el marco de la Directiva 2009/128/CE y el Real Decreto 1311/2012, este último modificado por el Real Decreto 71/2016.

Sin embargo, el uso de estos fungicidas, en ocasiones no resulta de utilidad para controlar la enfermedad, ya que *Monilinia* puede desarrollar resistencia (Egüen et al. 2016). Esto acompañado de algunos posibles riesgos para la salud y para al medio ambiente causados por los residuos que depositan en los frutos, ha llevado a la búsqueda de otras alternativas de control entre las que se incluyen la utilización de agentes biológicos y el uso de compuestos bioactivos naturales (Martini et al. 2014).

El uso de agentes biológicos para las enfermedades causadas por las especies de *Monilinia* se basa en los biofungicidas, una formulación de diversos microorganismos biológicos vivos. Entre éstos, se encuentra el uso de *Bacillus subtilis* para controlar la infección de *Monilinia* en melocotones y nectarinas (Lastochkina et al. 2019). A su vez, podemos encontrar el biofungicidas EPS125 que contiene *Pantoea agglomerans*, una bacteria gramnegativa utilizada para controlar la podredumbre marrón de los melocotoneros (Mari et al. 2014).

Entre los compuestos naturales bioactivos, se incluyen los derivados de plantas y animales (Martini et al. 2014). Se han desarrollado fungicidas botánicos, entre los que se encuentran los aceites esenciales que se obtienen de plantas, y que se caracterizan por sus grandes propiedades antimicrobianas y antioxidantes, como por ejemplo el aceite de tomillo. A pesar de reducir también la podredumbre marrón causada por *M. laxa* (Cindi et al. 2016), dicho aceite puede afectar negativamente en la calidad frutícola final (Obi et al. 2018). Entre los diversos compuestos derivados de animales se encuentra el chitosan, un polímero de alto peso molecular, sin propiedades tóxicas. Sin embargo, este compuesto tiene la capacidad de inducir resistencia en las frutas (Martini et al. 2014). A su vez, también se aplican otras medidas complementarias que ayudan para controlar la enfermedad, así como la eliminación de frutos infectados o la eliminación de todas las parte visibles infectadas del árbol durante la época de invierno (Martini et al. 2014).

Para el control de *Monilinia* existe la posibilidad de aplicar medidas durante el periodo de poscosecha (Usall et al. 2015). Actualmente, en España está aprobada la comercialización de formulados líquidos como el *"fludioxonil"* y el *"pyrimethanil"* (Obi et al. 2018). Sin embargo, debido a que durante la poscosecha el uso de fungicidas es bastante limitado, en los últimos años se están estudiando otros tratamientos alternativos (Usall et al. 2015).

Los tratamientos físicos están adquiriendo una gran importancia debido al mínimo impacto sobre el medio ambiente y a su vez por la ausencia de residuos en los respectivos frutos (Usall et al. 2016). Por ejemplo, se establecen atmósferas controladas con temperaturas bajas ya que los melocotones y las nectarinas son muy

sensibles a la exposición al calor (Martini et al. 2014)(Usall et al. 2016). Dichas medidas se han establecido para disminuir la aparición de la podredumbre marrón, especialmente durante el almacenaje de la fruta ya que es cuando tienen lugar las mayores pérdidas (Martini et al. 2014). Estas estrategias de control están consideradas como herramientas complementarias y son normalmente utilizadas como medida de mantenimiento de la fruta después de su cosecha (Usall et al. 2016). Otros tratamientos físicos para controlar la podredumbre marrón en los melocotones, incluyen la inmersión en agua caliente y el calor seco. Sin embargo estas medidas, en ocasiones, necesitan ser combinados con otras para aumentar su eficacia. No obstante, a pesar de todo ello, las medidas actuales no son suficientes para evitar las pérdidas frutales. Es por ello que se intentan establecer medidas preventivas alternativas a las actuales (Obi et al. 2018).

Actualmente, se están utilizando diferentes tipos de luz como tratamiento de la fruta durante la poscosecha y evitar así futuras infecciones por parte de los patógenos (Özer Uyar et al. 2018). En concreto se está estudiando la aplicación de la luz ultravioleta (UV) (Özer Uyar et al. 2018).

La luz ultravioleta (UV) es un método físico que puede ser utilizado para controlar las enfermedades fúngicas durante la poscosecha (Özer Uyar et al. 2018). Se pueden distinguir 3 áreas en la porción del espectro de luz UV: la radiación de longitud larga UVA (320-400 nm), la de longitud media UVB (280 nm-320 nm) y la de longitud corta UVC (200-280 nm). La radiación UVC es altamente absorbida a nivel de la capa de ozono, mientras que la UVA y la UVB son capaces de alcanzar la superficie terrestre (Usall et al. 2016). Entre los tipos de radiación UV, la UVC es la más peligrosa, mientras que la UVA es la menos dañina (Surjadinata et al. 2017). Hoy en día la luz UV tiene una gran diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, es usada como tratamiento del agua y como desinfectante del aire y de diversas superficies. A su vez, resulta de una gran utilidad en la desinfección de patógenos en frutas y vegetales (Sethi et al. 2018).

Entre las diferentes longitudes de onda, la UVC posee una gran capacidad germicida en hongos, así como por ejemplo en *Botrytic cinérea, en M. fructicola* y en *M. fructigena* (Özer Uyar al. 2018)(Usall et al. 2016)(Koutchma et al. 2016). Por tanto, es utilizada en

la poscosecha de la fruta como alternativa a los fungicidas químicos actuales con la finalidad de controlar las enfermedades fúngicas de la poscosecha de la fruta. Cuando se administra la cantidad óptima de luz UVC, las frutas desarrollan resistencia a la podredumbre gracias a la activación diversas enzimas clave involucradas en al patógeno, así como las fenilalaninas amonia liasas (PAL) y las peroxidasas. Sin embargo, exposiciones prolongadas puede causar la liberación de nutrientes a través de la superficie del tejido dañado, facilitando así el crecimiento de los patógenos (Sethi et al. 2018). Además, la luz UVC tiene consecuencias negativas en las plantas. Sus efectos dañinos están provocados por los radicales libres potencialmente energéticos que producen. Por ejemplo, puede afectar a la morfología, a la floración, a la fotosíntesis, a la polinización y a la transpiración de las mismas (Castronuovo et al. 2017).

Por tanto, en base a la información mencionada, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para controlar la podredumbre causada por *Monilinia*. Además, el avance de la ciencia gracias a la irrupción de las ómicas proporciona buenas herramientas para estudiar nuevas estrategias alternativas focalizadas en la interacción huésped-patógeno. Entre éstas la observancia de un efecto reductor de la virulencia de *Monilinia*, en su interacción huésped-patógeno, mediante la aplicación de longitudes de onda menores como la luz UVA, podría presentar una alternativa para minimizar la incidencia de la podredumbre marrón.

#### 1.4. Interacción huésped-patógeno

El desarrollo de la podredumbre marrón es el resultado de la interacción entre la fruta y el patógeno (Obi et al. 2018). Recientemente, la realización de la secuenciación de *Monilinia* ha llevado a un estudio más exhaustivo y detallado a nivel génico tanto de los factores de virulencia del hongo como de los mecanismos de defensa del huésped durante su proceso de interacción huésped-patógeno (Naranjo-Ortiz et al. 2018).

#### 1.4.1. Mecanismos de virulencia del patógeno

*Monilinia* spp. en su proceso de infección utiliza diversos factores de virulencia. Primeramente, en la fase de penetración degrada la cutícula externa de la planta por medio de la acción de las cutinasas (Bellincampi et al. 2014). Posteriormente, realiza el ataque a la pared celular de la planta por medio de las enzimas degradadoras de la pared celular (EDPC), principalmente, mediante las enzimas específicas de polisacáridos. Estas enzimas son capaces de alterar la pared celular de la planta correspondiente, una estructura celular formada principalmente por un 90 % de polisacáridos, entre los que las pectinas destacan por ser su mayor componente. Las pectinas hacen referencia a una serie de polímeros que contienen el ácido galacturónico: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I y II (RGI, RGII) y xilogalacturonano (XGA) (Wormit et al. 2018).

*Monilinia* es capaz de actuar sobre los tres elementos principales de la planta de la pared primaria: la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas por medio de diferentes EDPCs (Baró-Montel et al. 2019). La celulosa y la hemicelulosa son degradadas por la acción de las celulasas y hemicelulasas, respectivamente. Además, *Monilinia* también dispone de otras enzimas como las xilanasas que son las responsables de degradar el xilano, descomponiendo así la hemicelulosa de la pared celular de la planta (Garcia-Benitez et al. 2019).

Para llevar a cabo la degradación de la pectina por parte de *Monilinia* spp, se requiere una acción sinérgica de las pectinasas, acompañada a su vez de otras enzimas que facilitan su degradación que pertenecen a diferentes familias de enzimas activas de carbohidratos. Entre éstas destacan : polisacárido liasas (pectato y pectín liasas), glicósido hidrolasas (poligalacturonasas (PG), ramnogalacturonano hidrolasa), y las carbohidrato esterasas (CEs), entre las que se encuentran las pectina metil esterasas (PMEs) y las ramnogalacturonano acetilesterasas (Baró-Montel et al. 2019).

Las PMEs son las responsables de la liberación de los grupos metilos de los grupos carboxilo del ácido galacturónico y están implicadas durante el proceso infectivo de *M. laxa* en la fruta de hueso (Garcia-Benitez et al. 2019). La actividad de PME por parte de la planta y de los patógenos, y el grado de metilesterificación juegan un importante papel en la infección durante la interacción planta-patógeno (Bellincampi et al. 2014).

#### 1.4.2. Factores de resistencia del huésped

Las plantas disponen de diversos mecanismos de resistencia para evitar su colonización por parte de patógenos. Entre éstos podemos encontrar a la primera línea

de defensa que corresponde a la capa de cera epicuticular, que cubre al siguiente nivel de protección, la cutícula (Oliveira Lino et al. 2016). La última barrera de defensa es la pared celular de la planta. Ésta última es la más importante ya que actúa protegiendo a la membrana plasmática, y está formada por tres capas (lámina media, pared primaria y pared segundaria) (Yokoyama et al. 2014). Las extensinas de la pared celular juegan un importante papel en la defensa de la planta. A su vez, durante la presencia de patógenos, la planta lleva a cabo la síntesis de compuestos fenólicos que intervienen en la actividad infectiva del patógeno (Bellincampi et al. 2014).





En respuesta a la activación de las PMEs, las plantas producen metanol como señal de respuesta y activan la expresión de los inhibidores de las EDPCs, concretamente las pectina metil esterasas (PMEIs)(Wormit et al. 2018). Las plantas son capaces de producir otros inhibidores de las EDPCs como los inhibidores de xilano (XI) y los inhibidores de PGs (PGIPs). Cuando los PGIPs interaccionan con las PGs, se induce la acumulación de oligogalacturónidos (OGs), que se unen a los receptores "*Wall Associated Kinase 1*" (WAK1), y activan respuestas de estrés en la planta. Durante la infección también se produce la deposición de lignina y calosa, y la inducción de ROS y peroxidasas (POX) como mecanismo de defensa de la planta (Bellincampi et al. 2014) (Figura 3).

Así pues, atendiendo a todo lo mencionado sería de gran utilidad estudiar el efecto de longitudes de luz UV menos nocivas como la luz UVA en la interacción patógenohuésped para disminuir la incidencia de la podredumbre marrón. Concretamente, analizando su efecto en la expresión de genes de la familia de las pectina metil esterasas. Además, la luz UVA ha sido reportada por otros estudios que es segura, eficaz y que aparentemente no causa daños a la superficie vegetal (Aihara et al. 2014). Así pues, a observancia de un efecto inhibitorio del crecimiento de *Monilinia* mediante estas condiciones podría ser una alternativa frente a las longitudes de onda más dañinas y a su vez presentaría una alternativa frente a las medidas actualmente utilizadas.

#### 2. Hipótesis del trabajo y objetivos

La luz UVA podría afectar a la capacidad infectiva de *Monilinia* en pétalos de las flores de melocotón de la variedad *"Merril O'Henry"*. Para ello, se evaluó el comportamiento de 3 cepas (*M. fructicola* CPMC6, *M. laxa* CPML11 y *M. laxa* ML8L) atendiendo a los siguientes objetivos:

- Determinar el porcentaje de conidios germinados de *M. fructicola* CPMC6, *M. laxa* CPML11, *M. laxa* ML8L bajo diferentes condiciones de luz (blanca y UVA) a diversos tiempos de incubación.
- 2. Comparar la germinación entre las diversas cepas.
- Establecer el grado de incidencia, es decir, el porcentaje de pétalos de melocotón "Merril O'Henry" infectados con M. laxa CPML11 o M. laxa ML8L bajo las mismas condiciones anteriores.
- 4. Comparar la incidencia entre las diversas cepas.
- 5. Analizar la expresión génica de genes de la familia de las pectina metil esterasas (PMEs) de Monilinia en las dos condiciones de luz, y en su posterior interacción con pétalos de melocotón de la variedad "Merril O'Henry". En concreto, analizar la expresión de MIPME1.
- 6. Analizar la expresión génica de *MIPME2* en las mismas condiciones anteriores
- 7. Analizar la expresión génica de *MIPME3* en las mismas condiciones anteriores
- 8. Determinar cuáles de los genes estudiados (*MIPME1, MIPME2, MIPME3*) presentan una mayor expresión en su interacción con pétalos

#### 3. Metodología

#### 3.1. Material vegetal

El trabajo se desarrolló utilizando la variedad de melocotonero *"Merril O'Henry".* Se obtuvieron pétalos de un campo de producción ecológica situado en una finca de Vilanova del Segrià (Lleida) durante la época de plena floración (marzo 2019).

Para la realización de los ensayos se recolectaron diferentes ramas de distintos árboles con flores libres de infecciones aparentes y se trasladaron a las instalaciones del IRTA. Con los pétalos recolectados se realizó la determinación de la incidencia y el análisis de la expresión génica.

#### 3.2. Patógenos

El presente estudio se realizó con el hongo del género *Monilinia*, concretamente, se trabajó con dos especies distintas, *M. fructicola* y *M. laxa*. En el caso de *M. fructicola* se estudió la cepa CPMC6, y para *M. laxa* se analizaron dos cepas distintas, la CPML11 y ML8L, ambas caracterizadas por presentar un aspecto fenotípicamente distinto en condiciones *in vitro*, y por tener diferente grado de virulencia cuando infectan fruta de hueso.

La cepa CPML11 se obtuvo a partir de un cultivo monoespórico aislado de un melocotón infectado de una finca comercial de Sudanell (Lleida) en 2009, mientras que la cepa ML8L se trata de un cultivo monoespórico que se obtuvo de una flor en la misma finca mencionada y durante la misma campaña. Actualmente, se encuentra depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) 21100. Por último, la cepa CPMC6 se trata de un cultivo monoespórico procedente de una infección latente de un melocotón que se obtuvo de una finca en Alfarràs (Lleida) durante la campaña de 2010 (CECT 21105).

#### 3.3. Preparación de los medios de cultivo

Para poder sembrar y hacer crecer los hongos, se preparó el medio de cultivo sólido en placas de Petri basado en Patata Dextrosa Agar (PDA) (Biokar Diagnosis, 39 g/L) PDA suplementado con tomate (Anexo 1, Tabla 1).

Para la preparación del medio se siguieron los siguientes pasos:

- Se pesaron las cantidades correspondientes de agar y PDA en una botella de 500 mL juntamente con el volumen correspondiente de agua Milli-Q.
- 2. Se autoclavaron a 121 ºC durante 15 minutos para esterilizar el medio.
- 3. Se atemperaron las botellas en un baño maría a 48 ºC.
- Se añadió el volumen de tomate correspondiente en una cabina de flujo para asegurar la esterilidad del proceso.
- Se distribuyó el medio preparado en las diferentes placas de Petri, añadiendo aproximadamente unos 18 – 20 mL en cada placa.
- 6. Se dejó secar durante una hora en la misma cabina.
- 7. Finalmente, las placas se mantuvieron a 4 ºC hasta el momento de uso.

A su vez, también se realizaron placas de PDA sin la suplementación con tomate siguiendo la misma metodología, pero exceptuando la adición del tomate.

#### 3.4. Mantenimiento y siembra de los hongos

El grupo de Patología de la Poscosecha del IRTA dispone de una colección de patógenos que se mantienen conservados en 20 % glicerol a -80 ºC.

A partir de dichas colecciones, los patógenos se activaron sembrando una gota de 10 µL de cada suspensión de glicerol conteniendo hongo en placas de PDA suplementado con tomate (apartado 3.3). Posteriormente, se dejaron crecer en una estufa en condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a 25 °C y 18 °C, respectivamente para favorecer la esporulación. Después de 7/9 días, las placas ya crecidas y activadas, se resembraron en nuevas placas de PDA suplementado con tomate. Para ello, se rascó una pequeña cantidad de esporas de la placa madre y se sembró por contacto en una nueva placa. Igualmente, se dejó crecer durante 7 días en condiciones de fotoperiodo. Cabe destacar que en las placas en las que se quiso testar el efecto de la luz se incubaron en las mismas condiciones de fotoperiodo pero bajo luz UVA.

A partir de estas placas se prepararon los inóculos para la posterior infección. En todos los casos se trabajó en condiciones de esterilidad usando material esterilizado y trabajando en cabinas de flujo para evitar el crecimiento de hongos contaminantes no deseados.

#### 3.5. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo para la posterior infección del material vegetal, se realizó partiendo de las placas crecidas durante 7 días en condiciones de luz blanca y UVA en PDA suplementado con tomate. La superficie de la placa se frotó con una punta estéril y con ayuda de H<sub>2</sub>O conteniendo 0,01 % (w/v) Tween 80. Una vez obtenida la suspensión de conidios se realizó una filtración con una gasa estéril para eliminar algunas de las impurezas del inóculo, así como algunas estructuras micelares o restos de agar. El recuento de conidios se realizó en un hemocitómetro, específicamente en una cámara Thoma. En nuestro caso, se contabilizaron los conidios presentes en los 40 cuadrados que componen las dos diagonales para cada uno de los cuadrantes centrales, contabilizando un total de 80 cuadrados (Anexo 1, Figura 4).

$$[Inóculo] = \frac{Número \ de \ conidios \ de \ las \ diagonales}{Número \ total \ de \ cuadrados \ contados} 4 \cdot 10^6$$
(Ecuación 1)

Mediante el uso de la fórmula anterior (Ecuación 1), se calculó la concentración obtenida del inóculo y se diluyó con H<sub>2</sub>O y 0,01 % (w/v) Tween 80 para obtener la concentración deseada. Para el caso del análisis de la germinación, y para la inoculación de pétalos, se prepararon los inóculos a una concentración de  $1\cdot10^5$  conidios/mL y  $5\cdot10^4$  conidios/mL, respectivamente.

#### 3.6. Determinación de la germinación

Para determinar la germinación para cada una de las cepas de *Monilinia* en las diferentes condiciones de luz, se siguieron los siguientes pasos:

1. En placas de PDA se sembraron un total de 15 gotas de 10  $\mu$ L (5·10<sup>4</sup> conidios/ml) para cada una de las inoculaciones de las cepas preparadas anteriormente (apartado 3.5). Las gotas estaban suficientemente separadas entre ellas y distribuidas por toda la placa. Se sembraron un total de 6 placas para cada una de las tres cepas (18 en total), ya que se prepararon 3 réplicas

(1R, 2R, 3R) y cada una de ellas en dos condiciones de luz diferente (blanca y UVA).

- Posteriormente, las placas se incubaron en las condiciones de luz de interés (blanca o UVA) a 25 ºC, durante diferentes tiempos de incubación: 2 horas, 4 horas y 6 horas.
- 3. Se extrajeron 3 discos de 5 mm de grosor de medio mediante perforación con el uso de una punta estéril donde previamente se había inoculado la gota con el hongo para cada una de las réplicas (1R, 2R, 3R) a cada uno de los tiempos mencionados. Los discos obtenidos se colocaron en una nueva placa de Petri estéril y se detuvo el proceso de germinación añadiendo un papel de filtro humedecido con amoníaco (NH<sub>3</sub>) al 25 % para detener la germinación.
- 4. Las placas anteriores con el resto de inoculaciones volvieron a ser incubadas, para posteriormente, transcurrido el tiempo necesario, extraer otros tres discos y volver a detener la germinación en las mismas condiciones anteriores.
- 5. Las placas conteniendo los discos se almacenaron a 4 ºC hasta su posterior lectura.
- 6. Finalmente, para contabilizar la germinación al microscopio óptico los tres discos de cada repetición (9 discos por cada tiempo de incubación), se colocaron en porta cristales con sus correspondientes cubres. Para realizar el recuento del número de conidios germinados se realizó la observación con el objetivo a 40x, y se contabilizaron un mínimo de 50 conidios por disco para obtener una lectura fiable. Se consideran conidios germinados aquellos que disponen del tubo germinativo del mismo o superior diámetro total del conidio (Villarino et al. 2016).

#### 3.7. Infección del material vegetal

Una vez obtenido el inóculo (apartado 3.5), se procedió a la infección del material vegetal con cada una de las cepas de *Monilinia*. Para ello, se obtuvieron los pétalos de las ramas recolectadas y se distribuyeron en varias cajas de plástico. A partir de dichos pétalos, se realizaron dos estudios paralelos; la determinación de la incidencia y el análisis de la expresión génica, tal como se describe a continuación. La infección de los

pétalos se realizó inoculando 5  $\mu$ L de *M. laxa* CPML11 o *M. laxa* ML8L a la concentración de 5  $\cdot$  10<sup>4</sup> conidios/mL encima de cada pétalo.

#### 3.8. Determinación de la incidencia

Se realizó el estudio de la incidencia, es decir, la determinación del porcentaje de pétalos infectados para el caso de *M. laxa* CPML11 y *M. laxa* ML8L.

La incidencia se realizó a partir de un lote formado por cuatro réplicas biológicas de 10 pétalos cada una, contabilizando un total de 40 pétalos para cada condición. Para ello, se prepararon 4 cajas de plástico con un papel de filtro estéril húmedo con agua estéril, con la finalidad de aportar humedad a los pétalos. Además, se utilizó una rejilla con pequeños agujeros donde cada uno de los pétalos fue colocado. El porcentaje de pétalos infectados se determinó a las 24 horas post inoculación (hpi), 48 hpi, 72 hpi, y a los 6 días post inoculación (dpi). Durante los periodos de incubación las muestras fueron mantenidas a 20 ºC y 85 % de humedad relativa (HR).

#### 3.9. Inoculación de pétalos para el posterior análisis de la expresión génica

Paralelamente, en el caso de *M. laxa* ML8L, se realizó otro estudio para analizar el efecto de la luz en la expresión génica de diferentes genes diana de la familia de las pectina metil esteresas de *M. laxa* (*MIPME1*, *MIPME2* y *MIPME3*). Para ello, se prepararon 6 cajas de plástico para la inoculación de pétalos, de forma similar en la que se detalla en el apartado anterior. Se llevó a cabo en las diferentes condiciones de luz (blanca, UVA) con las que se creció el patógeno y para los diversos tiempos posteriores a su inoculación: 18 hpi, 48 hpi y 72 hpi. En este caso se realizaron tres réplicas compuestas por 20 pétalos para cada una de las condiciones. Al igual que en el caso anterior, las muestras fueron mantenidas a 20 ºC y 85 % de HR durante los periodos de incubación.

Posteriormente, después de cada uno de los periodos mencionados, los pétalos correspondientes se guardaron en Falcons de 50 mL, sumergiéndolos rápidamente en nitrógeno líquido. Finalmente, se almacenaron a -80 ºC en el congelador, hasta su posterior utilización en los estudios moleculares.

#### 3.10. Trituración y conservación de las muestras

Los pétalos infectados con *M. laxa* (apartado 3.9) se trituraron mediante el uso de un mortero previamente autoclavado y en presencia de nitrógeno líquido. De esta forma se mantuvieron las muestras congeladas y se evitaron posibles alteraciones. Como resultado se obtuvo un triturado muy fino. Finalmente, cada una de las muestras trituradas volvieron a ser guardadas en Falcons de 50 mL a -80 °C hasta su posterior uso.

#### 3.11. Extracción de ARN de los pétalos infectados con M. laxa ML8L

Para poder analizar la expresión génica de los genes relacionados con las pectina metil esterasas (*MIPME1*, *MIPME2* y *MIPME3*) se realizó la extracción de ARN para cada una de las muestras. Dicha extracción se llevó a cabo con el kit *RNeasy Mini Handbook* (Qiagen), siguiendo las recomendaciones proporcionadas por la casa comercial. Durante la extracción se añadieron diversos reactivos con determinadas propiedades que estaban especificadas por la misma casa comercial. A continuación se detalla los pasos seguidos:

- Primeramente, se pesaron 100 mg de muestra de pétalos y se añadieron 450 μL del reactivo RLT (1:9, β mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), reactivo RLT, respectivamente) para lisar las células, liberando así, su contenido interior e inhibir de forma selectiva las ARNasas que pueden degradar el ARN.
- Seguidamente, se vortearon las muestras durante 10 minutos a máxima potencia para facilitar la homogenización y se incubaron durante 3 minutos a 56 ºC en un baño seco para desestabilizar el tejido celular.
- 3. Se transfirieron las muestras a una columna (QIAshredder spin column, lilac), y se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente (Hettich Mikro 22R) para eliminar la contaminación celular (resto de pared celular, células no lisadas, ect) y homogenizar el lisado. Aunque la mayor parte de la contaminación se retiene en la columna, parte de ella puede atravesarla formando así un *pellet*.

- El sobrenadante se recogió en un tubo colector proporcionado por el kit (Qiagen), y se descartó el *pellet* formado. Se agregó 1 volumen de etanol (96-100%) a la muestra (1:1) y se mezcló suavemente con la pipeta.
- Se transfirió a una columna (RNeasy spin column, pink, Qiagen) situado dentro de un tubo colector, y se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 rpm y a temperatura ambiente (25 °C) para descartar el sobrenadante.
- 6. Se añadieron 700 μL del reactivo RW1 a la columna, el cual contiene una sal de guanidina, que elimina restos de biomoléculas (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos). Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores descartando el contenido de la columna.
- Se añadieron 500 μL del reactivo RPE a la RNeasy spin column para eliminar los restos de sales, y se volvió a centrifugar a las mismas revoluciones descartando el contenido de la columna.
- Se volvieron a añadir 500 μL del reactivo RPE a la *RNeasy spin column*, y se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 rpm. Una centrifugación prolongada permite secar la columna, asegurando así que no hay restos de etanol que podrían interferir en los posteriores análisis.
- La columna con la muestra, se colocó en un nuevo tubo colector y se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm para eliminar algún resto del reactivo RPE.
- 10. La columna se colocó en un nuevo tubo colector proporcionado por el kit de 1,5 mL, se añadieron 30 μL de agua libre de ARNasas (Qiagen), y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto para eludir del ARN.
- 11. Finalmente, se cuantificaron las muestras en el Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), con el objetivo de determinar la cantidad de muestra, añadiendo 2 μL de muestra, y realizando el blanco con el agua libre de ARNasas.

#### **3.12.** Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de ARN previamente extraídas se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa para verificar e identificar si alguna de las muestras de ARN se encontraba degrada. De esta manera, se comprobó la integridad y calidad de cada una de ellas. Además, se utilizó el GeIRed, un colorante rojo fluorescente sensible y estable, utilizado para visualizar los ácidos nucleicos (ADNds, ADNss, ARN). El GelRed es utilizado para reemplazar el uso del bromuro de etidio, un potente intercalante mutágeno y altamente tóxico (Crisafuli et al. 2015).

Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador ADN Invitrogen<sup>TM</sup> 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific). Atendiendo a las indicaciones de la casa comercial, éste se usa como marcador de referencia tanto para ADN de doble cadena como para ARN en electroforesis de gel de agarosa que están comprendidos entre el 0,7 % y el 1,2 %. Dicho marcador de peso molecular presenta fragmentos desde 100 bp hasta 15.000 bp (*base pair*).

- Se preparó una solución TBE 1X (Tris Borato EDTA) disolviendo el TBE 20X con agua libre de ARNasas (Fisher Scientific) con TBE 20X (Anexo 1, Tabla 2). Para ello se utilizaron el Tris Base y el ácido bórico que regulan el pH. A su vez, también, se añadió EDTA, un quelante de cationes divalentes para evitar la degradación del ADN y el ARN por parte de las posibles nucleasas. Posteriormente, se autoclavó y se conservó a temperatura ambiente.
- Se preparó un gel de agarosa al 0,8 % diluyendo la cantidad de agarosa necesaria con TBE 1X calentando la mezcla al microondas hasta su completa disolución y homogenización.
- Se dejó atemperar durante unos 5 minutos y seguidamente, se colocó el peine, y se añadió la agarosa al soporte de electroforesis para llevar a cabo la solidificación del gel.
- 4. Se preparó el tampón de carga GelRed (0,1 % de GelRed (ThermoFisher Scientific) en *Loading Buffer* 10X) (Anexo 1, Tabla 3). Para ello, se utilizó glicerol para aportar densidad a la muestra, el TBE para ejercer su función de tampón, el EDTA, y el Orange G como colorante para visualizar el avance de la electroforesis.
- Una vez el gel se encontraba solidificado se procedió a la carga de las muestras al mismo siguiendo las siguientes condiciones:
  - $\circ~$  Marcador: 1  $\mu L$  de marcador + 2  $\mu L$  de tampón de carga GelRed + 4  $\mu L$  de H\_2O

- $\circ~$  Muestras: 1  $\mu L$  de muestra + 2  $\mu L$  de tampón de carga GelRed + 7  $\mu L$  de  $H_2O$
- Finalmente, se encendió la corriente a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora, empezando así, la migración de las muestras de ARN cargadas negativamente hacia el polo positivo.
- 7. Transcurrida la hora, la visualización de las bandas de cada una de las muestras se realizó en condiciones de luz ultravioleta (Bio-Rad). La visualización bajo condiciones de luz ultravioleta permite la visualización de las bandas ya que el GeIRed, el intercalante fluorescente, se ilumina tras su exposición (Crisafuli et al. 2015).

#### 3.13. Tratamiento con ADNasas

Para eliminar la posible presencia de ADN genómico que se puede co-purificar juntamente con el ARN durante el proceso de extracción, se realizó un tratamiento con ADNasas. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el fabricante *TURBO DNA-free*<sup>TM</sup> Kit de Invitrogen (Thermo Fisher):

- 1. Primeramente, se descongelaron los reactivos en hielo, y posteriormente se añadió un 10 % (v/v) (3  $\mu$ L) del tampón *TURBO DNAase* y un 1 % (v/v) (0,3  $\mu$ L) de la *TURBO DNAase* proporcionados por el kit (Thermo Fisher).
- Se incubó a 37 ºC durante 30 minutos al termoblock (TS-100C Thermo-Shaker, Biosan) para llevar a cabo la digestión por parte de las enzimas.
- 3. Se añadió un 10 % (v/v) (3 μL) de tampón de inactivación de ADNasas, previamente descongelado a temperatura ambiente, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C) moviendo los tubos periódicamente para facilitar su mezcla. Este reactivo tiene la función de inhibir la actividad enzimática de la ADNasa.
- 4. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g y a 20 °C durante un minuto y 30 segundos (Centrifuge 5417R) para descartar el *pellet* correspondiente al tampón de inactivación de ADNasas. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf.

- 5. Finalmente, las muestras se cuantificaron al Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).
- 6. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % tal como se detalla en el apartado 3.12 con la finalidad de volver a comprobar la calidad y la integridad del ARN y verificar la eliminación del ADN. Finalmente, todas las muestras se mantuvieron a -20 ºC hasta su posterior utilización.

#### 3.14. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Tras eliminar los restos de ADN, para poder realizar el análisis de la expresión génica es necesario sintetizar el ADNc a partir del ARN extraído, mediante el proceso de retrotranscripción o transcripción inversa gracias a la acción de las retrotranscriptasas (Tamay De Dios et al. 2013). En nuestro estudio, la síntesis de ADNc se realizó siguiendo el protocolo y usando la retrotranscriptasa proporcionada por *Invitrogen Superscript IV First-Strand cDNA synthesis Reaction* (Invitrogen).

- 1. Primeramente se descongelaron cada uno de los componentes mencionados en las tablas del anexo (Anexo 1, Tabla 4 y 5).
- Se vortearon cada uno de los componentes y se preparó la mix 1 (Anexo 1, Tabla 4), añadiendo la muestra de ARN (1 μg), los oligonucleótidos, los desoxirribonucleótidos trifosfato, y la correspondiente H<sub>2</sub>O estéril para obtener 1 μg en cada muestra.
- 3. Una vez preparada la mix 1, se realizó un vortex, un spin y se añadieron las muestras al termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700, el cual siguió los pasos mostrados en el gráfico (Anexo 1, Figura 3).
- 4. Durante la incubación a 65 ºC durante los 5 minutos en el termociclador, se preparó la mix 2 (Anexo 1, Tabla 5). Esta mix se preparó mezclando el tampón "5X SSIV para regular el pH, el ditiotreitol para estabilizar las enzimas y proteínas con grupos sulfhidrilos libres, el inhibidor de ribonucleasa con la finalidad de inhibir las ARNasas A, B, C, y finalmente, la *Supercript IV* para llevar a cabo la transcripción reversa.

- Durante el segundo paso (2' a 4 ºC) (Anexo 1, Figura 5), se pausó el termociclador, para añadir 7 μL de la mix 2 mencionada anteriormente a cada muestra.
- 6. Se volvieron a poner las muestras en el termociclador para seguir con las posteriores condiciones de incubación.
- Finalmente, se cuantificaron las muestras al Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), y se conservaron a -20 ºC hasta su posterior uso.

#### 3.15. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La qPCR (del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real es un método muy sensible, eficaz y específico. Se utiliza para cuantificar los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) amplificados en cada ciclo de la reacción, denominados amplicones. La aplicación más utilizada es la cuantificación relativa de la expresión génica de genes concretos (Tamay De Dios et al. 2013)(Costa 2004).

La reacción es monitoreada en cada ciclo mediante el uso de fluorescentes, como por ejemplo el SYBR Green, una sonda intercalante, cargada positivamente que posee una gran afinidad no específica por el ADN de doble cadena (dsADN). Esta sonda emite hasta 1000 veces más fluorescencia respecto cuando no se encuentra unida al ADN. Se produce la absorción de la luz a una longitud de onda de 480 nm, y es emitida a 520 nm. La cantidad de productos amplificados en cada ciclo es proporcional al incremento de la fluorescencia emitida en la fase final de extensión. Una de las desventajas de este tipo de intercalante es que la inespecificidad le permite unirse tanto a cualquier molécula de dsADN, así como a los dímeros de *primers*. Para ello, es necesario comprobar si otros productos han sido amplificados durante la reacción, por lo que se debe observar una única *"curva melting"* para cada caso. En el caso de la qPCR no es necesario realizar posteriormente una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia del producto tal como ocurre en la PCR punto final. Esto es debido a que los productos de la reacción son monitoreados a lo largo del tiempo. Cada uno de los ciclos de la qPCR (normalmente 40) está compuesto por las siguientes tres etapas:

- Desnaturalización: Durante un intervalo de 20-30 segundos las muestras son expuestas a una temperatura de 95 ºC con la finalidad de separar las cadenas de dsADN.
- Hibridación: Alineación de los primers con la secuencia complementaria a la temperatura melting (Tm) óptima de hibridación (entre 50-60 ºC).
- Extensión: Agregación de los nucleótidos y extensión bajo la acción catalítica de la Taq polimerasa a su temperatura óptima (72ºC)(Tamay De Dios, et al. 2013).

Cada una de las muestras debe estar a la concentración óptima para poder realizar el análisis de la expresión génica. Para ello, se realizan diversas diluciones seriadas, para posteriormente, establecer cuál es la concentración óptima a utilizar (apartado 3.18).

#### 3.16. Diseño de genes diana y validación

En este trabajo se analizaron 3 genes involucrados en la degradación de la pectina, concretamente 3 pectina metil esterasas. Además, para el análisis mediante qPCR se incluyeron 2 genes de referencia con el objetivo de poder normalizar los resultados de expresión entre las diferentes muestras a analizar (Tamay De Dios et al. 2013). Así que para poder realizar el análisis mediante la qPCR el grupo de Poscosecha del IRTA de Lleida, previamente ya diseñó los *primers* a partir del *software Primer3Plus* (versión 2.4.2) para cada uno de los genes de interés y en base a la secuencia del genoma de *M. laxa* (Naranjo-Ortiz et al. 2018)(Anexo 1, Tabla 6).

#### 3.17. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los primers

Previamente al análisis de la expresión génica, se determinó la temperatura óptima para cada una de las parejas de *primers* mediante PCR convencional utilizando el termociclador (Applied Biosystems<sup>®</sup> Veriti <sup>®</sup> 96-Well Fast Thermal Cycler) comprobando 2 temperaturas de hibridación distintas (58 ºC, 60 ºC).

Para llevar a cabo la amplificación, se utilizó la IBIAN®-Taq ADN Polimerasa (IBIANLab), que atendiendo a las indicaciones de la casa comercial, se trata de una enzima termoestable de 94 kDa que replica el ADN a 72ºC, y que ha sido aislada de la cepa YT-1 de la eubacteria *Thermus aquaticus*. En presencia de iones magnesio, la enzima cataliza la polimerización de nucleótidos al dúplex de ADN en dirección 5' $\rightarrow$ 3', con presencia de actividad exonucleasa 5' $\rightarrow$ 3'. La reacción se llevó a cabo con el termociclador que permite amplificar diferentes productos a diversas temperaturas de hibridación simultáneamente. Así, para cada muestra se realizó un doble análisis a 2 temperaturas de hibridación diferentes, 58 °C y 60 °C. Ésta sigue los siguientes pasos:

- 1. Se inicia con una fase de desnaturalización (2', 94 ºC)
- 2. 30 ciclos compuestos de los siguientes pasos:
  - 2.1. Desnaturalización (10", 94 ºC)
  - 2.2. Hibridación (20" a 58 ºC/60 ºC)
  - 2.3. Extensión (1' a 72 ºC)
- 3. Fase final de extensión (5' a 72 ºC)

La determinación de la temperatura óptima de hibridación, se realizó preparando un mix de ADNc de todas las muestras. Además, como control positivo, se utilizó ADN de *M. laxa ML8L* (15 ng/µL) y como control negativo, un NTC (*Non Template Control*), que contenía agua en lugar de ADNc mix y que permitió detectar la posible formación de amplificaciones inespecíficas. Las dos temperaturas se testaron para cada uno de los genes diana a estudiar (*MIPME1, MIPME2* y *MIPME3*) y para los de referencia (*MIACT* y *MIHISH3*).

- Primeramente, se realizó una mezcla con todas las muestras (ADNc mix) a 50 ng/μL.
- Se preparó una mix (Anexo 1, Tabla 7) con todos los componentes necesarios para la PCR. Entre dichos componentes, incluían los desoxirribonucleótidos trifosfato, los *primers (foward* y *reverse*), la IBIAN Taq Polimerasa, el ADN de la muestra, y el H<sub>2</sub>O estéril. Tanto los *primers* como el ADNc se añadió posteriormente a cada tubo.
- 3. Una vez preparada la mix, se repartió en los diferentes tubos para la PCR.
- 4. Se añadieron las cantidades de *primers* (0,5  $\mu$ L de cada uno) y de ADNc (50 ng/  $\mu$ L) o H<sub>2</sub>O en el caso de los NTC.
- 5. Se colocaron las muestras al termociclador y se inició la reacción.

- Finalizada la amplificación al termociclador, se realizó una electroforesis tal como se especifica en el apartado 3.12, pero preparando un gel de agarosa al 2,5 %. En este caso la electroforesis se realizó en las siguientes condiciones:
  - $\circ$  Marcador: 1 μL de marcador + 2 μL de tampón de carga GelRed + 4 μL de H<sub>2</sub>O
  - ο Muestras: 2 μL de muestra + 2 μL de tampón de carga GelRed + 6 μL de H<sub>2</sub>O.

Después de visualizar los productos de amplificación en el gel de agarosa y utilizando un marcador de peso molecular de 50 bp, se eligió aquella temperatura de hibridación que proporcionó mayor producto de amplificación y ausencia de productos inespecíficos.

# **3.18.** Determinación de la eficiencia de los primers y determinación de la concentración óptima de las muestras para la qPCR

Previamente a la realización la qPCR es necesario determinar la concentración óptima de las muestras para cada par de *primers*. Además, también se determinó la especificidad y eficiencia de los *primers* para las muestras.

La eficacia es una forma de medir la capacidad de la polimerasa de duplicar la cantidad de copias de ADN o ADNc en cada uno de los ciclos de la reacción. Se realizaron un total de dos curvas patrón a partir de las cuales se estableció la concentración adecuada para cada pareja de *primers*. Además, se determinó la eficiencia de los *primers* siguiendo la ecuación proporcionada por el estudio de Pfaffl, 2001:

$$E = (10^{(-1/pendiente de la recta} -1) \times 100$$
 (Ecuación 2)

La qPCR se realizó utilizando el termociclador 7500 Real Time qPCR system y el kit comercial KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master mix (Kapa Biosystems). Este kit consta de la KAPA Taq Polimerasa (Kapa Biosystems) que atendiendo a sus indicaciones, procede de la bacteria *Thermus aquaticus*, y está purificada de la *Escherichia coli* recombinante. KAPA Taq Polymerase tiene actividad 5' $\rightarrow$ 3' endonucleasa pero no actividad 3 $\rightarrow$ 5' exonucleasa. Además es capaz de detectar la amplificación a tiempo real, para lo que utiliza SYBR Green como marcador. Las condiciones termales durante la qPCR fueron las siguientes:

- 1. Activación inicial: 2' a 95 ºC
- 2. 40 ciclos formados por los siguientes pasos:
  - 2.1 Desnaturalización: 15" a 95 ºC
  - 2.2 Hibridación : 1' a 60 ºC
- 3. Disociación (*melting curve*): 15" a 95 ºC/ 1' a 60 ºC/ 30" a 95 ºC/ 15" a 60 ºC

Para llevar a cabo el análisis de la expresión génica se siguieron los siguientes pasos experimentales:

- Cada reacción estaba compuesta por los reactivos mencionados en el Anexo 1, Tabla 8. Primeramente, se preparó una mix compuesta por la KAPA SYBR Fast, el ROX Low, y H<sub>2</sub>O estéril. Atendiendo a las indicaciones del kit, la KAPA SYBR Fast corresponde a la ADN polimerasa y el ROX Low se utiliza para compensar variaciones de fluorescencia ya que ésta no cambia de forma significativa durante el curso de la reacción.
- 2. Posteriormente se añadió el volumen correspondiente de los primers.
- 3. Se mezclaron 4  $\mu$ L de cada una de las muestras (50 ng/ $\mu$ L) obteniendo así un ADNc mix en un nuevo tubo Eppendorf. A partir de la muestra mix de 50 ng/ $\mu$ L se realizaron una serie de diluciones seriadas (1:2) obteniendo así el siguiente rango de concentraciones: 50 ng/ $\mu$ L; 25ng/ $\mu$ L; 12,5 ng/ $\mu$ L; 6,25ng/ $\mu$ L; 3,125ng/ $\mu$ L. Las diluciones se realizaron con H<sub>2</sub>O estéril en cada uno de los casos.
- 4. Se añadieron 8  $\mu$ L de cada mix en los pocillos correspondientes de la placa qPCR y 2  $\mu$ L de cada una de las diluciones de muestra mencionadas. En el caso del NTC se añadieron 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril libre de ARNasas.
- 5. A continuación, antes de introducir la placa en el termociclador, se cubrió con un adhesivo transparente (Applied Biosystems), y posteriormente se centrifugó a 4.000 rpm a 4 ºC durante 1 minuto para evitar que parte de la muestra quedara por las paredes.
- 6. Finalmente, se inició la reacción de qPCR al termociclador

#### 3.19. Análisis de la expresión génica de las muestras

Una vez determinada la temperatura de hibridación óptima de los *primers* y la concentración de ADNc de las muestras adecuada para analizar cada uno de los genes, se realizó el mismo procedimiento detallado en el apartado 3.18, pero analizando en este caso las muestras. Las placas se cargaron con cada una de las muestras y genes de interés siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.18. Además, se incluyeron réplicas técnicas para cada una de las muestras y un NTC para comprobar la especificidad de los *primers*.

A partir de los valores de C<sub>t</sub> obtenidos para cada muestra (tanto del gen de interés como de los genes de referencia), se realizó una cuantificación relativa de los niveles de expresión de *MIPME1*, *MIPME2* y *MIPME3* normalizados con la media geométrica de los genes de referencia (*MIACT* y *MIHISH3*) siguiendo la ecuación 3 (Pfaffl 2001).

$$Ratio = \frac{(E \ muestra)^{Ct \ muestra}}{(E \ referencia)^{Ct \ referencia}}$$
(Ecuación 3)

En la ecuación anterior, la  $E_{muestra}$  y la  $E_{referencia}$ , representa la eficiencia en la qPCR de de la muestra, y del gen de referencia, respectivamente. En este caso el C<sub>t</sub> de referencia pertenece a la media geométrica de los genes de referencia mencionados.

#### 3.20. Análisis de los datos

Los datos estadísticos se analizaron con el test bilateral para muestras independientes mediante el programa estadístico 15.00 (*Statistical Package for the Social Sciences*), aceptando p<0,05 como diferencias significativas. Además todos los gráficos se realizaron con el programa *Graph Prism Version* 5, mostrando con asteriscos las diferencias significativas de p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*), o p<0,001 (\*\*\*). Previamente del análisis T. test, los *outliers* se descartaron con el método modificado de Thompson atendiendo a la siguiente ecuación, donde "n" corresponde número de muestra), y t al valor *student t* asociado (Shen et al. 2015):

$$\tau = \frac{t x (n-1)}{\sqrt{n} x \sqrt{n-2+t^2}}$$
 (Ecuación 4)

#### 4. Resultados

#### 4.1. Germinación en condiciones de luz blanca y UVA

Una vez finalizado el procedimiento detallado en el apartado (3.6), se procedió a determinar si el tipo de luz podía tener un efecto en el proceso de germinación en las diferentes cepas.



Figura 6. Porcentaje de esporas germinadas en ambas condiciones de luz (blanca y UVA) para cada una de las cepas (M. laxa CPML11, M. laxa ML8L y M. fructicola CPMC6). Se muestran las diferencias significativas entre las diferentes luces p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*\*) y p<0,001 (\*\*\*).

En cuanto a los porcentajes de germinación, tal como se puede observar en el gráfico (Figura 6) se obtuvieron diferencias significativas entre ambas condiciones de luz (blanca, UVA) a las 2 hpi con cada una de las cepas estudiadas. En todos los casos al comparar ambas condiciones de luz, el porcentaje de conidios germinados se encontraba disminuido en condiciones de la luz UVA (Tabla 9).

	M. fructicol	a CPMC6 (%)	<i>M. laxa</i> CPML11 (%)		<i>M. laxa</i> ML8L (%)	
	Blanca	UVA	Blanca	UVA	Blanca	UVA
2 hpi	82,70 ± 2,02	61,53 ± 2,53	86,92 ± 3,35	78,55 ± 3,51	46,15 ± 3,13	40,21 ± 0,79
4 hpi	99,03 ± 0,86	98,57 ± 1, 53	96,97 ± 0,70	93,64 ± 3,72	77,48 ± 3,02	76,21 ± 1,47
6 hpi	99,46 ± 0,58	99,11 ± 0,84	$100 \pm 0,00$	$100 \pm 0,00$	89,34 ± 2,59	86,86 ± 1,69

Tabla 9. Porcentaje de conidios germinados a las 2 hpi, 4 hpi, 6 hpi

Porcentaje de conidios germinados ± desviación estándar

No obstante, en ninguno de los casos se detectaron diferencias significativas a las 4 hpi y 6 hpi entre ambos tipos de luz. A su vez, se decidió analizar si existían diferencias entre los resultados de las diferentes cepas. En el caso de *M. fructicola* CPMC6 y *M. laxa* CPML11 mostraban un perfil de germinación similar a las 4 hpi y 6 hpi mostrando su total capacidad germinativa en ambas condiciones de luz. En cambio a las 2 hpi *M. laxa* CPML11 presentaba mayor porcentaje de conidios germinados (78,55 ± 3,51 %) respecto *M. fructicola* CPMC6 (61,53 % ± 2,53) en condiciones de luz UVA (p<0,01).

En general, *M. laxa* ML8L mostró una germinación más lenta en ambas condiciones de luz en comparación con el resto de las cepas estudiadas. Se obtuvieron diferencias significativas a las 2 hpi, 4 hpi, y 6 hpi entre ambas condiciones (luz blanca y luz UVA) al comparar los resultados de *M. laxa* ML8L tanto con *M. fructicola* como con *M. laxa* CPML11 con valores significativos de p<0,01 en todos los casos.

#### 4.2. Determinación de la incidencia de pétalos infectados

A continuación se decidió analizar si ambas condiciones de luz alteraban del mismo modo la capacidad infectiva de *Monilinia* cuando se encontraban en contacto con pétalos de melocotón *Merril O'Henry*. En base a las diferencias germinativas obtenidas entre las dos cepas de *M. laxa* (*M. laxa* CPML11, *M. laxa* ML8L) (apartado 4.1), se decidió llevar a cabo la determinación del porcentaje de pétalos infectados con las dos cepas de *M. laxa* que previamente habían sido incubadas a las diferentes condiciones de luz. Además, su determinación se realizó a diferentes tiempos posteriores a su inoculación (hpi) tal como se muestra en el gráfico (Figura 7).

En general, a las 18 hpi no se observaron pétalos infectados en ninguna de las condiciones estudiadas y a su vez, se obtuvo un aumento progresivo de la incidencia con el paso del tiempo. Al comparar los resultados entre las dos condiciones de luz se obtuvieron diferencias significativas a las 72 hpi para el caso de *M. laxa* ML8L. A su vez, para el caso *M. laxa* CPML11, se observaron diferencias entre ambas condiciones de luz a partir de las 72 hpi. En todos los casos, el porcentaje de infectados resultaba ser mayor en las condiciones de luz UVA.

Además, con la finalidad de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas, se decidió comparar los resultados. Tras analizar el

análisis, se observaron diferencias significativas en las dos condiciones de luz en todos los tiempos estudiados, a excepción del caso de la luz blanca a las 144 hpi. En todos las condiciones de luz (blanca, UVA) M. laxa ML8L presentaba un mayor periodo de latencia, en comparación con M. laxa CPML11 (Tabla 10).

cepas previamente habían crecido en condiciones de luz blanca o luz UVA						
Tiempo (hpi)	<i>M. laxa</i> CPML11 Blanca (%)	<i>M. Laxa</i> CPML11 UVA (%)	<i>M. laxa</i> ML8L Blanca (%)	<i>M. laxa</i> ML8L UVA (%)		
72	55 ± 5,77	75 ± 5,77	15 ± 5,77	30 ± 8,17		
144	67,5 ± 9,57	100 ± 0	65 ± 5,77	70 ± 8,17		

Tabla 10. Porcentaje de pétalos infectados con M. Iaxa CPML11 y M. Iaxa ML8L a las 72 hpi y 144 hpi. Ambas

Se muestra el porcentaje de pétalos infectados ± la desviación estándar



Figura 7. Determinación de la incidencia de pétalos infectos con M. laxa CPML11 y M. laxa ML8L a diferentes horas posteriores a su inoculación (hpi). Las diferencias significativas p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*\*) y p<0,001 (\*\*\*) se muestran marcadas en negro al comparar ambas condiciones de luz y en gris al comparar las diferencias entre las diferentes cepas

#### 4.3. Análisis de la expresión génica

#### 4.3.1. Obtención de las muestras de ARN

En base al diferente perfil germinativo (apartado 4.1) observado en M. laxa ML8L respecto al resto de las cepas, y teniendo en cuenta la menor capacidad infectiva obtenida en la incidencia (apartado 4.2) se analizó la expresión génica de genes de la familia de las PMEs de M. laxa ML8L en su interacción con pétalos. Para ello, se realizó la extracción de ARN y se procedió a la cuantificación de las muestras obtenidas.

En el Anexo 2 y Tabla 11, se muestran las concentraciones de ARN obtenidas después de la extracción, y tras el tratamiento con las ADNasas. Además, también se detallan los respectivos valores de la calidad obtenida para cada una de las muestras en base al ratio 260/280, y 260/230. Se obtuvieron concentraciones variables para cada una de las muestras tras la extracción de ARN [167,1 - 370,3 ng/µL) y tras del tratamiento con las ADNasas (111,11 - 366,5 ng/µL) en la que la concentración de las mismas resultó disminuida. Para realizar los posteriores análisis, se determinó que cada una de ellas debía contener una concentración mínima de 100 ng/µL. En la misma tabla, también se muestran los valores del ratio A260/A280 que indican la pureza del ARN, siendo aceptado como ARN puro una relación de 2. Además, también se observa el ratio A260/230, una medida secundaria para determinar la pureza de los ácidos nucleicos, esperados normalmente en un rango de 1,8-2,2 (Desjardins et al. 2010). En cuanto a nuestros resultados, la mayor parte de valores se encontraba en el rango óptimo para el ratio 260/280. No obstante, los valores correspondientes a la relación 260/230

#### 4.3.2. Electroforesis del ARN

Una vez realizada la extracción de ARN, se determinó la integridad y calidad del mismo mediante la técnica de la electroforesis en gel de agarosa.



Figura 8. Electroforesis posterior a la extracción del ARN (a), y post tratamiento con las ADNasas (b) de pétalos infectados con M. laxa ML8L en condiciones de luz blanca. En la izquierda se aprecia el marcado de peso molecular de 1 Kb utilizado

En cuanto a los resultados obtenidos tras la electroforesis, tal como se muestra en el gráfico (Figura 8) para alguna de las muestras, se obtuvieron dos bandas tanto en la electroforesis obtenida tras la extracción de ARN, como, tras el tratamiento con las ADNsas. En la Figura 8 se muestran los resultados de algunas de las muestras ya que en el caso de las restantes se obtuvieron resultados similares. En los geles obtenidos, se puede apreciar la eliminación del ADN genómico tras el tratamiento con las ADNasas.

#### 4.3.3. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los primers

Previamente a la realización del análisis de la expresión génica se determinó la temperatura óptima de cada uno de los *primers*. Para ello, se utilizaron la secuencia de los *primers* previamente diseñados por el Grupo de Poscosecha del IRTA. Una vez realizada la PCR convencional para cada una de las temperaturas a evaluar (58°C y 60 °C), se realizó la electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para algunas los *primers* ya que para el resto de ellos se obtuvieron resultados similares.



Figura 9. Determinación de la temperatura óptima de los primers. El ladder corresponde al marcador de peso molecular de 50 bp (base pairs)

Respecto a los resultados obtenidos, se observó amplificación de la muestra a ambas temperaturas evaluadas tanto con los genes de referencia (*MIACT*, *MIHISH3*) como con los genes de diana (*MIPME1*, *MIPME2*, *MIPME3*). A su vez, se observó amplificación

para el control positivo (ADN de *M. laxa* ML8L) y ausencia de producto en el caso del NTC (Figura 9).

#### 4.3.4. Determinación de la cantidad óptima de ADNc

Dado las diferencias intrínsecas entre los diversos genes, se procedió a la determinación de la cantidad óptima de muestra de ADNc para cada *primer* para el posterior análisis de la qPCR. Para ello, se realizó una curva patrón a diferentes concentraciones de muestra para cada uno de los *primers*. La determinación de la cantidad óptima de ADNc se realizó teniendo en función del *threshold cycle* (C<sub>t</sub>) para cada caso. A continuación se muestran los valores de C<sub>t</sub> obtenidos para cada uno de los *primers* (Tabla 12).

Primer	100 ng	50 ng	25 ng	12,5 ng	6,25 ng	3,13 ng
MIACT	19,86	20,42	21,66	22,53	23,70	24,84
MIHISH3	19,66	20,46	21,75	22,57	23,58	24,81
MIPME1	-	28,81	29,48	30,43	30,95	32,11
MIPME2	21,25	22,45	23,89	24,63	25,78	26,95
MIPME3	20,61	21,57	22,76	23,64	24,71	25,79

Tabla 12. Valores de C<sub>t</sub> para cada uno de los genes a las diferentes cantidades de muestra analizadas.

Se destacan los valores de C<sub>t</sub> seleccionados para cada primer

Atendiendo a los resultados obtenidos, tal como se puede apreciar en la tabla (Tabla 12), la mayor parte de los datos se encontraban dentro de un valor de C<sub>t</sub> comprendido entre 20 y 30. A partir de estos resultados, se decidió realizar el ensayo de la expresión génica a 25 ng para el caso de *MIPME1* y *MIPME3*, y a 6,25 ng para el análisis de *MIPME2*.

#### 4.3.5. Determinación de la eficiencia de los primers

Previamente a la realización del análisis de los genes en la qPCR se determinó la eficiencia de cada pareja de *primers*. A partir de la qPCR realizada con diluciones seriadas del ADNc mix de todas las muestras, se obtuvieron los valores de eficiencia correspondientes (Tabla 13). La determinación de la eficiencia de los *primers* se realizó atendiendo a la ecuación proporcionada por Pfaffl, 2001.

Primer	Eficiencia (%)
MIACT	95,29 %
MIHISH3	100,52 %
MIPME1	118,27 %
MIPME2	95,09 %
MIPME3	98,41 %

Tabla 13. Eficiencia para cada pareja de primer

#### 4.3.6. Análisis de la expresión génica

Una vez determinada la temperatura de hibridación, la cantidad óptima de ADNc y la eficiencia de cada pareja de *primers*, se procedió al análisis de la expresión de los genes *MIPME1*, *MIPME2* y *MIPME3* normalizados con la media geométrica de los genes de referencia *MIACT* y *MIHISH3*. A continuación se muestran los resultados del análisis de la expresión génica para cada uno de los genes.

Respecto al gen *MIPME1*, solamente se observó un cambio significativo en la expresión a las 72 hpi entre ambas condiciones de luz. Sin embargo a las 18 hpi y 48 hpi no se observaron diferencias significativas. Tal como se muestra en el siguiente gráfico (Figura 10), *MIPME1* se encuentra sobreexpresado en las condiciones infectadas con *M. laxa* ML8L crecida bajo luz UVA.



Figura 10. Expresión génica de MIPME1 de M. laxa ML8L infectando pétalos de melocotón a diferentes tiempos posteriores a su inoculación (hpi). Se muestra la expresión relativa normalizada con la media geométrica de MIACT y MIHISH3. Las diferencias significativas p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) y p<0,001 (\*\*\*) se indican en el gráfico

Respecto al gen *MIPME2*, se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 48 hpi, con una mayor expresión en condiciones UVA, mientras a las 72 hpi la tendencia cambió y se detectó un perfil de expresión significativamente mayor en condiciones de luz blanca en el gráfico (Figura 11).



Figura 11. Expresión génica de MIPME2 de M. laxa ML8L infectando pétalos de melocotón a diferentes tiempos posteriores a su inoculación (hpi). Se muestra la expresión relativa normalizada con la media geométrica de MIACT y MIHISH3. Las diferencias significativas p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) y p<0,001 (\*\*\*) se indican en el gráfico

Finalmente, en cuanto a la expresión del gen *MIPME3*, las diferencias estadísticamente significativas se apreciaron a las 48 hpi y 72 hpi con una mayor expresión en las condiciones de crecimiento de *M. laxa* ML8L luz UVA (Figura 12). A diferencia de *MIPME2, MIPME3* mantuvo los niveles de expresión más altos en luz UVA que en luz blanca a las 48 hpi.



Figura 12. Expresión génica de MIPME3 de M. laxa ML8L infectando pétalos de melocotón a diferentes tiempos posteriores a su inoculación (hpi). Se muestra la expresión relativa normalizada con la media geométrica de MIACT y MIHISH3. Las diferencias significativas p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) y p<0,001 (\*\*\*) se indican en el gráfico

#### 5. Discusión

La capacidad infectiva de *Monilinia* en la enfermedad de la podredumbre marrón está influenciada por múltiples factores (Obi et al. 2018). Una mejor comprensión de los efectos sobre sus mecanismos patogénicos sería de gran utilidad para establecer alternativas de control de esta enfermedad a las actualmente empleadas. La luz UV, y en concreto la UVC, tiene una gran importancia como desinfectante en frutas (Turtoi 2014) gracias a sus propiedades germicidas (Koutchma et al. 2016). Sin embargo, en ocasiones provoca daños en las plantas (Turtoi 2014) por lo que su sustitución por longitudes de onda menos nocivas como la luz UVA, resultaría de gran interés para reducir el impacto negativo que en muchas ocasiones la luz UVC provoca.

Estudios previos han observado una reducción de los patógenos presentes en las superficies vegetales mediante el uso de sistemas de esterilización de superficies basados en luz UVA (Aihara et al. 2014) e incluso otros, han utilizado la misma longitud de onda como sistemas de desinfección en agua (Hamamoto et al. 2007).

En cuanto a los resultados obtenidos por nuestro estudio se ha observado que la luz UVA tiene un gran efecto en la capacidad infectiva de *Monilinia*. En un estudio (De Cal et al. 1999) observaron un menor crecimiento de los micelios en los patógenos (*M. laxa*, *M. fructicola* y *M. fructigena*) en condiciones de luz UVA. Además, también observaron un mayor crecimiento de los mismos en *M. fructicola* respecto a *M. laxa*, a excepción de la cepa *M. laxa* ES-23 (aislada en Murcia) con la que obtuvieron un perfil similar.

A pesar de que recientemente no hay más estudios que hayan analizado el efecto de la luz UVA en *Monilinia,* algunos han determinado su consecuencia en otros patógenos. Por ejemplo, en el estudio de Aihara et al. 2014 observaron una disminución del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* tras la exposición de diodo de luz emitente UVA. Así pues, nuestros resultados junto a los estudios mencionados reflejarían que la luz UVA altera la actividad del patógeno.

Actualmente se ha descrito que los hongos son capaces de responder a la luz mediante la acción de diversas moléculas sensibles a la luz denominadas fotorreceptores. Estas moléculas reciben la luz por parte de los pigmentos (cromóforos) y la transmiten a sus respectivas células para activar diversos procesos señalizadores involucrados en su desarrollo y comportamiento (Thind et al. 2018). Existen diversas moléculas fotorreceptoras entre las que podemos encontrar las rodopsinas, las proteínas de voltaje de oxígeno ligero (LOV), los fitocromos, y los criptocromos (CRYs). Los fotorreceptores CRYs y LOVs son los que mayormente responden a la radiación UVA (Thind et al. 2018).

Entre las LOVs, se ha estudiado que el receptor "blue light receptor" es capaz de responder a la luz UVA en *Bipolaris oryzae* (hongo ascomicota) (Kihara et al. 2007). En cuanto a los fotorreceptores CRYs, los podemos encontrar en diferentes hongos ascomicetos, así como, el PHR-1 en *Trichoderma atroviride* (Berrocal-tito et al. 2007) y en *Aspergillus nidulans* (Bayram et al. 2008). Además, también se han analizado otros fotorreceptores como el PHL-1 en *Cercospora zeae-maydis* (Bluhm et al. 2008). Los receptores perciben la luz expuesta en el medio ambiente para posteriormente adaptar al hongo a las condiciones ambientales (Thind et al. 2018).

Sin embargo, algunos estudios han demostrado que periodos de exposición elevados pueden resultar perjudiciales para los patógenos. Por ejemplo, en el estudio anterior mencionado (Bluhm et al. 2008) observaron que mediante potentes exposiciones de luz UVA, la fotoactivación de PHL-1 resultada abolida y además, se producia una disminución de la expresión génica de algunos genes involucrados en la reparación del ADN (*RAD2, RVB2*) en *Cercospora zeae-maydis*. Los efectos dañinos provocados por la luz UVA pueden afectar de forma directa tras su exposición, o de manera indirecta por medio de la producción de ROS (del inglés, *reactive oxygen species),* que son moléculas causantes del estrés oxidativo cuando se encuentran en cantidades elevadas. Particularmente, la luz UVA es eficiente en la producción de las mismas a través de la fotoactivación de los cromóforos por medio de los fotorreceptores (Wong et al. 2018).

Los niveles de ROS juegan un importante papel en la actividad de los hongos ya que niveles bajos actúan como metabolitos secundarios promoviendo su crecimiento y desarrollo (Komalapriya et al. 2015). Sin embargo, cuando se encuentra en cantidades elevadas puede alterar la homeostasis interna, provocar daños al ADN y producir apoptosis (Komalapriya et al. 2015). Las mayores lesiones causadas en el ADN por

parte del estrés oxidativo inducido por la luz UVA son los fotoproductos de bipirimidinas (Thind et al. 2018). Concretamente algunos estudios han demostrado un efecto inhibitorio del crecimiento de *Aspergillus fumigatus* tras la inducción de la producción de ROS (Shekhova et al. 2017).

Por tanto, la disminución de la capacidad germinativa en *Monilinia* en condiciones de luz UVA podrían deberse a que *Monilinia* dispone de diversos fotorreceptores mediante los cuales son capaces responder a la luz UVA. La exposición de luz UVA elevada podría provocar un aumento de ROS que finalmente llevaría a una menor capacidad germinativa. A su vez, entre las diferencias obtenidas entre las diversas cepas, *M. fructicola* mostraba la mayor reducción de conidios germinados en luz UVA respecto al resto de las cepas a las 2 hpi. Estos resultados reflejarían que *M. fructicola* podría presentar fotorreceptores con una mayor sensibilidad a la luz UVA respecto al resto de las cepas. Además, de manera general, el perfil de germinación mayor observado en *M. fructicola* y *M. laxa* CPML11 respecto *M. laxa* ML8L podría indicar que los fotorreceptores involucrados en la respuesta a la luz en *M. laxa* ML8L presentan mayores diferencias respecto los fotorreceptores de *M. fructicola* y *M. laxa* CPML11.

No obstante, tras la determinación de la incidencia, se observó un mayor porcentaje de pétalos infectados cuando *M. laxa* CPML11 y *M. laxa* CPMC6 era crecida en condiciones de luz UVA. Por tanto, estos resultados demuestran que durante el proceso de interacción *Monilinia*-pétalo la capacidad infectiva por parte de *Monilinia* resulta aumentada.

Para intentar determinar si la exposición de luz UVA tiene algún efecto sobre algún factor de virulencia de *Monilinia* spp., se decidió analizar la expresión génica de las PMEs de *M. laxa* ML8L aprovechando el hecho que esta cepa fue recientemente secuenciada (Naranjo-Ortiz et al. 2018). Previos estudios han demostrado una clara influencia de las PMEs durante el proceso infectivo de *M. laxa* en los melocotones, obteniendo una mayor expresión de *MIPME1, MIPME2, y MIPME3* en las horas posteriores a su inoculación (Baró-Montel et al. 2019).

Para intentar establecer si expresión génica de las PMEs estaba involucrada en el aumento de la capacidad infectiva observada en Monilinia bajo la exposición de luz UVA, se procedió al análisis de la expresión génica. No obstante, previamente, se decidió estudiar la calidad y la integridad de las muestras mediante la evaluación del ratio A260/280 y 260/280. En cuanto a nuestros resultados, la mayor parte de valores se encontraba en el rango óptimo para la relación 260/280. No obstante, los valores correspondientes a el ratio 260/230 fueron un poco inferiores, lo que podría reflejar la presencia de posibles contaminantes en la muestra (Desjardins et al. 2010). Por esa razón, se decidió realizar una electroforesis complementaria para comprobar su integridad. Tras realizar la electroforesis después de la extracción de ARN tanto como tras el tratamiento con las ADNasas se observaron dos bandas, la del 28S ARNr y al 18S ARNr, componentes de la subunidad grande y pequeña, respectivamente, de las células eucariotas (Henras et al. 2015)(Fleige et al. 2006). La banda del 28S ARNr presentaba mayor intensidad respecto a la de 18S ARNr, con un ratio 2:1. Esta relación obtenida para todas las muestras reflejaba que el ARN no se encontraba degradado, y que estaba intacto (Fleige et al. 2006). Así pues, mediante dicha electroforesis se consideró que las muestras no se encontraban degradadas. Esta condición resulta imprescindible para el posterior análisis de la expresión génica (Fleige et al. 2006). Además, también tras la determinación de la temperatura óptima de cada pareja de primers se observó amplificación en las dos temperaturas estudiadas y no se observaron bandas inespecíficas en ninguno de los casos. Este hecho reflejaba que no se amplificaron productos inespecíficos y que los primers eran los adecuados para seguir con el posterior análisis de las muestras. A pesar de obtener productos similares de amplificación en las dos temperaturas estudiadas, se decidió utilizar la temperatura de 60 °C ya que se trata de una temperatura más restrictiva y a su vez, evita posibles uniones inespecíficas (Bustin et al. 2017). En cuanto a la determinación de la concentración óptima de ADNc, los valores seleccionados de ADNc se encontraban dentro del intervalo de Ct adecuado [20-30] (Kuang et al. 2018). Además, en cuanto a los resultados de la eficiencia de los primers, se consideran aceptados los valores comprendidos entre 90-110% siendo un 100% el porcentaje ideal (Rogers-Broadway et al. 2015). Para todos los primers se obtuvieron valores dentro del intervalo mencionado a excepción del primer MIPME1 en el que se obtuvo una eficiencia un

poco superior al intervalo mencionado. Sus posibles causas podrían ser una contaminación cruzada, errores de pipeteo, o incluso la formación de dímeros de *primers* (Rogers-Broadway et al. 2015). Debido a que los valores no eran muy superiores a los esperados, y que se observó una única curva *melting*, se decidió seguir igualmente con el análisis con esta pareja de *primers*. Así pues, una vez analizados todos los parámetros anteriores, se analizó la expresión génica de las PMEs.

Cabe destacar que es la primera vez que se determina el efecto de la luz UVA en la expresión génica de las PMEs. No obstante, existen diversos estudios han determinado su efecto en condiciones similares. Algunos estudios han analizado el efecto de la luz UV en la expresión génica de las PMEs, utilizando menores longitudes de onda respecto la UVC. En concreto, un estudio reciente (Santin et al. 2019) ha demostrado una disminución de la expresión de las PMEs en melocotones tras la exposición de luz UVB durante un periodo corto de tiempo (10 y 60 minutos). Mientras que otros estudios que se han basado en medir la actividad enzimática de las PMEs en melocotones y nectarinas, no han observado efecto de la UVB en la expresión de las mismas (Scattino et al. 2016).

En nuestro estudio, el aumento significativo de la expresión génica de las PMEs de *M. laxa* ML8L en condiciones de luz UVA en comparación con la luz blanca, se observó en la mayor parte de los tiempos posteriores a su inoculación. Concretamente, a las 48 hpi en *MIPME2*, a partir de las 48 hpi en *MIPME3* y a las 72 hpi en *MIPME1*. Sin embargo, en el caso de *MIPME2* se obtuvo una menor expresión significativa a las 72 hpi en condiciones de luz UVA. Además, a pesar de que la incidencia de pétalos infectados era del 0 % a las 18 hpi en ambas condiciones de luz, a dicho periodo mencionado *Monilinia* ya estaba activando sus mecanismos de virulencia para poder infectar. Por lo general, el aumento de expresión por parte de las PMEs en la mayor parte de los casos podría estar relacionado con diversos motivos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la exposición de luz UVA desencadena al hongo la producción ROS (Rangel et al. 2007), generando así un ambiente de estrés oxidativo (Schumacher et al. 2017) (Wong et al. 2018). A su vez, durante la interacción patógeno-huésped también se producen altos niveles de ROS que el hongo debe ser

capaz de afrontar con la finalidad de terminar con su proceso infectivo (Rangel et al. 2015). Además, en el estudio proporcionado por Rangel et al. 2007, demostraron que la exposición de luz UVA durante el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* le confería posteriormente una mayor tolerancia y resistencia frente a condiciones de estrés (Rangel et al. 2007).

Por lo tanto, el estrés oxidativo generado por la luz UVA durante el crecimiento de *Monilinia,* podría conferirle posteriormente una mayor resistencia en las condiciones de estrés oxidativo durante su posterior interacción con su respectivo huésped (pétalos).

Por otra parte, se ha descrito que la luz UV es capaz de activar la cascada de señalización "*Mitogen-Activated Protein Kinase*" (MAPK). La activación de la MAPK está involucrada en la capacidad infectiva de diversos hongos, y se ha visto que desempeña un papel importante en la interacción con su respectivo huésped (Martínez-soto et al. 2017). Por ejemplo, su función ha sido descrita en algunos patógenos de plantas como *Botrytis cinérea,* hongo ascomiceta necrotrófico muy parecido a *Monilinia,* en el que demostraron que la activación de la misma está involucrada en su proceso infectivo (Leroch et al. 2015). Además, una potente activación de MAPK desencadena una mayor producción de estrés oxidativo (Son et al. 2011).

En el estudio proporcionado por Wu et al. 2017 demostraron que las MAPKs son capaces de regular la expresión génica de las EDPCs en *Valsa mali*, un hongo ascomiceta altamente destructivo en los manzanos. En este estudio demostraron que el gen del hongo *VmPmK1* (*mitogen-activated protein kinase gene*) desempeña un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo y en la integridad de la pared celular del hongo. Sus resultados reflejaban que la activación de *VmPmK1* estaba involucrada en la infección de *Valsa mali* a través de la regulación de la expresión génica de EDPC (Wu et al. 2017).

Por tanto, en nuestro estudio, la activación de las MAPKs, y su posterior producción de ROS, podría ser la responsable de provocar un incremento en la expresión de las PMEs en *Monilinia*, aumentando así su virulencia durante su interacción con los pétalos. Así, sería de interés profundizar en el análisis de las MAPKs en futuros estudios.

Además, atendiendo a los diferentes periodos de activación de las PMEs, a las 48 hpi *MIPME3* fue la que se encontraba más expresada. Por tanto, la expresión de *MIPME3* se activaba en etapas más tempranas de la infección para degradar la pared celular. La activación de *MIPME3* desencadenaría la expresión de *MIPME2*.

En cuanto a la expresión de *MIPME1* se obtuvieron menores niveles de expresión y se activaba en etapas más tardías en comparación con *MIPME2* y *MIPME3*. Este hecho sugeriría que su activación dependería de la activación conjunta de *MIPME2* y *MIPME3*.

Sin embargo, en el caso de *MIPME2* y *MIPME3* tras el aumento de expresión a las 48 hpi en condiciones de luz UVA, posteriormente, su expresión resultaba disminuida a las 72 hpi en las mismas condiciones de luz. Además, en el caso de *MIPME2* la expresión era significativamente menor a las 72 hpi en luz UVA en comparación a la luz blanca. El estudio proporcionado por Lionetti et al. 2017, determinaron que cuando las PMEs alcanzan niveles altamente dañinos durante los periodos finales de la infección, las plantas como defensa al daño celular causado por el patógeno activan la expresión de los inhibidores de las PMEs (PMEIs) con la finalidad de disminuir la expresión de las PMEs por parte del hongo (Lionetti et al. 2017). A su vez la menor expresión observada a las 72 hpi en luz UVA respecto a la luz blanca en el caso de *MIPME2* podría reflejar que la luz UVA confiere a las PMEs por parte del huésped cuando la expresión de PMEs de *Monilinia* ha alcanzado niveles altamente elevados.

Atendiendo a los resultados obtenidos, en futuras investigaciones sería de gran interés de estudiar los fotorreceptores involucrados en el proceso infectivo de *Monilinia*. A su vez, también se podrían realizar *knockouts* de MAPKs en *Monilinia* con la finalidad de determinar su implicación en la actividad de las PMEs. Además, sería interesante estudiar si existen diferencias en cuanto a los niveles de estrés oxidativo producidos en *Monilinia* previamente y posteriormente a la exposición a luz UVA. Por último también, resultaría de interés analizar la expresión de PMEI en su proceso de interacción pétalo-*Monilinia*.

#### 6. Conclusiones

Finalmente, atendiendo a los resultados obtenidos se han llegado a las siguientes conclusiones:

- 1. La luz UVA disminuye el porcentaje de conidios germinados en las tres cepas de *Monilinia* a las 2 hpi.
- M. fructicola CPMC6 y M. laxa CPML11 muestran un perfil de germinación similar a las 4 hpi y 6 hpi en ambas condiciones de luz, mientras que a las 2 hpi M. fructicola CPMC6 muestra menor porcentaje de conidios germinados en luz UVA. A su vez, M. laxa ML8L muestra un mayor periodo de latencia respecto a M. fructicola CPMC6 y M. laxa CPML11
- Crecer *M. laxa* en condiciones de luz UVA da lugar a una mayor incidencia de pétalos infectados a las 72 hpi y 144 hpi.
- 4. *M. laxa* ML8L presenta menor incidencia en ambas condiciones de luz respecto a *M. laxa* CPML11.
- 5. *M. laxa* ML8L presenta una mayor expresión de *MIPME1* a las 72 hpi en condiciones de luz UVA.
- 6. *M. laxa* ML8L presenta una mayor expresión de *MIPME2* a las 48 hpi en condiciones de luz UVA, y a las 72 hpi en luz blanca.
- 7. *M. laxa* ML8L presenta mayor expresión de *MIPME3* a las 48 hpi y a las 72 hpi en condiciones de luz UVA.
- MIPME2 y MIPME3 presentan una mayor expresión respecto MIPME1 en M. laxa ML8L

En general, este trabajo demuestra un aumento de la virulencia de *Monilinia* cuando se encuentra sometido a condiciones de UVA. Los resultados de este trabajo abre la puerta al inicio del estudio de tratamientos alternativos dirigidos para combatir la podredumbre marrón.

#### 7. Autoevaluación

Este trabajo se basa en los resultados obtenidos durante las prácticas curriculares y extracurriculares realizadas de marzo a julio de 2019 en el grupo de investigación de Patología de la Poscosecha del IRTA. Durante la realización de este trabajo he aprendido una gran cantidad de técnicas de manipulación de material vegetal gracias a la buena formación recibida por parte de Núria-Vall-llaura, Rosario Torres Sanchis y Sandra Serrano Moreno. A su vez, aparte de haber podido ser capaz de trabajar de manera autónoma, he aprendido que el trabajo en grupo es uno de los pilares fundamentales de la investigación.

De manera general me siento muy afortunada de haber podido realizar este proyecto sobre uno de los campos de investigación que más me apasionan. Además, me siento muy orgullosa de llevar a cabo este proyecto de investigación junto al buen apoyo y compañerismo del grupo de Patología de la Poscosecha del IRTA.

#### 8. Bibliografía

- Aihara, M; Lian, X; Shimohata, T; Uebanso, T; Mawatari,K; Harada, Y; Akutagawa, M; Kinouchi, Y; Takahashi A. 2014. "Vegetable Surface Sterilization System Using UVA Light- Emitting Diodes." *The journal of Medical Investigation*, 61 (3-4): 285–290
- Avance Anuario de Estadística, 2018. Retrieved June, 12, 2019 from : https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/avance/AvAE18.pdf
- Baró-Montel, N ; Vall-laura, N ; Usall, J ; Teixidó, N, Naranjo-Ortiz, A ; Gabaldón, T; Torres, R. 2019. "Pectin Methyl Esterases and Rhamnogalacturonan Hydrolases : Weapons for Successful Monilinia Laxa Infection in Stone Fruit". *Plant Pathology*, 68: 1–13.
- Bayram, O ; Biesemann, C ; Krappmann, S ; Galland, P ; Braus , GH. 2008. "More Than a Repair Enzyme : Aspergillus Nidulans Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual." *Molecular Biology of the Cell*, 19: 3254–3262.
- Bellincampi, D ; Cervone F ; Lionetti, V. 2014. "Plant Cell Wall Dynamics and Wall-Related Susceptibility in Plant – Pathogen Interactions." *Frontiers in Plant Science*, 5: 228.
- Bernat, M ; Segarra, J ; Xu, X.-M ; Casals, C ; Usall. 2017. "Influence of Temperature on Decay , Mycelium Development and Sporodochia Production Caused by Monilinia Fructicola and M . Laxa on Stone Fruits." *Food Microbiology*, 64: 112–118.
- Berrocal-tito, G.M ; Esquivel-Naranjo E.U ; Horwitz B.A ; Herrera-estrella, A. 2007. "Trichoderma Atroviride PHR1, a Fungal Photolyase Responsible for DNA Repair, Autoregulates Its Own Photoinduction. *Eukaryotic Cel*, 6(9): 1682–1692.
- Bluhm, B.H ; Dunkle, L.D. 2008. "PHL1 of Cercospora Zeae-Maydis Encodes a Member of the Photolyase / Cryptochrome Family Involved in UV Protection and Fungal Development." *Fungal Genetics and Biology*, 45 (10): 1364–1372.
- Bustin, S ; Huggett, J. 2017. "qPCR primer design revisited." *Biomolecular Detection* and Quantification, 14 : 19–28.
- Casals, C ; Segarra J ; De Cal, A ; Lamarca, N; Usall, J. 2015. "Overwintering of Monilinia spp on Mummified Stone Fruit", *Journal of Phytopathology*, 163: 160–67.
- Castronuovo, D ; Sofo, A ; Lovelli, S ; Candido, V ; Scopa A. 2017. "Effects of UV-C radiation on common dandelion and purple coneflower", *International Journal of Plant Biology*, 8 (1): 7255–61.
- Cindi, M.D ; Soundy P ; Romanazzi G ; Sivakumar, D, 2016. "Different defense responses and brown rot control in two *Prunus Persica* cultivars to essential oil vapours after storage." *Postharvest Biology and Technology*, 119: 9–17.
- Costa, J, 2004. "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real." Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22 (5): 299–305.
- Crisafuli, FA ; Ramos, EB, Rocha, MS. 2015. "Characterizing the interaction between DNA and GelRed Fluorescent Stain." *European biophysics journal*, 44(1-2): 1–7.
- De Cal, A ; Melgarejo, P, 1999. "Effects of Long-Wave UV Light on Monilinia Growth and Identification of Species." *Plant Disease*, 83(1): 62-65.
- De Cal, A; Sandín-España, P ; Martínez, F ; Egüen, B ; Chien-Ming, C ; Lee, MHV ; Melgarejo, P ; Prusky, D. 2013. "Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of Monilinia fructicola on peach fruit". *Postharvest Biology and*

*Technology*, 86 : 418–423.

- Desjardins, P ; Conklin D, 2010. "NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids" *Journal of visualized experiments*, 45 : 2565.
- FAOSTAT, 2017, Database of food and agriculture organization of the United Nations. Retrieved 30 June, 2019 from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC
- Fleige, S ; Pfaffl, MW, 2006. "RNA integrity and the effect on the Real-Time qRT-PCR performance." *Molecular aspects of medicine* 27 (2-3):126-139.
- Garcia-Benitez, C ; Melgarejo, P ; De Cal, A ; Fontaniella, B. 2016. "Microscopic Analyses of Latent and Visible *Monilinia Fructicola* Infections in Nectarines." *PLoS One*, 11(8): e0160675.
- Garcia-Benitez, C ; Melgarejo P, ; Sandin-España, P ; Sevilla-Morán, B ; De Cal, A. 2019. Degrading enzymes and phytotoxins in Monilinia spp. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2) : 305–318.
- Hamamoto, A ; Mori, M ; Takahashi A ; Nakano, M ; Wakikawa, N ; Akutagawa, M ; Ikehara, T ; Nakaya, Y ; Kinouchi, Y. 2007. "New water disinfection system using UVA light-emitting diodes." *Journal of applied microbiology*, 103 (6): 2291–2298.
- Henras, AK ; Plisson-Chastang C ; O'Donohue MF ; Chakraborty A ; Gleizes PE. 2015. "An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes." *Willey Interdisciplinary reviews. RNA*, 6 (2):225-242.
- Kihara, J; Moriwaki, A; Tanaka N; Ueno, M; Arase S. 2007. "Characterization of the BLR1 gene encoding a putative blue-light regulator in the phytopathogenic fungus *Bipolaris Oryzae.*" *FEMS Microbiology letters*, 266 (1): 110–118.
- Komalapriya, C; Kaloriti, D; Tillmann, AT; Yin, Z; Herrero-de-Dios, C; Jacobsen, MD; Belmonte, RC; Cameron, G; Haynes, K; Grebogi, C; de Moura, AP; Gow, NA; Thiel, M; Quinn, J; Brown, AJ,; Romano, MC. 2015. "Integrative Model of Oxidative Stress Adaptation in the Fungal Pathogen Candida Albicans." *PLoS One* : 10 (9) e0137750.
- Koutchma, T ; Popovi, V ; Ros-polski, V ; Popielarz, A. 2016. "Effects of Ultraviolet Light and High-Pressure Processing on Quality and Health-Related Constituents of Fresh Juice Products." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (5).
- Kuang, J ; Yan, X ; Genders, AJ ; Granata, C ; Bishop, DJ. 2018. "An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research." : 13 (5): e0196438.
- Lastochkina, O; Seifikalhor, M; Aliniaeifard, S; Baymiev, A Pusenkova, L; Garipova, S ; Kulabuhova, D; Maksimov, I. 2019. "Bacillus Spp : Efficient Biotic Strategy to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables." *Plants (Basel, Switzerland)*, 8 (4) : pii: E97.
- Leroch, M ; Mueller, N ; Hinsenkamp, I ; Hahn, M. 2015. "The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in Botrytis Cinerea." *Molecular Plant Pathology*, 16 (8): 787–798.
- Lionetti, V; Fabri, E; De Caroli, M; Hansen A.R; Willats, W.G.T; Piro, G; Bellincampi, D. 2017. "Three pectin methylesterase inhibitors protect cell wall integrity for arabidopsis immunity to Botrytis". *Plant Physiology*, 173(3):1844–1863.
- Mari, M ; Di Francesco, A ; Bertolini, P. 2014. "Control of fruit postharvest diseases: Old issues and innovative approaches". *Stewart Postharvest Review*, 10(1).
- Martínez-soto, D ; Ruiz-herrera, J. 2017. "Functional Analysis of the MAPK Pathways in Fungi." *Revista Iberoamericana de Micología*, 34 (4): 192-202.

- Martini, C ; Mari, M. 2014. *Monilinia Fructicola, Monilinia Laxa (Monilinia Rot, Brown Rot)*. *Postharvest Decay: Control Strategies, Academic Press* Elsevier :233-265.
- Mayer, NA ; Bianchi, VJ ; Feldberg, NP ; Morini S. 2017 "ADVANCES IN PEACH , NECTARINE AND PLUM PROPAGATION 1."*Revista Brsileira de Fruticultura*, 39 (4): e-355.
- Naranjo-Ortiz, M.A ; Rodríguez-Píres, S ; Torres, R ; De Cal, A ; Usall, J. 2018. "Genome Sequence of the Brown Rot Fungal Pathogen Monilinia Laxa." *American Society of Microbiology*, 6 (17) pii: e00214-18.
- Obi, VI ; Barriuso, JJ ; Gogorcena, Y. 2018. "Peach Brown Rot : Still in Search of an Ideal Management Option." *Agriculture*, 8 (8) : 125.
- Oliveira Lino, L; Pacheco I; Mercier V; Faoro F; Bassi D; Bornard I; Quilot-Turion B, 2016. "Brown Rot Strikes Prunus Fruit: An Ancient Fight Almost Always Lost". *Journal of Agricultural and food and chemistry*, 64 (20): 4029-4047.
- Özer Uyar, G.E ; Uyar, B, 2018. "Effects of ethanol and ultraviolet-c treatments on inactivation of *Rhizopus Oryzae* spores which cause postharvest rot." *Food Science and Technology*, 2061: 1–5.
- Pfaffl, MW. 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR." *Nucleic acids research*, 29(9): e45.
- Rangel, DEN ; Roberts, D. 2007. "Inducing UV-B tolerance of *Metarhizium Anisopliae* var . *anisopliae* conidia results in a trade-off between conidial production and conidial stress tolerance." *Journal of Anhui Agricultural University*, 34 (2): 195– 202.
- Rangel, D.E.N; Braga, G.U.L; Fernandes, E.K.K; Keyser, CA; Hallsworth, J.E; Roberts, D.W, 2015. "Stress tolerance and virulence of insect - pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation." *Current genetics*, 61 (3):383-404.
- Rogers-Broadway, KR ; Karteris, E. 2015. "Amplification efficiency and thermal stability of qPCR Instrumentation : Current landscape and future perspectives." *Experimental and therapeutic medicine*, 10(4) : 1261–1264.
- Santin, M ; Giordani, T ; Cavallini, A ; Bernardi, R, Castagna A ; Hauser, MT; Ranieri, A. 2019. "UV-B exposure reduces the activity of several cell-wall-dismantling enzymes and affects the expression of their biosynthetic gene in peach fruit (Prunus persica L., cv Fairtime, melting, phenotype)", *Photochemical and photobiological sciences*", 15(5):1280-1289.
- Scattino, C ; Negrini N ; Morgutti S ; Cocucci M ; Crisosto CH ; Tonutti P ; Castagna A ; Ranieri A. 2016. "Cell wall metabolism of peaches and nectarines treated with UV-B radiation : a biochemical and molecular approach." *Journal of the science of food and agriculture*, 96 (3): 939-947.
- Schumacher, J. 2017. "How Light Affects the Life of Botrytis." *Fungal Genetics and Biology*, 106: 26-41.
- Sethi, S ; Joshi, A ; Arora, B. 2018. "UV Treatment of Fresh Fruits and Vegetables". *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. Academic Press* Elsevier.
- Shekhova, E ; Kniemeyer, O ; Brakhage, AA. 2017. "Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against Aspergillus Fumigatus." Antimicrobial agents and chemotheraphy, 61(11): pii: e00978-17.
- Shen, Q ; Yang, R. 2015. "Thompson-Tau outlier detection method for detecting

abnormal data of listed pharmaceutical companies in China. In computational Intelligence and Design". *International Symposium on Computational Intelligence and Design* : 1 (379-382).

- Son, Y ; Cheong, YK ; Kim, NH ; Chung, HT; Kang, DG ; Pae, HO. 2011. "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species : How Can ROS Activate MAPK Pathways ?" *Journal of Signal Transduction*, 2011 (2011):792639.
- Surjadinata BB ; Jacobo-Velázquez, DA ; Cisneros-Zevallos, L. 2017. "UVA, UVB and UVC Light Enhances the Biosynthetic of Phenolic Antioxidants in Fresh-Cut Carrot through a Synergistic Effect with wounding". *Molecules (Basel Switzerland)*. 24(22) : pii: E668.
- Tamay De Dios, L ; Ibarra, C ; Velasquillo, C, 2013 "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real" *Tecnologia en salud*, 2 (2) : 70-78.
- Thind, TS ; Schilder, AC. 2018. "Understanding photoreception in fungi and its role in fungal development with focus on phytopathogenic fungi." *Indian Phytopathology*. 71 (2) : 169-182.
- Turtoi, M. 2014. "Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface : A Review" Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 19 (3):325-337
- Usall, J ; Casals, C ; Sisquella M. ; Palou, L. ; De Cal, A. (2015). Alternative technologies to control postharvest diseases of stone fruits. *Stewart Postharvest Review*, *11*(4), 1–6.
- Usall, J ; Ippolito, A ; Sisquella, M ; Neri, F. 2016. "Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables." *Postharvest Biology and Technology* 122: 30–40.
- Villarino, M ; Melgarejo. 2010. "Primary Inoculum Sources of Monilinia spp . in Spanish Peach Orchards and Their Relative Importance in Brown Rot". *Plant disease*, 94(8) : 1048-1054.
- Villarino, M ; Melgarejo, P ; De Cal. 2016. "Growth and aggressiveness factors affecting Monilinia spp . survival Peaches." *International Journal of Food Microbiology*, 224 : 22-27.
- Wong, HJ ; Mohamad-Fauzi, N ; Rizman-Idid, M ; Convey, P. 2018. "Protective mechanisms and responses of micro-fungi towards ultraviolet- induced cellular damage." *Polar Science*, 20 (1): 19–34.
- Wormit, A ; Usadel, B. 2018. "The Multifaceted Role of Pectin Methylesterase Inhibitors (PMEIs). International Journal of Molecular Sciences", 19 (10): pii: E2878.
- Wu, Y ; Xu, L ; Liu, J ; Yin, Z ; Gao, X ; Feng, H ; Huang, L. 2017. "A mitogen-activated protein kinase gene (VmPmk1) regulates virulence and cell wall degrading enzyme expression in Valsa mali. Microbial Pathogenesis, 111 : 298-306
- Yokoyama, R ; Shinohara, N. ; Asaoka, R ; Narukawa, H. ; Nishitani, K. (2014). "The biosynthesis and function of polysaccharide components of the plant cell wall".
  In Hiroo Fukuda (Ed.), *Plant cell wall pattering and cell shape*. John Wiley & Sons, Inc.

#### Anexo 1.

#### 1.1. Tablas materiales y métodos

Componente	Casa comercial	Concentración (g/mL)
PDA	<b>Biokar Diagnostics</b>	0,039 g/mL
Agar	Merck	0,003 g/mL
Agua Milli-Q	Merck Millipore	74,67 % (v/v)
Tomate	-	25,33 % (v/v)

Tabla 1. Componentes del medio PDA suplementado con tomate

Tabla 2. Composición del reactivo TBE 20X

Reactivo	Casa comercial	Concentración final
Tris base	T1378 Sigma-Aldrich	1,7831M
Ácido bórico	B6768 Sigma-Aldrich	1,7891M
EDTA	E9884 Sigma-Aldrich	0,5M
RNAse free water	Fisher Scientific	Ajustar a 1 litro

Tabla 3. Composición del tampón de carga 10X

Reactivo	Casa comercial	Concentración final
Glicerol	G5516 Sigma-Aldrich	50 %
TBE	T4415 Sigma-Aldrich	10 x
EDTA	E9884 Sigma-Aldrich	1 mM pH=8
Orange G	O3756 Sigma Aldrich	0,25 %

Tabla 4. Reactivos con sus correspondientes cantidades para preparar la mix 1.

Mix 1 ( Volumen final = 13µL)	
Componente	Volumen
ARN 1 µg	X μL
50 mM Oligo d (T) 20	1 μL
10 mM dNTP mix	1 μL
H₂O estéril	11-x

Para cada muestra se calculó el correspondiente (según la [cADN]) para obtener un total 1 µg.

Tabla 5. Componentes del mix 2 para la síntesis de ADNc

Mix 2 (Volumen final = 7 μL)				
Componente	Volumen			
Tampón 5x SSIV	4 μL			
100 mM DTT (Ditiotreitol)	1 μL			
Inhibidor de ribonucleasa	1 μL			
Transcriptasa reversa Superscript IV (200	1 μL			
U/μL)				

<i>M. laxa</i> ID	Nombre	Función	Primer forward y	Secuencia 5' a 3'
	del gen	proteica	reverse	
Monilinia	MIACT	Actina	Primer forward	TCTTGAGAGCGGTGGTATCC
_011730			Primer reverse	AACCACCGATCCAGACAGAG
Monilinia	MIHISH3	Histona	Primer forward	TCCGTCGTTACCAAAAGTCG
_062010		H3	Primer reverse	GGCGAGTTGGATGTCCTTAG
Monilinia	MIPME1	Pectina	Primer forward	ACTATTTGGGACGTCCATGGG
_037510		metil	Primer reverse	ATGGCAATTGGAGAGACTACGC
		esterasa		
Monilinia	MIPME2	Pectina	Primer forward	AGACCATGGAGAGACTACGC
_038540		metil	Primer reverse	TGTAGTCGACACCCAAGACG
		esterasa		
Monilinia	MIPME3	Pectina	Primer forward	TGTCTACCTTGGTCGTCATG
_000370		metil	Primer reverse	TTGCTACCCAAGAGCTCACC
		esterasa		

#### Tabla 6. Secuencia 5' a 3' de los primers utilizados

Tabla 7. Volumen y concentración para cada uno de los reactivos que conforman una reacción de PCR proporcionados por la casa comercial IBIANLab

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen /12,5 μL	Volumen mix (25 muestras)
Tampón PCR	10x	1x	1,25 μL	31,25 μL
dNTPs mix	40 mM	800 Mm	0,25 μL	6,25 μL
Primer foward	10 µM	0,4 Mm	0,50 μL	
Primer reverse	10 µM	0,4 μM	0,50 μL	
IBIAN Taq ADN Polimerasa	5U/µL	1,25 – 5 Unidades	0,30 μL	7,5 μL
Molde de ADN	10 a 500 ng/reacció	50 ng/reacción	xμL	
Agua estéril	Ajustar a un volumen de 12,5 μL	Ajustar a un volumen de 12,5 μL	9,7-x μL	

X corresponde al volumen de ADN añadido para obtener un total de 50 ng en cada reacción

Tabla 8. Concentración y correspondientes volúmenes para cada uno de los reactivos para la qPCR

qPCR master mix (10 μL)	Concentración	Volumen (1 muestra)	Volumen mix (95 muestras)
KAPA SYBR	0,5x	5 μL	475 μL
Fast			
Foward primer	100 µM	0,3 μL	-
Reverse primer	100 µM	0,3 μL	-
ADN molde	Variable	2 μL	-

ROX Low	0,5x	0,2 μL	19 µL
H <sub>2</sub> O estéril	-	2,2 μL	209µL

## 1.2. Figuras materiales y métodos



Figura 4. Cámara de Thoma



Figura 5. Protocolo de la PCR para la síntesis de ADNc (Invitrogen)

#### Anexo 2.

### 2.1. Resultados de la cuantificación de ARN

Tabla 11. Resultados de la cuantifación del ARN crudo y tras el tratamiento con las ADNasas

	ARN CRUDO			ARN tratado con ADNasas		
	[RNA]			[RNA]		
Muestra	(ng/µL)	A260/280	A260/230	(ng/µL)	A260/280	A260/230
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi Blanca 1R	227,9	1,99	0,97	164,7	1,84	0,7
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi Blanca 2R	291,3	1,98	0,74	211,9	1,28	0,85
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi Blanca 3R	370,3	1,97	1,3	242,7	1,49	1,03
<i>M. laxa</i> ML8L 48 hpi Blanca 1R	225,9	1,99	1,52	152	1,87	1,05
<i>M. laxa</i> ML8L 48 hpi Blanca 2R	167,1	1,95	0,55	111	1,84	0,49
<i>M. laxa</i> ML8L 48 hpi Blanca 3R	223,8	1,99	1,23	149,6	1,85	0,86
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi Blanca 1R	297	2,02	1,5	175,1	1,9	1,13
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi Blanca 2R	305,4	2	1,35	300	1,95	1,03
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi Blanca 3R	334,3	2	1,43	221,5	1,88	1,1
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi UVA 1R	207,4	1,93	1,08	141,7	1,8	0,84
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi UVA 2R	201,3	1,99	0,75	152,9	1,82	0,59
<i>M. laxa</i> ML8L 18 hpi UVA 3R	169,5	2,02	0,96	119,2	1,84	0,65
M. laxa ML8L 48 hpi UVA 1R	230,8	1,99	0,77	126,2	1,8	0,54
<i>M. laxa</i> ML8L 48 hpi UVA 2R	274,7	1,99	1,16	367	1,6	0,62
<i>M. laxa</i> ML8L 48 hpi UVA 3R	169,1	1,94	0,95	121,6	1,77	0,66
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi UVA 1R	563	1,97	1,45	366,5	1,9	1,19
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi UVA 2R	256,1	2,01	1,03	171,6	1,82	0,76
<i>M. laxa</i> ML8L 72 hpi UVA 3R	282,1	2	1,27	189,1	1,85	0,91