



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Efecte de l'ambient matern en la defensa enfront *Heterobasidion annosum* en la progènie de *Pinus pinaster*

TREBALL DE FI DE GRAU

GRAU DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARIA CABALLOL ALSINELLA

TUTOR ACADÈMIC: M^a DEL CARMEN PORTILLO

TUTOR PROFESSIONAL: JONÀS OLIVA

17 DE JUNY DEL 2019, TARRAGONA

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair al Jonàs Oliva l'oportunitat de realitzar les pràctiques i el treball de fi de grau en el grup de Microbiòmica Forestal i Patologia Vegetal de la Universitat de Lleida. M'agradaria destacar la confiança que va mostrar en mi des del primer dia, així com tots els coneixements que m'ha transmès i el temps que ha dedicat en resoldre'm els dubtes.

Voldria donar les gràcies a l'Àlex, la Lucía i l'Eduard per l'atenció i la disponibilitat que m'han mostrat durant l'estada en pràctiques.

També vull agrair a la meva tutora M^a del Carmen Portillo l'atenció i assessorament envers el desenvolupament del treball.

Finalment, expressar l'agraïment a tota la meva família i amics. Especialment, als meus pares i la meva germana, no solament per confiar en mi, sinó també per recolzar-me sempre en totes les meves decisions.

ÍNDEX

DADES DEL CENTRE	5
RESUM.....	6
1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. Resposta immunitària en les plantes	7
1.2. Efectes materns trans-generacionals.....	8
1.3. Regulació epigenètica en plantes.....	9
1.4. Regulació de la defensa en coníferes.....	11
1.4.1. <i>Pinus pinaster</i>	11
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	13
3. METODOLOGIA.....	14
3.1. Exposició de <i>Pinus pinaster</i> als ambients materns	14
3.2. Infecció de la progènie de <i>Pinus pinaster</i>	14
3.3. Extracció de l'ADN	16
3.4. Quantificació i qualitat de l'ADN.....	17
3.5. PCR quantitativa.....	17
3.6. Anàlisi estadística.....	18
4. RESULTATS	20
4.1. Efecte de l'ambient matern en la progènie de <i>Pinus pinaster</i>	20
4.1.1. Tractament d'inducció mitjançant talls en les acícules	20
4.1.2. Tractament d'inducció mitjançant el dany mecànic	20
4.1.3. Tractament d'inducció amb MeJA	21
4.2. Efecte del diàmetre en la resistència de la progènie enfront <i>H. annosum</i>	22
4.3. Inducció de la resistència en regions distants al focus infeccios.....	24
5. DISCUSSIÓ.....	25
6. CONCLUSIÓ.....	27
7. BIBLIOGRAFIA.....	28
8. AUTOAVALUACIÓ.....	31
ANNEX 1: Protocol d'extracció d'ADN genòmic de plantes	33

DADES DEL CENTRE

Aquest treball de fi de grau es basa en l'estada de pràctiques al grup de recerca Microbiòmica Forestal i Patologia Vegetal de la Universitat de Lleida (UdL).

El grup forma part del Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal de la UdL i es troba situat en el campus de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària (ETSEA). El campus es troba en un constant creixement i ampliació que el situa com la primera institució en l'àrea de coneixement de l'agricultura i les ciències biològiques a Espanya i el principal campus agroalimentari i forestal de Catalunya (FECYT, 2016).

Les principals línies d'investigació del Departament es basen en els camps de coneixement de la producció vegetal, la biotecnologia vegetal, el control integrat de plagues, la millora genètica i la patologia vegetal.

El grup és liderat des de l'inici pel Dr. Jonàs Oliva i es troba localitzat a l'edifici d'Agrotecnio a ETSEA, centre especialitzat en l'àmbit agroalimentari i vegetal.

L'interès del grup se centra en l'estudi dels patògens invasors i nadius a diferents escales geogràfiques. Així com l'impacte ecològic i econòmic que causen als diferents sistemes agrícoles i forestals. Per aquest motiu, hi ha diverses investigacions sobre l'ecologia funcional dels patògens, el rol que presenten en la biodiversitat dels boscos, la resistència trans-generacional en els arbres, els costos metabòlics i transcriptòmics en els mecanismes de defensa dels arbres i l'establiment de mètodes de detecció precoços de patògens invasors.

RESUM

Els arbres són organismes exposats constantment a estímuls externs estressants. Les coníferes són organismes longeus que estan en contacte amb un entorn canviant al llarg del cicle de vida. Degut a la naturalesa sedentària de les coníferes, és possible que la progènie es desenvolupi en el mateix entorn matern. Proporcionar a la progènie un mecanisme d'adaptació als estímuls estressants de l'ambient resultaria avantatjós. Aquest mecanisme es coneix com efectes materns trans-generacionals. En l'estudi s'analitza per qPCR l'abundància del patogen *Heterobasidion annosum* en la progènie de *Pinus pinaster* exposat a diferents ambients materns. Els arbres materns de tres genotips diferents es van exposar a diferents ambients materns amb tractaments mecànics (dany mecànic o tallar les acícules), amb l'inductor químic jasmonat de metil o es van deixar sense tractar com a control. Les mostres dels pins es van dividir en dues regions en funció del punt d'inoculació del patogen. Els resultats van mostrar una dependència entre l'abundància del patogen i el diàmetre de la progènie dels ambients materns amb tractaments mecànics. Els arbres més petits eren aquells on l'abundància del patogen era major, indicant una menor capacitat de defensa o una menor tolerància al patogen. Si més no, en el cas de la progènie de l'ambient tractat amb jasmonat de metil no es va observar dependència, indicant una major resposta al patogen o una major tolerància. El genotip matern i la regió en funció de la distància al punt d'infecció no van afectar a la resposta de la progènie enfront el patogen.

Paraules clau: *Pinus pinaster*, *Heterobasidion annosum*, efectes trans-generacionals, defensa, ambient matern, jasmonat de metil, dany mecànic.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Resposta immunitària en les plantes

Les plantes són organismes exposats constantment a factors externs que exerceixen estrès en el seu creixement. L'estrès biòtic està causat per agents patògens com bacteris, fongs, virus, insectes, nematodes i herbívors. En canvi, l'estrès abiòtic pot estar provocat per un dèficit hídric i nutricional, temperatures extremes, salinitat, presència de metalls i estrès lumínic.

Les plantes, al tractar-se d'organismes sèssils, han de tenir la capacitat de distingir les senyals inofensives de les nocives. Conseqüentment, les plantes han desenvolupat diversos mecanismes enfront els patògens. Aquests mecanismes de defensa o immunitat es classifiquen en els constitutius i induïbles. Els mecanismes comprenen diverses estructures, compostos químics i proteïnes per evitar la infecció.

La defensa constitutiva, pre-existent o passiva ve determinada genèticament i es troba abans de l'exposició al patogen. La defensa consisteix en diferents estructures cel·lulars, ubicades principalment a la superfície de la planta per evitar l'entrada del patogen. La cutícula, les capes de cera, l'epidermis, l'escorça, la paret cel·lular i els tricomes actuen com a barreres físiques en alguns casos. Alguns tipus cel·lulars produeixen i emmagatzemen compostos tòxics enfront els patògens. Aquests productes provinents del metabolisme secundari són els compostos fenòlics, els terpenoides, els alcaloides i els glucòsids cianògens.

A diferència de la defensa constitutiva, el mecanisme de defensa induïble s'activa com a resposta a l'atac del patogen. És un mecanisme actiu en el què es produeixen canvis metabòlics produïts per l'expressió diferencial de gens. La defensa mecànica induïda es basa en evitar una major colonització mitjançant barreres físiques. En aquesta resposta es produeix la lignificació, la suberització del teixit vegetal, la formació de papil·les de cal·losa i la necrosi del teixit, també anomenada resposta hipersensible (HR). La HR consisteix en la mort cel·lular localitzada en la planta i es produeix en el lloc d'infecció del patogen, limitant el creixement del patogen i conferint resistència.

La defensa química induïda es basa en la síntesi de substàncies tòxiques com els terpenoides, alcaloides i compostos fenòlics que inhibeixen el creixement del patogen a la planta. També es produeix la síntesi de jasmonat, àcid salicílic i etilè per activar les vies de senyalització hormonals que condueixen a la resistència induïda. Aquesta resposta inclou la resistència sistèmica adquirida (SAR) i la resistència sistèmica induïda (ISR). La SAR és induïda per factors biòtics i/o abiòtics en la planta, produint la síntesi d'àcid salicílic i l'expressió dels gens de les proteïnes de resistència (PR) amb activitat antifúngica i antimicrobiana. En canvi, la ISR és induïda per l'exposició de les arrels a microorganismes de la rizosfera i dependent de la senyalització activada per jasmonat i etilè (Pieterse and Van Wees, 2015).

A part d'activar-se en el focus infecciós, la resposta també es produeix en regions distants al punt d'infecció, conferint una àmplia resistència a la planta. La inducció pot durar anys, permetent a les plantes mantenir una memòria que els proporciona una resposta més ràpida en el futur enfront aquell estímul extern. A més, també es coneix que prepara a la descendència pel tipus d'estrès que ha patit l'anterior generació (Pieterse and Van Wees, 2015).

Com alternativa a la resistència, les plantes també poden desenvolupar tolerància. Aquest mecanisme de defensa es basa en la reducció de l'efecte negatiu de la infecció sense afectar a la multiplicació del patogen. No obstant això, la base genètica, així com els mecanismes que promouen la tolerància han estat poc estudiats (Peterson et al., 2017).

1.2. Efectes materns trans-generacionals

La plasticitat del fenotip que permet a les plantes adaptar-se a un estrès no es pot explicar únicament per canvis genètics. L'adaptació es produeix directament a la progènie de les plantes exposades a l'estímul extern. Atès que la freqüència de mutacions és baixa, de 10^{-7} – 10^{-8} per nucleòtid i generació, es necessitarien moltes generacions per establir les característiques que permetessin l'adaptació a l'entorn. En canvi, les modificacions epigenètiques representen un mecanisme sensible als estímuls externs per regular l'expressió gènica sense modificar la

seqüència d'ADN. Per tant, els canvis epigenètics expliquen l'adaptació de la descendència al medi ambient mitjançant la plasticitat del fenotip (Boyko and Kovalchuk, 2011).

Degut a la naturalesa sedentària de les plantes, és possible que gran part de la progènie es desenvolupi en l'ambient matern. Per tant, en teoria, proporcionar informació a la progènie de les condicions d'estrès freqüents en el lloc on creixeran seria avantatjós. La memòria adquirida per l'exposició als factors estressants es coneix com memòria trans-generacional o efectes materns trans-generacionals. La memòria permet "recordar" les condicions ambientals i els estímuls externs per modular el fenotip de la progènie (Boyko and Kovalchuk, 2011).

Malgrat que es coneixia que els estímuls de l'entorn presentaven efecte en els fenotips de la descendència en altres organismes, no va ser fins l'any 1983 que es va estudiar l'impacte de l'ambient matern en plantes, concretament en *Nicotiana tabacum*. Es va observar que la inoculació del virus del mosaic del tabac (TMV) induïa resistència en la progènie de les plantes infectades (Roberts, 1983). Més tard, es van realitzar altres estudis en *Raphanus raphanistrum* que van demostrar que l'atac d'insectes herbívors i l'aplicació d'àcid jasmònic induïa resistència en la progènie (revisat per Holeski et al., 2012).

Diversos estudis han vist que els efectes trans-generacionals han estat observats en relació a l'atac de patògens i d'insectes herbívors i enfront l'estrès abiòtic causat per temperatures extremes, elevades concentracions de sal i de metalls pesants, estrès oxidatiu i radiacions (revisat per Boyko and Kovalchuk, 2011). En els darreres anys, *Arabidopsis thaliana* ha esdevingut el principal organisme en l'estudi de la regulació epigenètica en plantes enfront estressos biòtics i abiòtics (revisat per Holeski et al., 2012).

1.3. Regulació epigenètica en plantes

Les plantes són capaces de detectar els estímuls externs durant el creixement i "memoritzar-los". Els mecanismes epigenètics han estat estudiats com els

principals causants dels diferents patrons d'expressió gènica que confereixen resistència a la progènie (Munshi et al., 2015).

El terme epigenètica fa referència als canvis que afecten a l'expressió gènica, però també descriu els canvis fenotípics hereditaris que no poden ser explicats per canvis en la seqüència d'ADN. Les principals modificacions epigenètiques en les plantes són la metilació, la modificació de les histones i l'ARN d'interferència (ARNi) (Munshi et al., 2015).

La metilació és la modificació enzimàtica que addiciona un grup metil al 5-carboni (5mC) de la citosina. En les plantes, té lloc en les regions CpG, CpHpG i CpHpH (asimètriques); indicant la H una A, C o T. En les plantes, la metilació participa en l'estabilitat del genoma, mitjançant la formació d'heterocromatina en les regions riques en elements transposables (TE) i seqüències repetitives. Els patrons de metilació es mantenen estable durant la divisió cel·lular. No obstant això, en les plantes s'ha observat que també es poden mantenir estables durant la meiosi i per tant, a l'hora de crear els gametòfits. El patró de metilació de l'ADN actua com un canvi en la seqüència de l'ADN, causant canvis en el fenotip de la progènie (Maeji and Nishimura, 2018).

La modificació d'histones consisteix en la metilació, l'acetilació, la fosforilació i la ubiquitinació dels residus N-terminal de la cua de les histones. El patró de modificació es troba relacionat amb l'estat de la cromatina i l'expressió gènica. La metilació en les histones es produeix en els residus de lisina i arginina. La metilació de la lisina 4 (H3K4) i 36 (H3K26) està associada a l'activació de la transcripció, en canvi la de la lisina 9 (H3K9) i 27 (H3K27) a la repressió. L'acetilació de les histones promou la transcripció gènica. La ubiquitinació de les histones H2A i H2B s'ha vist relacionada amb el control de l'activitat gènica (Maeji and Nishimura, 2018). Diversos estudis han suggerit la modificació d'histones com a mecanisme regulador de la resposta a l'estrès abiòtic en plantes (Munshi et al., 2015).

L'ARNi s'uneix per complementaritat a una seqüència específica, provocant la repressió transcripcional o la degradació de l'ARNm, silenciant l'expressió gènica. S'ha descrit que el mecanisme es troba implicat en el desenvolupament de la planta i la resistència a virus (Munshi et al., 2015).

1.4. Regulació de la defensa en coníferes

Les coníferes són organismes longeus que estan en contacte amb un entorn canviant al llarg del cicle de vida. Els grans intervals de temps entre generacions i la presència en regions amb climes diferents posen en evidència la necessitat d'una ràpida adaptació a l'entorn. Per aquests motius, les coníferes són un model interessant per l'estudi dels efectes trans-generacionals (Yakovlev et al., 2012).

Certes característiques de la reproducció en gimnospermes podrien afavorir els efectes trans-generacionals relacionats amb l'ambient matern. En les coníferes, la maduració de les llavors té lloc durant un llarg període, fins a 2 anys en *Pinus pinaster*, que permet més temps per realitzar modificacions epigenètiques. A més, les llavors de les coníferes contenen l'endosperma haploide d'origen matern, a diferència de la contribució d'ambdós parentals en angiospermes. L'endosperma transmet les reserves i les marques epigenètiques a la descendència. Per altra banda, l'elevada quantitat d'ADN no codificant, degut a la gran mida del genoma de les coníferes, pot regular l'expressió gènica (Yakovlev et al., 2012).

Un dels primers casos que va mostrar resistència de la progènie enfront l'estrès abiòtic va ser observat en els arbres a Noruega. Johnsen et al. (2005) van estudiar l'efecte de la temperatura i el fotoperíode matern en l'adaptació climàtica de la progènie de l'avet de Noruega (*Picea abies*). El resultat va mostrar un avançament o retard dels processos fenològics en funció de la temperatura i el fotoperíode durant la reproducció femenina. Els efectes de la memòria resultant van durar més de 20 anys després de la germinació (Yakovlev et al., 2012).

1.4.1. *Pinus pinaster*

Pinus pinaster, conegut com a pi marítim, és una conífera nativa de l'oest de la conca del Mediterrani que pertany a la família *Pinaceae*. Es troba principalment en regions amb climes càlids, des de la costa fins a les muntanyes. La distribució

natural se centra a la Península Ibèrica, França, Itàlia i les illes de l'oest del Mediterrani. No obstant això, també es troba a països del nord d'Europa, del sud d'Àfrica, a Estats Units i Oceania. És àmpliament utilitzada en l'estabilització i conservació de sòls i la protecció i reforestació de zones degradades. Comercialment se n'utilitza la fusta, la resina i els compostos provinents de l'escorça. Diverses plagues i patògens poden afectar als pins. L'espècie *Hylobius abietis* és la plaga més important de coníferes a Europa. El gènere *Heterobasidion* és un dels principals patògens de coníferes a nivell global. *Heterobasidion annosum* és el causant de la putrefacció de les arrels i soques de diverses espècies de coníferes provocant importants pèrdues econòmiques (Abad Viñas et al., 2016). El fong necrotròfic penetra l'escorça i provoca la necrosi del floema i l'albeca. En la resposta de defensa de les coníferes enfront la infecció del gènere *Heterobasidion*, s'ha mostrat en el punt d'inoculació una inducció dels gens implicats en el metabolisme secundari dels fenilpropanoides i de l'àcid shiquímic (Oliva et al., 2015).

Per aquesta raó, en els últims anys s'han realitzat estudis sobre les condicions ambientals que poden induir una major resistència enfront l'estrès biòtic. S'han realitzat estudis basats en la inducció de la resistència mitjançant l'aplicació de les fitohormones implicades en la senyalització del dany o tractaments mecànics simulant els danys causats per insectes herbívors. Moreira et al. (2012) van observar que l'ús de MeJA i el dany mecànic en les plàntules de *P. pinaster* induïa una resposta de defensa similar a les causades per l'atac dels patògens. Suggestint l'ús dels inductors químics i mecànics com a tractaments per simular l'atac d'insectes herbívors i induir resistència en les coníferes. En un estudi posterior, Krause (2014) va evidenciar que l'estrès causat en els pins mare pels tractaments amb MeJA i danys mecànics provocava en la progènie una major expressió dels gens implicats en el metabolisme dels fenilpropanoides i de l'àcid shiquímic, essencials per la defensa en plantes, i en els gens implicats en mecanismes epigenètics com la metilació.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

El treball es basa en la resistència trans-generacional en *Pinus pinaster*. S'estudia la inducció de la resistència enfront *Heterobasidion annosum* en la progènie dels arbres exposats a diferents ambients materns estressants.

La hipòtesi proposada consisteix en que l'exposició de *P. pinaster* a ambients materns que simulen l'estrès biòtic induïx en la progènie resistència enfront *H. annosum*.

Per tant, els objectius de l'estudi consisteixen en:

- Determinar si l'aplicació exògena de MeJA i/o els tractaments mecànics als arbres mare induïxen una resistència en la progènie enfront el patogen *Heterobasidion annosum*.
- Determinar si la resistència induïda varia en funció de l'ambient matern.
- Determinar si la resposta depèn del genotip matern.
- Determinar si la resposta s'indueix en una regió distant al focus infecciós mitjançant la diferenciació de la colonització local i distal del fong.

3. METODOLOGIA

3.1. Exposició de *Pinus pinaster* als ambients materns

El material vegetal utilitzat en l'estudi va ser originat i exposat als ambients materns en el grup GENECOLPINE dirigit pel Dr. Rafa Zas (CSIC Pontevedra, Espanya).

Mitjançant la realització d'empelts dels borrons terminals de plàntules de dos anys es va dur a terme la propagació clonal dels genotips 1002, 1043 i 2062 de *Pinus pinaster*. Després de 2 anys, els ramells de cada genotip es van plantar en testos amb el sistema de reg automatitzat. Un any després, es van sotmetre els genotips a pol·linització controlada per un quart genotip, el 1052. Posteriorment, una part dels clons no van ser exposats a cap ambient matern específic, designant-los com a grup Control (CTR). La resta dels arbres van ser sotmesos a diferents ambients materns que simulaven l'estrès provocat per factors biòtics. Els ambients materns van consistir en (I) tallar 1-2 cm de la part superior de les acícules amb unes tisores (Grup Talls Acícules, TA); (II) el dany mecànic d'alta intensitat, eliminant l'escorça i el floema de 6 ferides circulars amb un diàmetre de 5 mm a la tija (Grup Dany Mecànic Alta Intensitat, DMA); (III) el dany mecànic de baixa intensitat, repetint el procediment anterior en 3 ferides (Grup Dany Mecànic Baixa Intensitat, DMb); i (IV) la inducció química amb jasmonat de metil (MeJA), amb l'aplicació de la solució de MeJA 25 mM a l'escorça de la tija de l'arbre (Grup MeJA). Els diferents tractaments es van repetir durant un any en intervals de 15 a 30 dies. Després del període de 2 anys de maduració, les llavors es van recollir i emmagatzemar a -30 °C.

3.2. Infecció de la progènie de *Pinus pinaster*

El creixement i el procés d'infecció de la progènie de *P. pinaster* també va realitzar-se en el grup GENECOLPINE.

Les llavors provinents dels tres genotips i dels ambients materns es van fer créixer en un hivernacle durant 1 any. Les condicions establertes van ser de 14 °C a la nit (12 h) i 25 °C al dia (12 h).

Degut a la variabilitat en el nombre de llavors obtingudes dels arbres i a la realització d'un altre estudi, es va veure afectat el nombre de rèpliques en la progènie dels ambients TA i MeJA pel genotip 1002×1052 i MeJA pel genotip 2062×1052 (Taula 1).

Taula 1. Rèpliques de la progènie de *Pinus pinaster* en funció de l'ambient matern i el genotip matern.

Ambient matern (AM)	Genotip matern (GM)		
	1002×1052	1043×1052	2062×1052
CTR	9	10	5
TA	-	10	9
DMA	2	11	11
DMb	10	11	11
MeJA	-	13	-

CTR – Control, TA – Talls acícules, DMA – Dany Mecànic d'alta intensitat, DMb – Dany Mecànic de baixa intensitat, MeJA – Inducció química amb jasmonat de metil.

Després del període de creixement, es va infectar la progènie dels pins amb el patògen *Heterobasidion annosum*. Es van exposar els pèl·lets al cultiu del fong en plaques de Petri. Posteriorment, van foradar-se els pins amb un trepant i es va inocular el fong en la progènie mitjançant la introducció dels pèl·lets en els forats durant 6 mesos.

Es van retirar els pèl·lets i tallar les mostres de pins en funció del punt d'inoculació del fong. Les mostres es van designar com (I) regió inicial, el fragment provinent del punt d'inoculació del fong; i (II) regió distant, la mostra provinent del fragment adjacent a la inicial (Figura 1A). Les mostres van ser emmagatzemades a -20 °C i enviades a l'ETSEA.

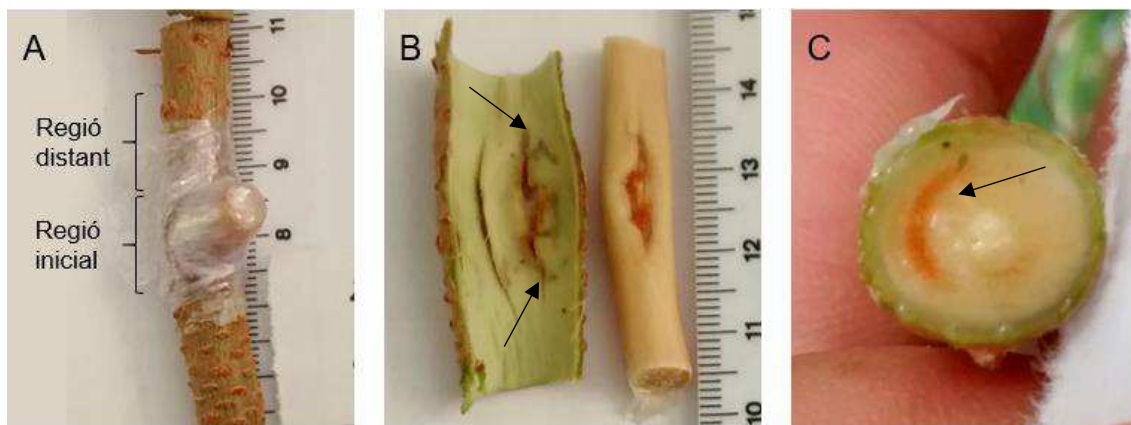


Figura 1. Infecció amb *H. annosum* de la progènie de *P. pinaster*. (A) Diferenciació de les regions obtingudes. S'indica els fragments designats com a regió inicial i distant en funció de la distància respecte el punt d'inoculació amb el pèl·let, (B) Separació de l'escorça, el floema i el càmbium respecte el xilema. Les fletxes indiquen la necrosi produïda pel patogen en el càmbium, (C) Tall transversal del tronc del pi. La fletxa indica la necrosi produïda en el xilema pel patogen.

3.3. Extracció de l'ADN

Les mostres de *P. pinaster* es van liofilitzar, permetent separar el xilema de l'escorça. Es va escollir l'escorça com a material vegetal per dur a terme l'estudi perquè es trobava unit al floema i al càmbium, que contenia la necrosi produïda pel patogen *H. annosum* (Figura 1B).

Per extreure l'ADN de les mostres de *P. pinaster* es va modificar i optimitzar el protocol d'extracció d'ADN genòmic de plantes *NucleoSpin® Plant II* de Macherey-Nagel (Annex 1).

Les mostres d'escorça van ser pesades abans de la homogeneïtzació. Degut a la robustesa del material escollit, la disrupció mecànica de les escorces es va realitzar amb sorra i nitrogen líquid en un morter.

Per dur a terme l'extracció d'ADN de les mostres d'escorça homogeneïtzades es va utilitzar el tampó de lisi PL1 amb agents desnaturalitzants, detergents i sals caotrópiques. El volum del tampó de lisi es va augmentar a 800 µl, el de l'ARNasa A a 20 µl i el temps d'incubació a 60 min per facilitar la re-suspensió de la mostra. Per separar les proteïnes es va addicionar 500 µl de fenol-cloroform-isoamil alcohol (25:24:1) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) i centrifugar a 7.500 xg durant 15 min. La fase aquosa va ser transferida a un nou tub de microcentrífuga on es va pipetejar 500 µl del tampó d'unió PC per obtenir les condicions per la unió

òptima de l'ADN a la membrana de sílice. Després de pipetejar la mostra a la *NucleoSpin® Plant II Column*, es van utilitzar els tampons de rentat PW1 i PW2 seguint les instruccions del kit comercial. Finalment, la *NucleoSpin® Plant II Column* va ser transferida a un nou tub de microcentrífuga per eluir l'ADN de la membrana. El volum del tampó d'elució PE va ser modificat a 25 µl per aconseguir una major concentració d'ADN.

3.4. Quantificació i qualitat de l'ADN

Es va quantificar la concentració d'ADN extret amb l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La concentració va ser determinada a partir de l'absorbància a 260 nm. La puresa i qualitat de les mostres va ser indicada pels ràtios A260/280 i A260/230.

3.5. PCR quantitativa

La detecció i quantificació d'*H. annosum* en les mostres de *P. pinaster* es va realitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) tenint com a diana el gen *gpd*, de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa del patogen, caracteritzat per trobar-se una sola còpia per genoma (Oliva et al., 2017). Es va utilitzar *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en el termociclador *QuantStudio3 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Es van utilitzar els encebadors i la sonda descrits per Oliva et al. (2017), amb la modificació del *reporter* Cy5 per FAM i el *quencher* BHQ®-2 per BHQ®-1. De forma que el parell d'encebadors era 5'-ATTCCCACAGATCTCCAACG-3' / 5'-GACGGTCTTCTGGGTAGC-3' i la sonda 5'-ACGACCAACTGCCTCGCCCC-3'.

Les concentracions dels encebadors i la sonda van ser 0,25 µM i 0,15 µM, respectivament. Les reaccions de 10 µl van realitzar-se en triplicat. Els paràmetres que es van establir van ser 30 s a 95 °C, 40 cicles de 5 s a 95 °C i 30 s a 60 °C.

Es va utilitzar la corba estàndard establerta a partir de la quantitat coneguda del producte de la PCR, mesurada amb *Qubit® 1.0 fluorometer dsDNA SD Assay Kit* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) i diluïda de 10^6 a 10 còpies/ μ l. A cada placa de PCR hi havia duplicats per cada dilució de la corba estàndard i un duplicat del control negatiu (*no-template control*, NTC).

Els resultats de la PCR quantitativa van ser analitzats amb el *QuantStudio™ Design & Analysis Software* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La quantitat de còpies del gen *gpd* a les mostres es va obtenir a partir de la interpolació amb la corba estàndard.

3.6. Anàlisi estadística

Els factors establerts durant l'estudi van ser l'ambient matern (AM) amb cinc nivells (Control, Talls acícules, Dany mecànic alta intensitat, Dany mecànic baixa intensitat i MeJA), el genotip matern (GM) amb tres nivells (1002×1052, 1043×1052 i 2062×1052) i la regió de la infecció (R) amb dos nivells (Inicial i Distant).

Com s'ha descrit prèviament, el tractament amb MeJA només es va realitzar en el genotip 1043×1052 i el tractament de talls en les acícules en els genotips 1043×1052 i 2062×1052. Per aquest motiu, es van realitzar diferents comparacions. Per tal de determinar si els diferents ambients materns indueixen una major resistència en la progènie, es va comparar la quantificació del patogen en la regió distant del punt d'inoculació (I) en la progènie dels arbres de l'ambient TA respecte els CTR en els genotips 1043×1052 i 2062×1052; (II) en la progènie dels arbres de l'ambient DM respecte els CTR en els genotips 1002×1052, 1043×1052 i 2062×1052; i (III) en la progènie dels arbres MeJA respecte els CTR en el genotip 1043×1052. En un altre anàlisi, es va comparar la quantificació del patogen en la regió inicial i distant per tal de diferenciar una colonització local i distal.

Els valors de les quantitats de còpies del gen *gpd* es van estandarditzar amb el pes de les mostres i transformar amb l'arrel quadrada per assumir una distribució normal.

La comparació de la progènie dels arbres TA respecte els CTR en els genotips 1043×1052 i 2062×1052 es va realitzar amb el model lineal, considerant l'AM i GM com a factors fixes.

La comparació de la progènie provinent de l'ambient DM respecte els CTR en els tres genotips es va realitzar amb el model lineal mixt. L'AM es va considerar com a factor fix i el GM com a factor aleatori. Per tal de determinar quin tractament presentava diferències significatives respecte el nivell CTR, es va realitzar l'anàlisi *post hoc* HSD de Tukey establint $p < 0,05$.

En la comparació del grup MeJA respecte el CTR en el genotip 1043×1052, es va realitzar un model lineal, considerant l'AM com a factor fix.

En les comparacions dels diferents AM es va considerar com a covariable el diàmetre (D) dels pins i la quantificació d'*H. annosum* en la regió inicial.

A partir dels resultats obtinguts en funció dels diferents ambients materns, es va analitzar la interacció del diàmetre amb l'ambient matern mitjançant un model lineal generalitzat seguint la distribució de Poisson i funció d'enllaç logarítmic. Es van considerar com a factors fixes el GM, l'AM, el D i la interacció AM x D.

Per comparar la quantificació del patògen en la regió inicial i en una regió distant es va realitzar un model lineal mixt. Els factors fixes van ser la R, l'AM i la interacció d'ambdós. El D es va considerar com a covariable. El factor bloc (B), que relaciona cada mostra de la regió distant amb la corresponent de la inicial, es va considerar com a factor aleatori.

L'anàlisi estadística es va dur a terme amb el software JMP® (Sas Institute, Cary, NC). Els valors es mostren com la mitjana de mínims quadrats $\pm$ error estàndard de la mitjana (SEM). En totes les anàlisis es va establir el nivell de significança estadístic $p < 0,05$.

4. RESULTATS

4.1. Efecte de l'ambient matern en la progènie de *Pinus pinaster*

4.1.1. Tractament d'inducció mitjançant talls en les acícules

L'abundància del patògen en la progènie dels arbres exposats a l'ambient matern de talls en les acícules amb tisores no va mostrar diferències significatives amb els arbres provinents de l'ambient matern control. Conseqüentment, l'ambient matern TA no ha induït una major resistència en la progènie enfront l'atac del patògen. Es va observar que l'abundància d'*H. annosum* no depenia del genotip matern. En canvi, es va veure que el diàmetre de l'arbre sí que era significatiu, mostrant una correlació negativa en la quantificació del gen *gpd* (Figura 2).

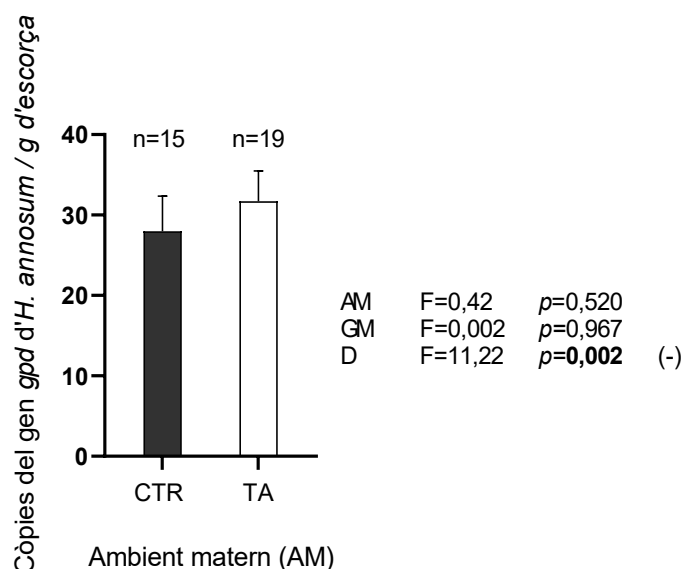


Figura 2. Abundància quantificada per qPCR d'*Heterobasidion annosum* en la regió distant en la progènie de *Pinus pinaster* en els genotips 1043×1052 i 2062×1052 pels diferents ambients materns (AM). Els valors es mostren com la mitjana de mínims quadrats $\pm$ SEM. Es mostra la significança estadística de l'ambient matern (AM), el genotip matern (GM) i del diàmetre de l'arbre (D). Els valors significatius es mostren en negreta. Entre parèntesi es mostra la correlació del diàmetre amb les còpies del gen *gpd*. Ambients materns: CTR – control, TA – tallar les acícules amb tisores.

4.1.2. Tractament d'inducció mitjançant el dany mecànic

L'abundància d'*H. annosum* en la progènie originada dels arbres exposats a l'ambient matern de dany mecànic d'alta intensitat va ser significativament major

a la de l'ambient matern control. En canvi, la progènie originada de l'ambient de dany mecànic de baixa intensitat no presentava diferències significatives amb la de l'ambient control. El diàmetre dels arbres presentava una correlació negativa en la quantificació del gen *gpd* (Figura 3).

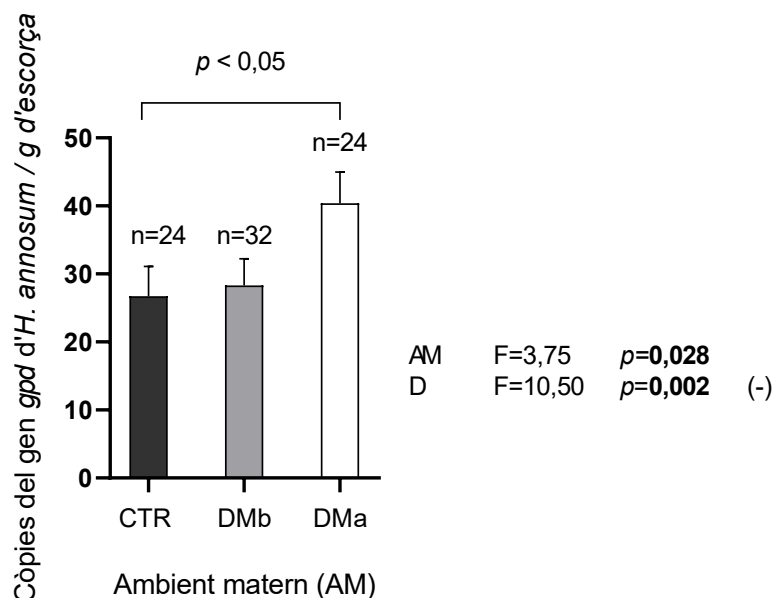


Figura 3. Abundància quantificada per qPCR d'*Heterobasidion annosum* en la regió distant en la progènie de *Pinus pinaster* en els genotips 1002×1052, 1043×1052 i 2062×1052 pels diferents ambients materns (AM). Els valors es mostren com la mitjana de mínims quadrats ± SEM. Es mostra la significança estadística de l'ambient matern (AM) i del diàmetre de l'arbre (D). Els valors significatius es mostren en negreta. Entre parèntesi es mostra la correlació del diàmetre amb les còpies del gen *gpd*. Ambients materns: CTR – control, DMb – dany mecànic de baixa intensitat, DMa – dany mecànic d'alta intensitat.

4.1.3. Tractament d'inducció amb MeJA

En la comparació de l'abundància del patògen entre la progènie provinent de l'ambient matern exposat a l'inductor químic jasmonat de metil i la provinent de l'ambient control no es van observar diferències significatives. En canvi, sí que es va mostrar una correlació negativa del diàmetre dels pins amb la presència del patògen (Figura 4).

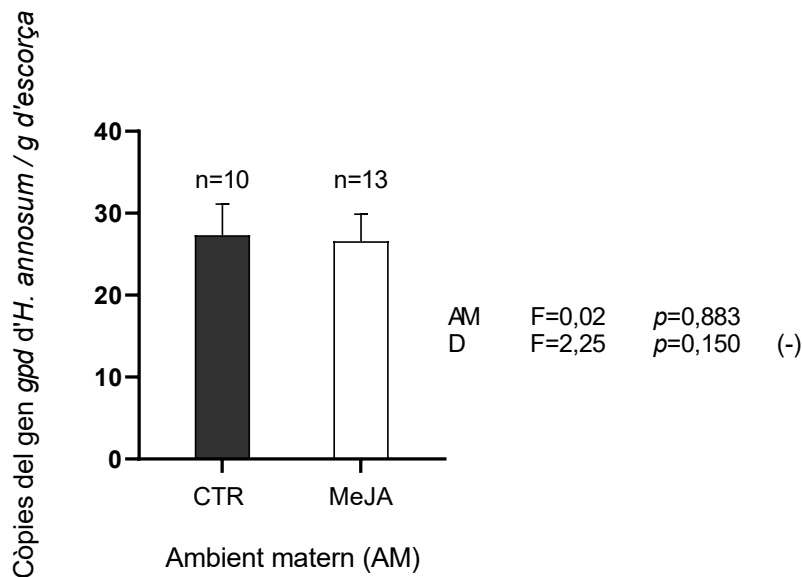


Figura 4. Abundància quantificada per qPCR d'*Heterobasidion annosum* en la regió distant en la progènie de *Pinus pinaster* en el genotip 1043×1052 pels diferents ambients materns (AM). Els valors es mostren com la mitjana de mínims quadrats $\pm$ SEM. Es mostra la significança estadística de l'ambient matern (AM) i del diàmetre de l'arbre (D). Entre parèntesi es mostra la correlació del diàmetre amb les còpies del gen *gpd*. Ambients materns: CTR – control, MeJA – aplicació de jasmonat de metil.

4.2. Efecte del diàmetre en la resistència de la progènie enfront *H. annosum*

A partir de les diferents anàlisis realitzades per diferenciar la resposta induïda pels ambients materns, es va observar una correlació negativa entre el diàmetre dels pins i l'abundància d'*H. annosum*. Per tal de determinar la possible influència del diàmetre es va analitzar la interacció de l'ambient matern amb el diàmetre (Taula 2).

Taula 2. Resultats del model lineal generalitzat dels efectes del genotip matern, l'ambient matern, el diàmetre i la interacció de l'ambient matern i el diàmetre en la progènie de *P. pinaster*.

	AM		
	TA	DM	MeJA
	Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i>
GM	0,124	0,089	-
AM	0,806	0,001	0,404
D	<0,0001	<0,0001	0,018
AM x D	0,837	0,274	0,022

Els resultats significatius es mostren marcats en negreta. Els genotips estudiats en la progènie de TA són 1043×1052 i 2062×1052. Els genotips estudiats en la progènie de DM són 1002×1052, 1043×1052 i 2062×1052. No s'indica valor *p* pel GM en l'ambient matern MeJA perquè només s'analitza en el genotip 1043×1052. Ambients materns: CTR – control, TA – tallar les acícules amb tisores, DM – dany mecànic, MeJA – aplicació de jasmonat de metil. GM – genotip matern, AM – ambient matern, D – diàmetre de l'arbre, AM x D – interacció entre l'ambient matern i el diàmetre.

Els resultats van mostrar una interacció significativa entre l'ambient matern i el diàmetre en la progènie originada en l'ambient amb MeJA. De forma que l'abundància del patogen venia condicionada per l'exposició dels arbres materns a l'ambient control o amb l'inductor químic i el diàmetre dels arbres de la progènie.

Tal com s'observa en la Figura 5, l'abundància del patogen en la progènie de l'ambient matern control era dependent del diàmetre del pi, mostrant una major resistència enfront *H. annosum* en els pins amb un major diàmetre. En canvi, la resposta de la progènie de l'ambient matern amb MeJA era independent del diàmetre.

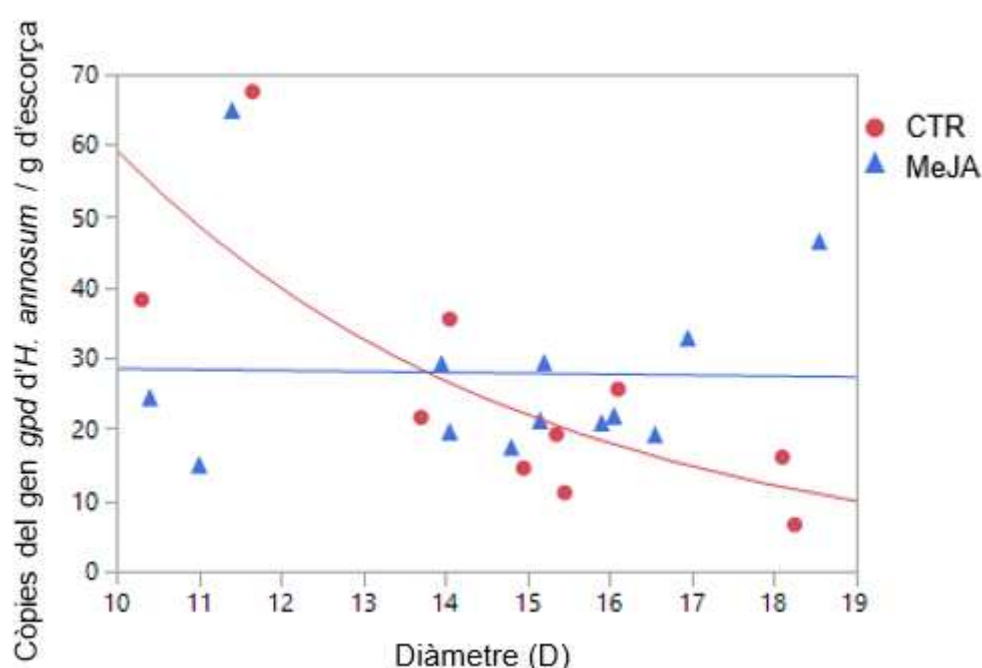


Figura 5. Abundància quantificada per qPCR d'*Heterobasidion annosum* en la regió distant en la progènie de *Pinus pinaster* en el genotip 1043×1052 pels diferents ambients materns (AM) en funció del diàmetre dels pins. En vermell s'indica la regressió del CTR i en blau la del MeJA. Ambients materns: CTR – control, MeJA – aplicació de jasmonat de metil.

4.3. Inducció de la resistència en regions distants al focus infecció

Amb l'objectiu de determinar si la resposta que s'indueix en la progènie s'activa en una regió distant al focus infecció, es va voler diferenciar una colonització local i distal per part del fong a partir de la comparació de la quantificació del gen *gpd* d'*H. annosum*. Les regions on es va quantificar el patogen van ser el punt inicial on es va produir la inoculació i el punt distant al focus infecció.

L'anàlisi estadística no va mostrar diferències significatives de l'abundància del patogen en funció de la regió. No es van observar diferències significatives entre els diferents ambients materns als quals van estar exposats els pins. A més, l'abundància d'*H. annosum* no va dependre de la interacció entre la regió infectada i l'ambient matern. No obstant això, es va produir una correlació negativa entre el número de les còpies del gen *gpd* i el diàmetre de *P. pinaster* (Figura 6).

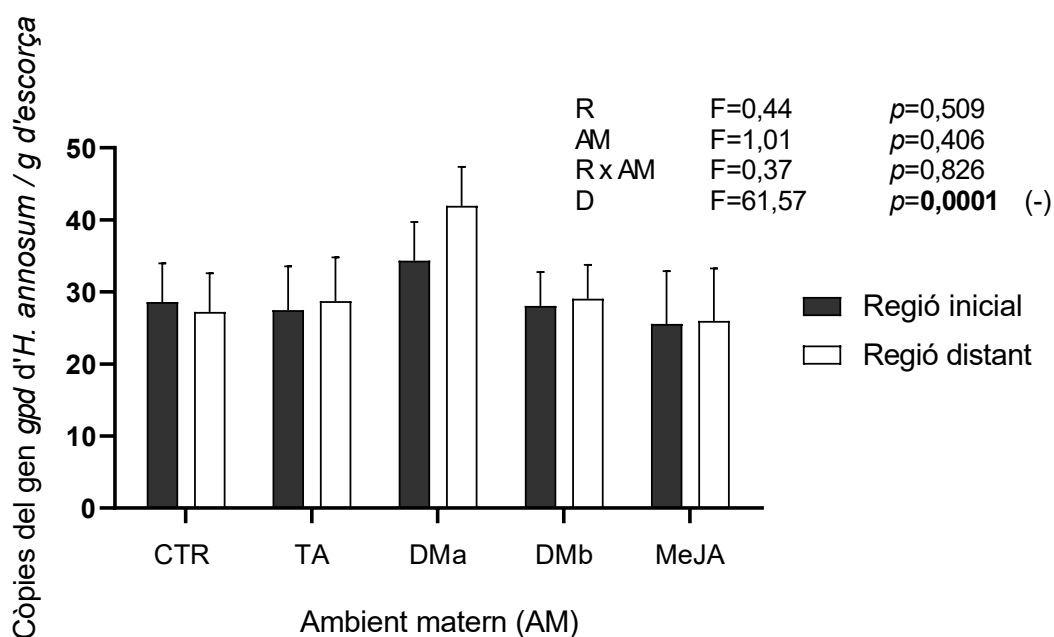


Figura 6. Abundància quantificada per qPCR d'*Heterobasidion annosum* en la progènie de *Pinus pinaster* en els genotips 1002×1052, 1043×1052 i 2062×1052 en funció de la regió de la infecció (R) i l'ambient matern (AM). Els valors es mostren com la mitjana de mínims quadrats $\pm$ SEM. Es mostra la significança estadística de la regió de la infecció (R), l'ambient matern (AM), la interacció d'ambdós (R x AM) i del diàmetre de l'arbre (D). Els valors significatius es mostren en negreta. Entre parèntesi es mostra la correlació del diàmetre amb la quantificació del gen. Ambients materns: CTR – control, TA – tallar les acícules amb tisores, DMa – dany mecànic d'alta intensitat, DMb – dany mecànic de baixa intensitat, MeJA – aplicació de jasmonat de metil.

5. DISCUSSIÓ

Al llarg de l'estudi s'ha analitzat l'abundància d'*H. annosum* en les progènies de *P. pinaster* originades a partir de diferents genotips i ambients materns.

Els resultats van mostrar una correlació negativa entre l'abundància del patogen i el diàmetre dels arbres de la progènie en els diferents ambients materns. De manera que hi ha una major abundància del patogen en els arbres que presenten un menor diàmetre. Conseqüentment, els arbres amb menor diàmetre, és a dir els més petits, tenen una major dificultat per defensar-se o tolerar el patogen. No obstant això, aquest menor diàmetre també podria ser conseqüència d'un menor creixement degut a l'abundància del patogen present. De manera que propers treballs haurien d'estudiar si el diàmetre, i per tant, el creixement del pi ve condicionat per la infecció.

En canvi, en la progènie provinent de l'ambient matern tractat amb l'inductor químic MeJA s'observava un patró diferent. La correlació entre l'abundància del patogen i el diàmetre era negativa i a més, es produïa una interacció significativa entre l'ambient matern i el diàmetre. La resposta produïda en la progènie MeJA enfront el patogen és independent del diàmetre i afavoreix als arbres més petits respecte els CTR. Aquest resultat indicaria una major resposta o tolerància de la progènie MeJA enfront el patogen. Pot ser que sigui conseqüència de la resposta induïda per l'ambient matern amb MeJA. Aquest resultat estaria relacionat amb les observacions de Krause (2014), que va mostrar una major expressió dels gens implicats en el metabolisme dels fenilpropanoides i de l'àcid shiquímic, essencials en la defensa de les plantes, i en la metilació en la progènie de l'ambient matern amb MeJA. A més, l'ús de MeJA com a inductor també coincidiria amb els resultats de Zas et al. (2014) i Berglund et al. (2016), que van mostrar que l'aplicació exògena de MeJA en les plàntules de *P. pinaster* disminuïa el nombre d'atacs a les plantes.

Altres estratègies, com la realització de danys mecànics en el floema per induir respostes químiques de defensa en coníferes, també han estat descrites (Moreira et al., 2012). Krause (2014) també va observar una major expressió dels gens implicats en defensa i metilació en la progènie provinent de l'ambient

matern DMA. En canvi, els resultats obtinguts han mostrat una major susceptibilitat de la progènie de l'ambient matern DMA enfront el patogen *H. annosum* (Figura 3). Conseqüentment, els ambients materns MeJA i DMA no indueixen una resposta similar en la progènie, a diferència del descrit per Krause (2014). De manera que pot ser els ambients materns MeJA i DMA són diferents i no equivalents.

Els resultats obtinguts en la progènie de l'ambient matern TA han estat similars als de la progènie DMA i DMb. Aquesta observació podria mostrar una diferència en la progènie TA, DMA i DMb respecte la MeJA. Aquesta resposta diferent podria estar relacionada amb que els tractaments dels ambients materns TA, DMA i DMb són mecànics i el de l'ambient matern MeJA és hormonal.

Les respostes produïdes per la progènie dels pins exposats als diferents ambients materns no han estat dependents del genotip matern. Aquest resultat es diferencia de l'obtingut per Krause (2014), que mostrava una diferència de l'efecte dels ambients materns en funció del genotip matern.

En la progènie de tots els ambients materns s'ha observat una abundància similar d'*H. annosum* independentment de la regió analitzada (Figura 6). Mitjançant la diferenciació d'una colonització local i distal, els resultats han mostrat que la resposta produïda en la regió distant del focus infecciós és semblant a la del punt d'inoculació del patogen. Aquests resultats podrien estar explicats pel fet que les dues regions analitzades eren adjacents. Quedaria pendent escollir com a regió distant un punt més allunyat de la regió d'inoculació, per tal d'observar si hi ha propagació de la necrosi i variació en l'abundància del patogen.

6. CONCLUSIÓ

L'exposició dels arbres mare a diferents ambients materns amb tractaments mecànics i d'inducció química no ha induït una major resistència en la progènie de *P. pinaster* enfront la infecció d'*H. annosum*. En canvi, sí que s'ha observat major susceptibilitat enfront l'atac del patogen en la progènie provinent de l'ambient matern DMA.

S'ha mostrat una dependència entre l'abundància del patogen i el diàmetre en la progènie dels ambients materns TA, DMA i DMb. L'abundància d'*H. annosum* era major en els arbres petits, indicant una menor capacitat de defensa o de tolerància enfront el patogen. En canvi, en la progènie provinent de l'ambient matern MeJA s'ha observat que la resposta enfront el patogen és independent del diàmetre del pi. Aquest resultat podria ser conseqüència de la resistència induïda per l'exposició a l'ambient matern amb l'inductor químic. Per altra banda, la resposta de la progènie enfront el patogen no ha variat en funció del genotip matern ni de la regió analitzada.

Els resultats presentats en aquest treball semblen indicar que l'aplicació exògena de MeJA a arbres adults podria ajudar a la seva progènie a minimitzar els danys de patògens com *H. annosum*. Tanmateix, degut a l'absència de rèpliques per certs ambients i genotips materns i la diferència dels tractaments aplicats als ambients, es requereix més recerca per tal d'entendre els mecanismes causants dels efectes trans-generacionals.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abad Viñas R, Caudullo G, Oliveira S, de Rigo D. *Pinus pinaster* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, editors. *Eur. Atlas For. Tree Species*, Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2016, p. 128–9. doi:10.2788/038466.
- Berglund T, Lindström A, Aghelpasand H, Stattin E, Ohlsson AB. Protection of spruce seedlings against pine weevil attacks by treatment of seeds or seedlings with nicotinamide, nicotinic acid and jasmonic acid. *Forestry* 2016;89:127–35. doi:10.1093/forestry/cpv040.
- Boyko A, Kovalchuk I. Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? *Curr Opin Plant Biol* 2011;14:260–6. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.003.
- FECYT. ANÁLISIS ICONO: Principales instituciones de investigación excelentes por áreas de conocimiento. 2005-2014. Madrid: 2016. Disponible a: <https://www.fecyt.es/es/publicacion/analisis-icno-principales-instituciones-de-investigacion-excelentes-por-areas-de>
- Holeski LM, Jander G, Agrawal AA. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends Ecol Evol* 2012;27:618–26. doi:10.1016/j.tree.2012.07.011.
- Johnsen O, Daehlen OG, Ostreng G, Skroppa T. Daylength and temperature during seed production interactively affect adaptive performance of *Picea abies* progenies. *New Phytol* 2005;168:589–96. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01538.x.
- Krause K. Maternal environment modulates the defence response in *P. pinaster* progenies [master's thesis]. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2014. Disponible a: <https://stud.epsilon.slu.se/7363/>
- Maeji H, Nishimura T. Chapter Two - Epigenetic Mechanisms in Plants. In: Mirouze M, Bucher E, Gallusci P, editors. *Adv. Bot. Res. Plant Epigenetics*

- Coming Age Breed. Appl. Vol. 88, London: Academic Press; 2018, p. 21–47. doi:10.1016/bs.abr.2018.09.014.
- Moreira X, Zas R, Sampedro L. Quantitative comparison of chemical, biological and mechanical induction of secondary compounds in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees - Struct Funct* 2012;26:677–83. doi:10.1007/s00468-011-0602-6.
- Munshi A, Ahuja YR, Bahadur B. Epigenetic Mechanisms in Plants: An Overview. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K, editors. *Plant Biol. Biotechnol.* Vol. 2, New Delhi: Springer; 2015, p. 265–78. doi:10.1007/978-81-322-2283-5_12.
- Oliva J, Messal M, Wendt L, Elfstrand M. Quantitative interactions between the biocontrol fungus *Phlebiopsis gigantea*, the forest pathogen *Heterobasidion annosum* and the fungal community inhabiting Norway spruce stumps. *For Ecol Manage* 2017;402:253–64. doi:10.1016/j.foreco.2017.07.046.
- Oliva J, Rommel S, Fossdal CG, Hietala AM, Nemesio-Gorrioz M, Solheim H, et al. Transcriptional responses of Norway spruce (*Picea abies*) inner sapwood against *Heterobasidion parviporum*. *Tree Physiol* 2015;35:1007–15. doi:10.1093/treephys/tpv063.
- Peterson RKD, Varella AC, Higley LG. Tolerance: the forgotten child of plant resistance. *PeerJ* 2017;5:e3934. doi:10.7717/peerj.3934.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM. Induced Disease Resistance. In: Lugtenberg B, editor. *Princ. Plant-Microbe Interact. Microbes Sustain. Agric.*, London: Springer; 2015, p. 123–33. doi:10.1007/978-3-319-08575-3.
- Roberts DA. Acquired resistance to Tobacco mosaic virus transmitted to the progeny of hypersensitive Tobacco. *Virology* 1983;124:161–3. doi:10.1016/0042-6822(83)90299-4.
- Yakovlev I, Fossdal CG, Skråppa T, Olsen JE, Jahren AH, Johnsen Ø. An adaptive epigenetic memory in conifers with important implications for seed production. *Seed Sci Res* 2012;22:63–76. doi:10.1017/S0960258511000535.

Zas R, Björklund N, Nordlander G, Cendán C, Hellqvist C, Sampedro L. Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest, *Hylobius abietis*. *For Ecol Manage* 2014;313:212–23. doi:10.1016/j.foreco.2013.11.014.

8. AUTOAVALUACIÓ

L'estada al grup de Microbiòmica Forestal i Patologia Vegetal de la UdL m'ha permès basar el treball de fi de grau en l'estudi realitzat durant el període de pràctiques. Personalment, considero que ha estat una bona oportunitat per introduir-me i conèixer de més a prop l'àmbit de la recerca.

L'aplicació pràctica de tècniques i conceptes explicats de forma teòrica en les diferents matèries, com és el cas de la PCR quantitativa, m'ha servit per aprofundir i entendre millor el seu funcionament. L'anàlisi dels resultats obtinguts mitjançant un nou programa estadístic ha estat una part important tant en les pràctiques com en el treball. De manera que m'ha servit per ser plenament conscient de la importància de la correcta anàlisi i interpretació dels resultats.

Al llarg de les pràctiques he adquirit una major responsabilitat i autonomia en el laboratori gràcies a la confiança mostrada des del principi pel Jonàs Oliva. A més, el fet de participar en totes les etapes de l'estudi realitzades a la UdL, m'ha permès millorar en la planificació i organització del treball, així com implicar-me totalment en el grup.

Finalment, m'agradaria destacar que la realització de pràctiques externes i el desenvolupament del treball de fi de grau ha estat una oportunitat que m'ha permès aprendre nous coneixements, així com aplicar i consolidar l'aprenentatge adquirit al llarg dels estudis.

ANNEX 1: Protocol d'extracció d'ADN genòmic de plantes

Genomic DNA from plant

Protocol at a glance (Rev. 10)

NucleoSpin® Plant II	Mini	Midi	Maxi
1 Homogenize samples	 100 mg	 400 mg	 1500 mg
	 400 µL PL1 10 µL RNase A 65 °C, 10 min	 1.7 mL PL1 25 µL RNase A 65 °C, 15 min	 6 mL PL1 100 µL RNase A 65 °C, 20 min
2 Cell lysis	ALTERNATIVELY  300 µL PL2 10 µL RNase A 65 °C, 10 min 75 µL PL3 on ice, 5 min	ALTERNATIVELY  1.5 mL PL2 25 µL RNase A 65 °C, 15 min 200 µL PL3 on ice, 5 min	ALTERNATIVELY  5.3 mL PL2 100 µL RNase A 65 °C, 20 min 700 µL PL3 on ice, 5 min
3 Filtration / Clarification of lysate	  ≥ 11,000 x g, 2 min	  4,500 x g, 10 min	  4,500 x g, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions	450 µL PC	2.3 mL PC	10 mL PC
5 Bind DNA	  ≥ 11,000 x g, 1 min	  4,500 x g, 2 min	  4,500 x g, 2 min
6 Wash and dry silica membrane	 1st 400 µL PW1  ≥ 11,000 x g, 1 min 2nd 700 µL PW2  ≥ 11,000 x g, 1 min 3rd 200 µL PW2  ≥ 11,000 x g, 2 min	 1st 1 mL PW1  4,500 x g, 2 min 2nd 3 mL PW2  4,500 x g, 2 min 3rd 1 mL PW2  4,500 x g, 10 min	 1st 4 mL PW1  4,500 x g, 2 min 2nd 10 mL PW2  4,500 x g, 2 min 3rd 2 mL PW2  4,500 x g, 10 min
7 Elute DNA	 50 µL PE 65 °C, 5 min ≥ 11,000 x g, 1 min Repeat elution step	 200 µL PE 65 °C, 5 min 4,500 x g, 2 min Repeat elution step	 1000 µL PE 65 °C, 5 min 4,500 x g, 2 min Repeat elution step