

**ALTERACIÓ EN L'EXPRESSIÓ DE GENS DE LA RUTA DELS
TERPENOIDES DE NECTARINA DAVANT L'ATAC DEL
PATOGEN *Monilinia laxa***

Júlia Borràs Bisa

TREBALL FINAL DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Ricardo Román Cordero Otero

En cooperació amb: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Supervisora: Rosario Torres Sanchis, investigadora, Programa de Postcollita
rosario.torres@irta.cat

Co-supervisora: Marta Balsells Llauredó, estudiant de doctorat, Programa de
Postcollita, marta.balsells@irta.cat

Juny 2021

AGRAÏMENTS

Gràcies a totes les persones que en algun moment m'heu donat la vostra mà. En primer lloc, Rosario Torres Sanchis, supervisora d'aquest treball, i Marta Balsells Llauredó, co-supervisora, per tot el que m'heu ensenyat durant la meva estada de pràctiques a l'IRTA i el seguiment a distància un cop finalitzada aquesta. Estic molt contenta d'haver tingut l'oportunitat de continuar formant-me professionalment i personalment en aquest institut de recerca. Gràcies a tot el personal per posar-ho tot tan fàcil i aportar-me tants coneixements. En segon lloc, Ricardo Cordero Otero, tutor acadèmic de la Universitat Rovira i Virgili, per tots els consells, suggeriments i aportacions fetes durant la redacció del treball. Finalment, família i totes les persones que heu estat al meu costat cada dia i, en especial, els dies més foscos, gràcies per estar amb mi.

GUIA DE PREVENCIÓ DEL PLAGI

Jo, Júlia Borràs Bisa, amb DNI 49537487H, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2021



ÍNDEX

Dades del centre	5
Resum	6
1. Introducció.....	7
1.1. Fruita de pinyol.....	7
1.2. Podridura marró	7
1.2.1. Factors que afavoreixen la infecció.....	8
1.2.2. Cicle de la malaltia	8
1.3. Interacció hoste-patogen.....	10
1.3.1. Mecanismes d'infecció del fong	10
1.3.2. Mecanismes de defensa de la fruita.....	12
1.4. Hipòtesi.....	15
2. Objectiu	15
3. Materials i mètodes.....	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Patogen i preparació de l'inòcul.....	16
3.3. Inoculació de la fruita i incubació	17
3.4. Anàlisi de l'expressió gènica.....	17
3.4.1. Mostreig i processament de les mostres.....	17
3.4.2. Extracció d'ARN.....	17
3.4.3. Avaluació de la concentració, qualitat i integritat de l'ARN.....	18
3.4.4. Eliminació d'ADN genòmic	19
3.4.5. Síntesi d'ADN complementari	20
3.4.6. Quantificació relativa per qPCR	21
3.5. Tractament de les dades i anàlisi estadístic.....	23
4. Resultats	24
4.1. Paràmetres de qualitat dels fruits	24
4.2. Obtenció de material vegetal sa i infectat.....	24
4.3. Obtenció d'ARN cru, d'ARN net i de les mostres d'ADNc.....	25
4.4. Expressió gènica mitjançant qPCR.....	27
4.4.1. Eficiència dels encebadors.....	27
4.4.2. Expressió dels gens d'interès.....	28
5. Discussió.....	31
6. Conclusions	36
7. Autoavaluació	37
8. Referències bibliogràfiques	38

DADES DEL CENTRE

L'IRTA és l'Institut Públic d'Investigació i Tecnologia Agroalimentària de la Generalitat de Catalunya fundat el 1985. S'hi distingeixen les àrees de Producció animal, Producció vegetal, Indústries alimentàries, Economia alimentària i Medi ambient i canvi global. Dins de l'àmbit de Producció vegetal s'hi troben cinc programes diferents: Cultius extensius, Fructicultura, Producció vegetal sostenible, Postcollita i Genòmica i Biotecnologia. El programa de Postcollita està centrat a l'edifici Fruitcentre, localitzat al Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, una de les principals àrees de producció de fruita de pinyol d'Europa. Té com a objectiu tractar els problemes que apareixen en la postcollita, des de la recol·lecció fins al consum, per obtenir productes de millor qualitat i amb una vida útil més llarga. Aquest programa engloba la fisiologia i la tecnologia, la patologia i el processat de fruites i hortalisses, així com un servei tècnic d'assessoria que ofereix assistència a les cooperatives per millorar la qualitat de la fruita i el seu emmagatzematge.

Les pràctiques externes les vaig realitzar al Programa de Postcollita, concretament al grup de Patologia de la Postcollita. Una de les línies de recerca d'aquest grup se centra en estudiar a nivell patològic, bioquímic, transcriptòmic i proteòmic la interacció hoste-patogen en fruites de pinyol, pomes i cítrics. A més, s'avaluen i defineixen noves estratègies i alternatives a l'aplicació de fungicides pel control de patologies postcollita com els agents de biocontrol, basats en l'ús de microorganismes antagonistes als patògens, tractaments físics i químics de baix risc, i avaluació de noves varietats resistents, entre altres. Així mateix, desenvolupen tècniques moleculars per identificar i controlar els microorganismes. Aquest grup de recerca té una àmplia experiència en dirigir i participar en projectes a nivell nacional i internacional, així com en contractes amb empreses del sector agroalimentari. El grup ha publicat nombrosos articles científics, tant indexats com de divulgació, capítols de llibres, i ha participat en presentacions orals i pòsters en varis congressos nacionals i internacionals, així com ha organitzat congressos internacionals.

RESUM

La podridura marró causada per espècies de fongs del gènere *Monilinia* és la principal malaltia de postcollita que poden patir les fruites de pinyol, com els préssecs i les nectarines. En base a les dades obtingudes en un estudi transcriptòmic realitzat en el patosistema nectarina-*Monilinia laxa*, es va veure que el metabolisme dels terpenoides podria estar implicat en la defensa de la fruita davant l'atac fúngic. Aquest treball s'ha centrat en estudiar el paper dels esteroides, un grup de terpenoides, en la interacció nectarina-*M. laxa*. En concret, s'ha analitzat l'expressió de dos gens relacionats amb la biosíntesi dels esteroides, l'esqualè sintasa (*PpSQS*) i l'esqualè monooxigenasa (*PpSM*), en nectarines de les varietats 'Venus' i 'Albared' i en dos estats de maduresa diferents en resposta a *M. laxa*. Per fer-ho, es va realitzar una extracció d'ARN de teixit sa i teixit inoculat a diferents temps, es va obtenir l'ADNc i es va analitzar l'expressió gènica mitjançant una qPCR. Com a resultat, es van obtenir uns patrons d'expressió de *PpSQS* i *PpSM* diferents entre nectarines immadures 'Venus' i 'Albared', les quals havien presentat diferent susceptibilitat a *M. laxa*, però similars entre nectarines madures de les dues varietats. En pràcticament totes les condicions, l'expressió dels gens d'interès estava inhibida en la fruita inoculada respecte la fruita control. Això suggereix que la infecció de *M. laxa* inhibeix l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* i altera la via de biosíntesi dels esteroides. Tot i que es necessiten més estudis, aquesta recerca contribuirà en la caracterització del paper dels terpenoides en la interacció nectarina-*Monilinia* spp.

Paraules clau: podridura marró, *Monilinia laxa*, *Prunus persica*, terpenoides, esteroides

1. INTRODUCCIÓ

1.1. FRUITA DE PINYOL

La fruita de pinyol és un grup divers que inclou espècies del gènere *Prunus*, el qual pertany a la família *Rosaceae* i subfamília *Amygdaloideae* o *Prunoideae*. Comprèn fruites com els préssecs, les nectarines, les prunes, les cireres i els albercocs, entre altres (Oliveira-Lino *et al.* 2016). En comparació amb altres cultius de fruiters, la producció de préssecs és de les més altes. Al llarg dels anys, la producció de préssec (*Prunus persica* (L.) Batch) i nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* (Borkh.) Schneider) ha anat en augment i el 2019 es va obtenir un total de 25,7 MT a nivell mundial. El major país productor de préssec i nectarina és la Xina (16 MT), seguit d'Espanya (1,5 MT) i Itàlia (1,2 MT) (FAOSTAT 2019).

Aquests cultius poden patir malalties causades per diferents patògens i poden afectar a qualsevol part de l'arbre. La malaltia econòmicament més important que es dona en la fruita de pinyol és la podridura marró (Usall *et al.* 2015).

1.2. PODRIDURA MARRÓ

Els agents que causen la podridura marró són fongs que pertanyen a la família *Sclerotiniaceae* i al gènere *Monilinia*. Els seus hostes principals són membres de les famílies *Rosaceae* i *Ericaceae* (Holst-Jensen *et al.* 1997). El gènere *Monilinia* Honey consisteix en 35 espècies però aquelles que estan implicades en la podridura marró en fruita de pinyol i de llavor principalment són *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *M. laxa* (Aderhold i Ruhland) Honey i *M. fructigena* (Aderhold i Ruhland) Honey (Whetzel 1945).

El desenvolupament de la podridura marró implica elevades pèrdues de producció i, conseqüentment, econòmiques. *Monilinia laxa* i *Monilinia fructicola* són els principals agents que causen aquesta malaltia (Rungjindamai *et al.* 2014). Les pèrdues en pre- i postcollita poden arribar a ser del 80 % quan les condicions climàtiques són favorables pel desenvolupament de la malaltia, com altes temperatures i humitat (Usall *et al.* 2015). Per controlar-ho, s'empren estratègies com pràctiques culturals (embossat dels fruits, eliminació dels fruits madurs infectats...), fungicides químics, agents de control biològic i tractaments físics de postcollita (Martini i Mari 2014). Actualment, els fungicides químics són l'estratègia de control més usada. No obstant, el desenvolupament de resistències a aquests productes i la preocupació general sobre el risc que suposen per la salut i el medi ambient ha augmentat l'interès en el desenvolupament d'alternatives per controlar aquesta malaltia (Tian *et al.* 2016). Per tant, estudis sobre la interacció hoste-patogen poden proveir noves estratègies per controlar la podridura marró en fruita de pinyol.

1.2.1. Factors que afavoreixen la infecció

Varis factors com les condicions ambientals i l'estat de maduresa del fruit determinen el desenvolupament de la podridura marró en la fruita de pinyol. D'entre les condicions ambientals, els principals factors limitadors són la temperatura i el període d'humectació (Rungjindamai *et al.* 2014). La temperatura òptima per la germinació dels conidis de *Monilinia* spp. és 15-30 °C, tot i que també es pot donar en condicions menys òptimes (0-35 °C). Pel que fa a la humitat, s'ha descrit que els conidis només poden germinar en condicions properes a la saturació (≥ 97 % d'humitat relativa) (Casals *et al.* 2010).

Quant a l'estat de maduresa, els fruits poden infectar-se en qualsevol etapa de creixement però la susceptibilitat a *Monilinia* spp. augmenta amb el procés de maduresa de la fruita. Guidarelli *et al.* (2014) descriuen quatre etapes amb diferent susceptibilitat del préssec a *M. laxa*. Durant la primera etapa, de divisió cel·lular i creixement de les cèl·lules, els fruits són susceptibles a la infecció; a la segona etapa, en la qual es produeix l'enduriment de l'os i l'endarreriment del creixement del fruit, disminueix la susceptibilitat; durant la tercera etapa o fase preclimatèrica, moment en què torna a produir-se el creixement, els fruits són susceptibles a *M. laxa*; i finalment, a la quarta etapa o fase climatèrica, en la qual els fruits aconsegueixen la maduresa total, es descriu un augment i manteniment de la susceptibilitat (Guidarelli *et al.* 2014). A més, la maduració en préssecs genera, entre altres canvis, una reestructuració de la paret cel·lular que implica una reducció del contingut en arabina i una despolarització de l'hemicel·lulosa i la pectina. Tot aquest procés afavoreix l'increment de la susceptibilitat a infeccions fúngiques (Baró-Montel *et al.* 2019b).

1.2.2. Cicle de la malaltia

La podridura marró és una malaltia policíclica amb diversos cicles d'infecció durant el període vegetatiu de la planta hoste i cada un té una durada aproximada d'una setmana (EFSA 2011). Els cicles successius d'infecció es poden dividir en les següents fases: infecció, seguida d'esperulació i, finalment, disseminació.

En la Figura 1 es descriu el cicle biològic de la malaltia. L'inòcul primari de *Monilinia* spp. a la primavera prové dels fruits mòmia que han passat l'hivern a l'arbre, on produeixen estructures asexuals (esporodoqui) i conidis, o bé al terra del camp, on produeixen estructures sexuals (apoteci) i ascòspores (Oliveira-Lino *et al.* 2016). És per això que la incidència de préssecs mòmia es pot usar per predir la incidència de podridura marró que hi haurà en la postcollita (Rungjindamai *et al.* 2014).

Les espores es transporten pel vent, la pluja i/o els insectes i el lloc d'infecció pot ser qualsevol part de les flors com els estigmes, els estams o els pètals. Les espores germinen quan es donen les condicions favorables de temperatura i humitat. Llavors, la flor es veu afectada i el miceli avança ràpidament fins al pecíol de la flor i va cap a les branques. L'escorça de la zona infectada mor, el teixit s'enfonsa i es descoloreix, formant el xancre (Martini i Mari 2014). Els conidis formats en aquests teixits (flor i xancre) actuen com a inòcul secundari per la infecció d'altres flors i de fruita en qualsevol estadi de desenvolupament. *Monilinia laxa* pot infectar tant fruita ferida com fruita sana ja que pot penetrar per les ferides, pels estomes i a través de superfícies intactes. Les espècies de *Monilinia*, després de la germinació, desenvolupen un tub germinatiu i/o un apressori que permeten la penetració a la superfície del fruit quan les condicions ambientals són adequades (Oliveira-Lino *et al.* 2016). Un cop el fong ha penetrat, les hifes colonitzen l'hipoderma i el mesocarpí dels fruits. Es produeixen conidis al voltant de l'àrea podrida que poden infectar més fruits al mateix arbre o durant l'emmagatzematge postcollita. No obstant, les infeccions de fruits immadurs al camp poden quedar quiescents fins que les condicions externes (tant del fruit com les ambientals) activen el desenvolupament de la malaltia (Martini i Mari 2014).

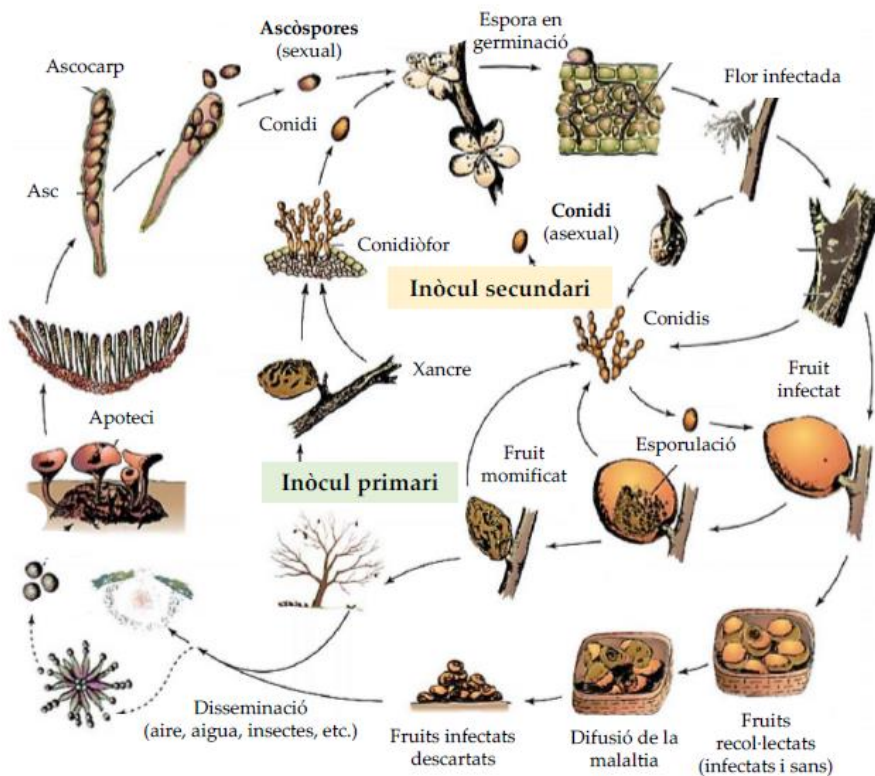


Figura 1 | Cicle de la malaltia de *Monilinia* spp. Extreta de Baró-Montel 2019.

1.3. INTERACCIÓ HOSTE-PATOGEN

Quan es dona la interacció entre l'hoste i el patògen, les espècies de *Monilinia* desenvolupen mecanismes per promoure la infecció mentre que la fruita de pinyol segueix estratègies per evitar l'atac fúngic. En la Figura 2 es representen els principals processos que tenen lloc durant aquesta interacció.

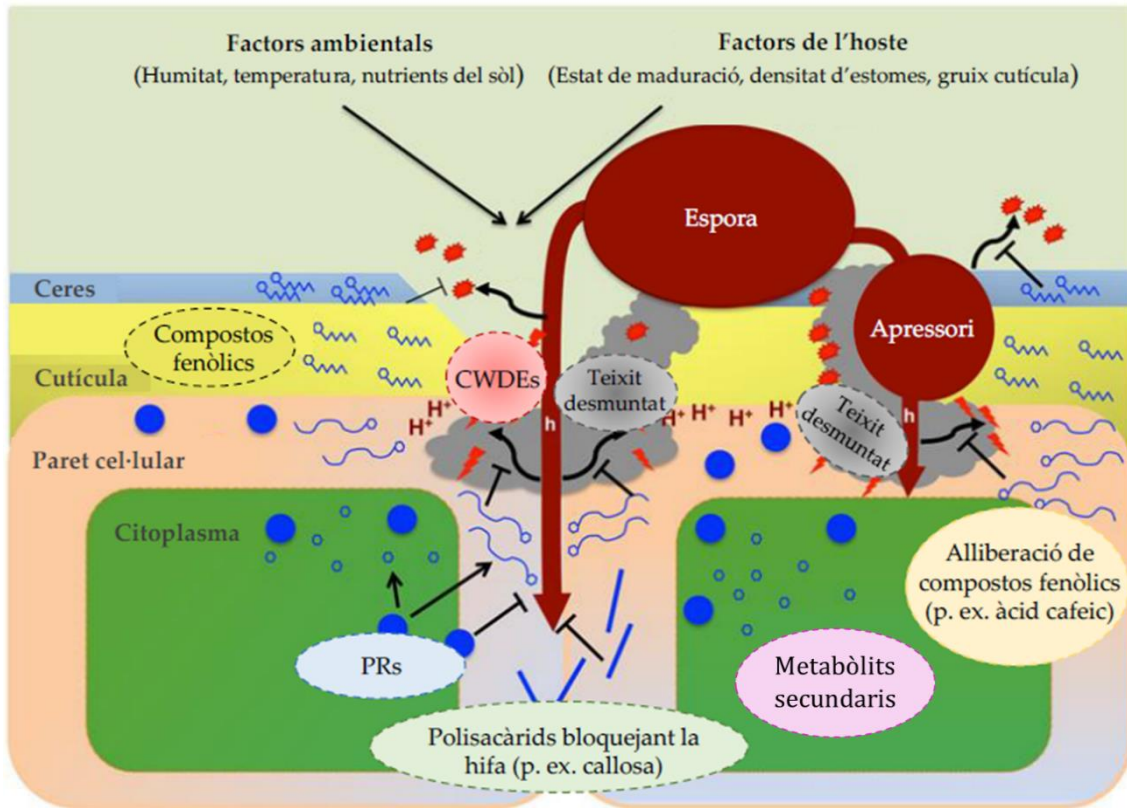


Figura 2 | Principals components de la interacció entre *Monilinia* spp. i fruita de pinyol. CWDEs: enzims degradadors de la paret cel·lular, de l'anglès *cell wall degrading enzymes*; PRs: proteïnes relacionades amb la patogènesi, de l'anglès *pathogenesis-related proteins*. Adaptada de Oliveira Lino *et al.* (2016) i Baró-Montel (2019).

1.3.1. Mecanismes d'infecció del fong

Els fongs de les espècies de *Monilinia* són patògens necròtrofs, és a dir, després de la penetració al teixit del fruit, el colonitzen causant el dany i la mort de les cèl·lules i utilitzant els seus nutrients per alimentar-se i reproduir-se. Per part de l'hoste, la paret cel·lular de les plantes està formada per la làmina mitjana, la paret primària i la paret secundària. Els polisacàrids pectina, cel·lulosa i hemicel·lulosa representen més del 90 % de la paret cel·lular primària (Lagaert *et al.* 2009). Per tant, per penetrar a la superfície del fruit i colonitzar-lo, *Monilinia* spp., igual que altres fongs necròtrofs com *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*, secreten fitotoxines i enzims degradadors (Garcia-Benitez *et al.* 2019).

Per degradar la pectina de la paret cel·lular vegetal, *Monilinia* spp. secreten varis enzims, entre els quals destaquen les endopoligalacturonases, les pectines liases, les pectines esterases, les cutinases i les cel·lulases.

Les endopoligalacturonases (EPGs) ataquen hidrolíticament l'àcid poligalacturònic; les pectina liases o pectina metil-trans-eliminases ataquen l'àcid poligalacturònic amb alt grau d'esterificació i les pectina esterases o pectina metilesterases alliberen els grups metoxil dels carboxils de l'àcid galacturònic (Byrde i Willetts 1977). S'han reportat cinc gens que poden codificar per les EPGs en *M. fructicola*, un dels quals és *MfPG1*, que produeix lesions i provoca un increment en la producció d'espècies reactives d'oxigen en els pètals dels presseguers com a resposta de defensa de la planta (Chou *et al.* 2015).

Les cutinases són enzims que els fongs patogènics poden usar per degradar la cutícula i penetrar el fruit. Per exemple, s'han reportat 4 gens que podrien codificar per les cutinases en *M. fructicola*, un dels quals és *MfCUT1* (Wang *et al.* 2000). Lee *et al.* (2010) van detectar una sobreexpressió d'aquest gen, el qual associen amb un increment de la virulència del patogen, en un entorn oxidant. L'activitat cutinasa també s'ha detectat en cultius de *M. laxa* (Garcia-Benitez *et al.* 2019).

Les cel·lulases són els enzims necessaris per descompondre la cel·lulosa de la paret vegetal i se n'han aïllat en cultius de les tres espècies de *Monilinia* tot i que la seva secreció sembla ser restringida (Oliveira-Lino *et al.* 2016). A més dels enzims descrits, *Monilinia* spp. poden secretar glicosidases i xilanases, i en concret per *M. fructicola*, s'han descrit enzims secretats degradadors de sucres neutres com l' α -L-arabinofuranosidasa i la β -galactosidasa (Oliveira-Lino *et al.* 2016).

El patogen allibera els enzims al llarg de tota la infecció, sobretot durant la penetració del fong mitjançant l'apressori ja que estoven la paret cel·lular de l'hoste. A més, per incrementar la patogenicitat, varis fongs sintetitzen melanina a partir de l'oxidació de la tirosina. En diferents estudis es va concloure que la melanització de l'apressori està involucrada en la reducció de la porositat de la paret d'aquest i en el cas de *M. laxa*, sense aquesta reacció no es pot desenvolupar la infecció (De Cal i Melgarejo 1993). Una altra eina que tenen les espècies de *Monilinia* per infectar el seu hoste és la reducció del pH del teixit de l'hoste secretant àcid glucònic durant la colonització. Es va comprovar que a pH baixos (3-4), l'expressió relativa dels gens *MfPG2* i *MfPG3*, que codifiquen per la poligalacturonasa de *M. fructicola*, va ser 12 i 6 vegades major que en un medi neutre, respectivament (De Cal *et al.* 2013).

Tot i que molts treballs han identificat diferents elements implicats en el procés d'infecció, encara no és possible comprendre completament els passos successius del progrés de la infecció.

Les estratègies patogèniques han estat estudiades més intensament en altres gèneres de la família *Sclerotiniaceae* que en *Monilinia*. Per exemple, *Botrytis cinerea*, un altre membre d'aquesta família, té activitat cutinasa, poligalacturonasa i cel·lulasa (Rodríguez-Pires *et al.* 2020). Algunes de les famílies d'enzims actius de carbohidrat (CAZymes), a més de mostrar activitat enzimàtica, estan implicades en altres funcions. Per exemple, la xilanas BcXyn11A de *B. cinerea* té activitat necrotitzant i és necessària per una virulència completa (Noda *et al.* 2010). En aquests casos, la genòmica comparativa pot resultar una eina útil per identificar possibles gens compartits per diferents espècies de patògens.

1.3.2. Mecanismes de defensa de la fruita

La primera línia de defensa de la planta que *Monilinia* spp. han de superar són les barreres constitutives físiques i químiques (cutícula, paret cel·lular, ceres, compostos fenòlics, etc.) i la segona línia són les defenses induïdes (proteïnes, ROS, metabòlits secundaris, etc.) (Oliveira-Lino *et al.* 2016).

Com a barreres constitutives, d'entre les físiques, en un primer nivell hi ha la capa de cera epicuticular (Oliveira-Lino *et al.* 2020). Està formada per uns cristalls que impedeixen la formació d'una pel·lícula d'aigua i, per tant, la germinació d'espores. Les ceres són mesclades complexes de lípids, constituïdes majoritàriament per triterpenoides, fitoesterols, flavonoides, etc. (Yeats i Rose 2013). En un segon nivell, es troba la cutícula, formada per polímers d'hidrocarburs i cutina amb ceres incrustades. La cutícula és una capa discontinua ja que hi poden haver tricomes, estomes i/o porus per on poden entrar els patògens (Oliveira-Lino *et al.* 2016). L'última barrera física és la paret cel·lular, que pot variar en composició i gruix (Oliveira-Lino *et al.* 2016). D'entre les barreres químiques constitutives, s'hi distingeixen els compostos fenòlics de l'epidermis dels fruits, com els àcids cafeics i clorogènics, els quals es troben en concentracions elevades en fruits immadurs. Tot i així, la presència d'aquests compostos en suspensions de conidis de *M. fructicola* no va inhibir la germinació en flors ni pètals però sí va inhibir la formació de l'apressori a partir de conidis germinats i el desenvolupament posterior de la podridura marró (Lee i Bostock 2007). A més, prèviament es va comprovar que aquests àcids fenòlics i altres compostos antioxidants eren capaços d'atenuar la cutinasa en *M. fructicola* (Bostock *et al.* 1999).

Un cop *Monilinia* spp. superen les defenses constitutives de la planta, s'activen les defenses induïdes. En aquest cas, les interaccions planta-patogen tenen lloc quan els receptors de la planta reconeixen els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), els quals desencadenen les respostes de defensa, i en últim lloc, la immunitat desencadenada per patrons (PTI) (Zipfel 2014). A més, les plantes també disposen de la immunitat desencadenada per efectors (ETI), els quals són factors de virulència que secreten els patògens (Zipfel 2014). Durant la PTI i l'ETI, s'indueix la via de transducció d'hormones de l'hoste, com l'àcid jasmònic i l'etilè (Pandey *et al.* 2016), els quals són comuns de la resposta a fongs nectròtrofs (Glazebrook 2005). Una altra resposta que es produeix és la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Les ROS tenen un efecte antimicrobià directe i, a més, serveixen com a senyal activadora d'altres respostes de defensa (Torres *et al.* 2006). Com a mecanisme de defensa induït també té lloc la síntesi de proteïnes relacionades amb la patogènesi (PRs), que s'incrementen en situacions d'estrès com un atac fúngic i inhibeixen els enzims patògens o alteren les conformacions enzimàtiques (Oliveira-Lino *et al.* 2016). Una resposta de defensa més tardana és l'acumulació de metabòlits secundaris, uns compostos orgànics que no estan involucrats directament en el creixement, el desenvolupament ni la reproducció però sí en algunes funcions específiques que permeten un correcte desenvolupament de les plantes (Bartwal *et al.* 2013). Alguns metabòlits secundaris, com els fenòlics, els terpenoides i els esteroides, fan funcions de defensa davant l'estrès biòtic i abiòtic (Bartwal *et al.* 2013). En un estudi transcriptòmic del patosistema nectarina-*M. laxa*, Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van observar una major expressió dels gens involucrats en el metabolisme secundari en fruits immadurs que van ser resistents a *M. laxa* que en fruits que en van ser susceptibles.

En concret, els terpenoides són una classe de terpens modificats i deriven de l'isopentenil difosfat (IPP), un compost de 5 carbonis, i el seu isòmer al·lèlic dimetilalil difosfat (DMAPP). Les plantes utilitzen dues vies independents per produir IPP i DMAPP: (1) la via de l'àcid mevalònic (MVA), que proveeix els precursors pels sesquiterpenoides, fitosterols, brassinoesteroides i triterpenoides en el citosol, i (2) la via del metileritriol fosfat (MEP), preferentment usada per la biosíntesi de monoterpènoïdes, diterpenoides i carotenoides en els plastidis (Tholl 2015) (Figura 3).

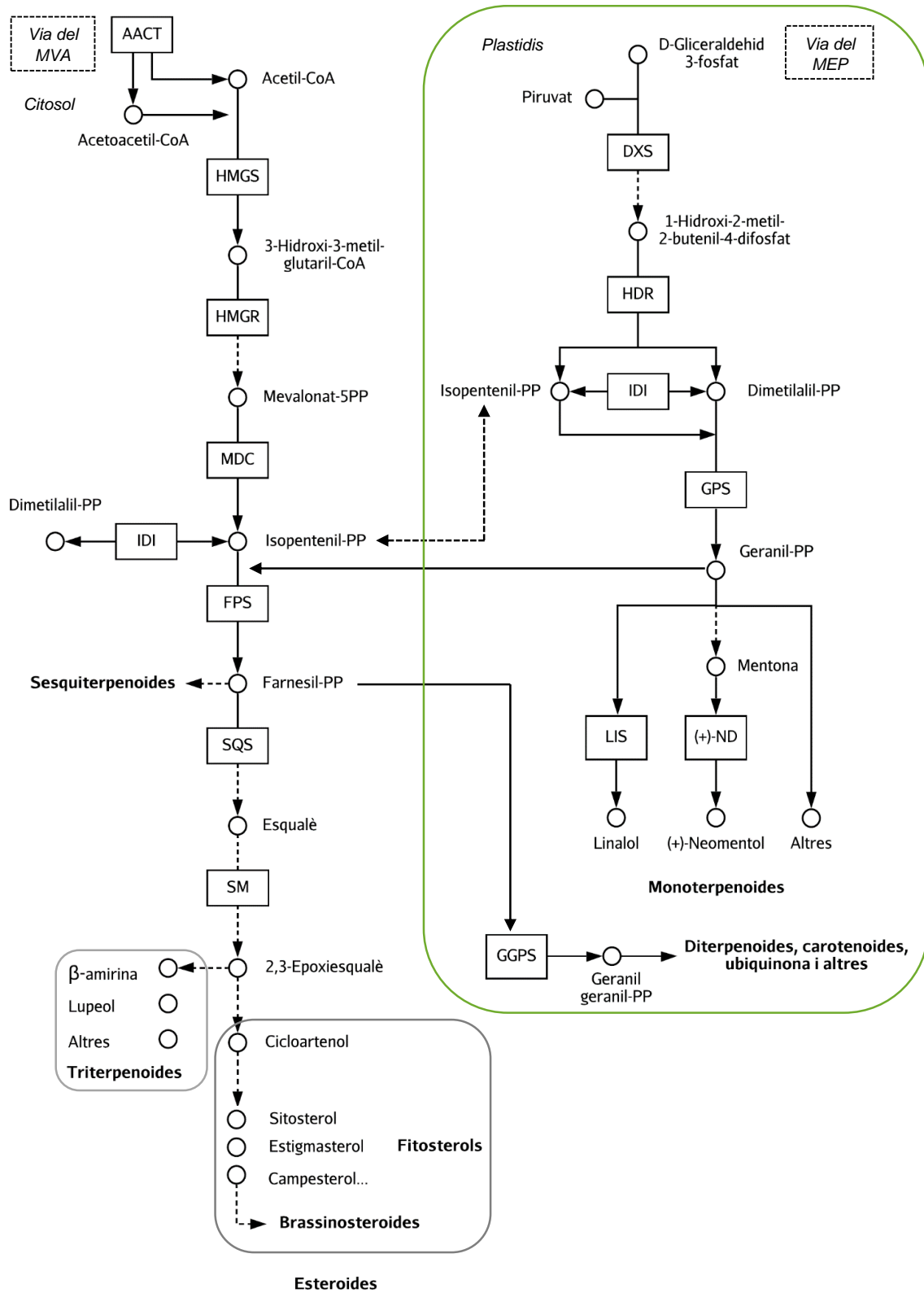


Figura 3 | Síntesi de terpenoides per la via de l'àcid mevalònic (MVA) en el citosol i per la via del metileritriol fosfat (MEP) en els plastidis. Els cercles representen substrats i compostos, i les línies discontinües indiquen que s'ha omès algun pas.

El farnesil difosfat (FPP) (15C) es pot obtenir per acció de l'enzim farnesil difosfat sintasa (FPS) a partir tant de l'IPP com del DMAPP i dona lloc a (i) els sesquiterpenoides, (ii) els diterpenoides i (iii) els triterpenoides i els esteroides (Figura 3). Per acció de l'esqualè sintasa (SQS), a partir del FPP s'obté l'esqualè (triterpè, 30C). L'activitat de l'esqualè monooxigenasa o l'esqualè epoxidasa (SM) dona lloc al 2,3-epoxiesqualè, a partir del qual es formen alguns triterpenoides (β -amirina i lupeol) i el cicloartenol. La ciclació del cicloartenol genera els esteroides, que comprenen els fitosterols i els brassinoesteroides (Lange i Ghassemian 2003).

La biosíntesi dels esteroides està catabolitzada pels enzims SQS i SM de *Prunus persica* (PpSQS i PpSM), els quals estan codificats pels gens SQS i SM de *P. persica* (PpSQS i PpSM). L'enzim PpSQS catalitza una reacció de dos passos per obtenir esqualè a partir de FPP consumint NADPH i el PpSM catalitza l'oxidació de l'esqualè a 2,3-epoxiesqualè. El paper dels esteroides i la implicació dels gens PpSQS i PpSM en la resposta a la infecció de *M. laxa* encara no han estat estudiats. No obstant, sí que s'ha descrit en altres patosistemes com davant l'atac de *Phytophthora parasitica* a *Nicotiana tabacum* o de *Fusarium Oxysporum* a morella vera (*Solanum nigrum*) (Devarenne *et al.* 2002; Sun *et al.* 2011).

Per tant, aquest és el primer estudi on s'avalua l'expressió d'aquests dos gens de la via de biosíntesi dels esteroides en diferents varietats de nectarina i diferents estats de maduresa durant el procés d'infecció de *M. laxa*.

1.4. HIPÒTESI

La via de biosíntesi dels esteroides de la nectarina està alterada durant la infecció de *Monilinia laxa* depenent de la varietat i/o l'estat de maduresa.

2. OBJECTIU

Analitzar l'expressió de dos gens de biosíntesi d'esteroides durant la infecció de *M. laxa* en dues varietats de nectarines ('Venus' i 'Albared') i a dos estats de maduresa que han presentat diferent susceptibilitat al patogen.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIAL VEGETAL

En aquest estudi es van utilitzar nectarines 'Venus' i 'Albared' (*Prunus persica* var. *nucipersica* (Borkh.) Schneider) procedents de camps de producció ecològica ubicats a Raïmat i Alfarràs (Lleida, Catalunya, NE Espanya), respectivament. Les nectarines 'Venus' i 'Albared' es van embossar 10 i 8 setmanes abans de la collita comercial, respectivament. Les nectarines es van collir en dos estats diferents de maduresa: immadur, corresponent a 184 dies julians per 'Venus' i 219 dies julians per 'Albared', i madur, corresponent a 211 dies julians per 'Venus' i 246 dies julians per 'Albared'.

Un cop al laboratori, es van descartar els fruits que presentaven deformacions, cops i/o ferides. Seguidament, per homogeneïtzar tots els fruits segons la seva maduresa, es va mesurar l'índex d'absorbància d'aquests mitjançant un DA-meter (TR-Turoni). A partir de l'absorbància s'obté el contingut en clorofil·la, el qual és un índex precís de l'estat de maduresa dels fruits. És a dir, com més madura és la fruita, menor és el valor obtingut amb el DA-meter (interval entre 0,0 i 0,6); i com més verda és la fruita, major és el valor (interval entre 0,6 i 1,2). D'aquesta manera es van descartar els fruits més madurs i els més immadurs. També es van avaluar els paràmetres de qualitat de 20 fruits de cada varietat escollits a l'atzar. Es va quantificar (1) el pes amb una balança electrònica, (2) el calibre mitjançant un peu de rei, (3) la fermesa amb un penetròmetre que dona la resistència a la penetració que presenta la polpa del fruit i (4) el contingut en sòlids solubles mitjançant un refractòmetre digital.

3.2. PATOGEN I PREPARACIÓ DE L'INÒCUL

En aquest estudi es va utilitzar la soca *M. laxa* 8L (ML8L, número de la Col·lecció del Tipus de Cultiu Espanyol (CECT) 21100) de la col·lecció de fongs de Postcollita (IRTA). El fong estava mantingut en glicerol al 20 % (*p/v*) a -80 °C. Prèviament a la preparació de l'inòcul, es feien ressembres en plaques de Petri que contenien medi PDA (Patata Dextrosa Agar, Biokar Diagnostics, 39 g L⁻¹) suplementat amb un 25 % de suc tomàquet i s'incubaven a un fotoperíode de 12 hores a 25 °C (dia) / 18 °C (nit) durant 7 dies.

Per preparar les suspensions de conidis es va seguir el protocol descrit per Baró-Montel *et al.* (2019a). A les plaques de Petri de la colònia de *M. laxa*, crecudada durant 7 dies al fotoperíode, es va afegir 2-3 mL d'aigua estèril amb 0,01 % de Tween-80 (*p/v*) (Panreac) i es va rascar per recuperar els conidis. Això es va fer en varies plaques per tal d'aconseguir la quantitat necessària per realitzar totes les inoculacions posteriors. Després, es va filtrar l'inòcul amb una gassa estèril per minimitzar la presència de

fragments de miceli i de restes d'agar. Finalment, es va realitzar el recompte de conidis a la cambra Thoma per calcular la concentració de l'inòcul i diluir fins a la concentració desitjada (10^6 conidis mL^{-1}).

3.3. INOCULACIÓ DE LA FRUITA I INCUBACIÓ

Es va inocular la superfície de cada fruit amb sis gotes de 30 μL de la suspensió de conidis de *M. laxa* (10^6 conidis mL^{-1}). Els fruits control es van inocular de la mateixa manera però amb aigua estèril amb 0,01 % (*p/v*) de Tween-80.

Els fruits es van dipositar en alvèols de plàstic, dins de carmanyoles amb paper de cel·lulosa mullat amb aigua estèril al fons de la carmanyola per augmentar la humitat durant la incubació i aconseguir una humitat relativa del 97 ± 3 % a 20 ± 1 °C. Després de 14, 24, 48 i 72 hores post-inoculació (hpi) es va realitzar el mostreig dels fruits inoculats i dels fruits control. Tot això es va realitzar en un total de 20 fruits per tractament (control o *M. laxa*), estat de maduresa, varietat i temps de mostreig. Per tenir una avaluació visual, també es van realitzar unes inoculacions paral·leles de 2 fruits per cada condició i se'n van realitzar talls al llarg de la ferida.

3.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

3.4.1. Mostreig i processament de les mostres

A cada temps de mostreig, es van fer sis cilindres d'1 cm de diàmetre i 1 cm de gruix que contenien la pell i la polpa de cada nectarina mitjançant un trepant i un bisturí. Aquests cilindres englobaven els llocs d'inoculació. Immediatament, es van congelar les mostres en nitrogen líquid i es van emmagatzemar a -80 °C fins el moment del posterior processament. Es va treballar amb 3 rèpliques biològiques de 5 fruits cada una per cada condició.

Les mostres congelades es van triturar en nitrogen líquid mitjançant una mà de morter esterilitzada (prèviament autoclavada).

3.4.2. Extracció d'ARN

Es va fer una extracció fisicoquímica de l'ARN seguint el protocol descrit per Baró-Montel *et al.* (2019a) a cadascuna de les mostres per separat. Breument, es va barrejar 10 mL de tampó d'extracció (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 2 % de sal sòdica N-lauroilsarcosina (*p/v*) i 1 % de polivinilpirrolidona-40 (*p/v*) i 1 % de β -mercaptoetanol (addicionat just abans de fer servir) amb 5 mL de fenol i es va escalfar a 65 °C. S'hi va afegir 3 g de teixit triturat, portat de -80 °C amb nitrogen líquid, i es va incubar durant 15 min a 65 °C, agitant periòdicament. Es va refredar en gel i s'hi va afegir

5 mL de cloroform:alcohol isoamílic (CHCl₃:IA) (24:1, v/v). Es va centrifugar a 4.500 rpm durant 20 min a 4 °C, es va recuperar la fase aquosa i es va reextreure amb 10 mL de fenol:CHCl₃:IA (25:24:1, v/v/v). Es va centrifugar a 4.500 rpm durant 20 min a 4 °C i es va transferir la fase aquosa a un nou tub per centrifugar-la de nou a 15.000 rpm durant 15 min a 4 °C. Es va recuperar el sobrenedant i es va afegir 1/3 del volum de LiCl 12 M. Es va incubar tota la nit a -20 °C. L'endemà, les mostres es van centrifugar a 15.000 rpm durant 45 min a 4 °C i es va descartar el sobrenedant. Es va afegir 1 mL d'acetat de sodi 3 M pH 6,0 al pellet obtingut i es va transferir a un Eppendorf de 2 mL. Es va tornar a centrifugar a 12.000 rpm durant 5 min a temperatura ambient. Es va eliminar el sobrenedant i es va rentar el pellet amb 500 µL d'etanol 70 % (v/v). Es va centrifugar a 12.000 rpm durant 5 min a temperatura ambient i es va descartar el sobrenedant. Es va resuspendre en 50 µL d'aigua estèril i lliure d'ARNases. Les mostres es van incubar durant 10 min a 65 °C i es van centrifugar a 12.000 rpm durant 5 min a temperatura ambient. Finalment, el sobrenedant es va transferir a un nou tub i aquest era l'ARN cru.

Durant la primera estada de pràctiques vam estar fent les extraccions d'ARN amb 1 g de teixit però s'obtenia una concentració d'ARN molt baixa, per tant, durant la segona estada de pràctiques es va modificar el protocol i partíem de 3 g de teixit. A més, per tal d'optimitzar el procés, les extraccions de les mostres es van realitzar de 6 en 6.

3.4.3. Avaluació de la concentració, qualitat i integritat de l'ARN

La concentració i qualitat d'ARN cru es van determinar mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La qualitat s'avalua amb els ràtios 260/280 i 260/230, els quals es troben al voltant de 2 si l'ARN és pur. Seguidament, es va avaluar la integritat de l'ARN i la possible presència d'ADN mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8 %. Per la preparació del gel, es va dissoldre la quantitat necessària d'agarosa amb Tris Borat EDTA (TBE) 1X i es va escalfar al microones amb agitació esporàdica evitant l'ebullició. Es va deixar temperar uns minuts i es va abocar al suport d'electroforesi. Es va deixar solidificar completament i es va col·locar a la cubeta d'electroforesi amb TBE 1X. Seguidament, es van carregar les mostres al gel d'agarosa. Al primer pou es va carregar el marcador de pes molecular, que serveix per estimar el pes molecular de fragments d'àcid nucleic, i es van afegir 4 µL d'aigua, 2 µL d'agent de tinció GelRed™ (Biotium) i 2 µL d'aquest marcador (*ladder*) d'ADN 1 Kb Plus Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific), prèviament barrejats. Als altres pous s'hi van carregar les mostres, adaptant la quantitat de cada reactiu en funció de la concentració d'ARN fins a un volum final de 10 µL i per tal que la concentració d'ARN estigués al voltant de 1.000 ng/µL. Quan les mostres tenien una concentració d'ARN de 500 ng/µL, es van carregar

7 µL d'aigua, 2 µL de GelRed™ i 1 µL de mostra; quan tenien una concentració de 1.000 ng/µL, es van carregar 7,5 µL d'aigua, 2 µL de GelRed™ i 0,5 µL de mostra; i quan la concentració d'ARN era superior, es van diluir les mostres en 1/2 o 1/3 abans de carregar-les. Seguidament, es va deixar córrer a un voltatge constant de 90 V durant 1 hora. Finalment, es van visualitzar les bandes d'àcids nucleics sota la llum ultraviolada en un transil·luminador (Bio-Rad Laboratories) per tal de comprovar la integritat de les mostres.

Les molècules d'ARN estan carregades negativament i, durant l'electroforesi, migren cap a l'ànode en presència d'un corrent elèctric. La longitud de l'ARN generalment determina la migració en el gel, ja que les molècules d'ARN més llargues es mouen més lentament que les molècules més curtes (Agarose gel electrophoresis of RNA n.d.). Per quantificar de forma aproximada les bandes obtingudes, s'utilitza el marcador d'ADN 1 Kb Plus Invitrogen™, el qual es pot utilitzar en el nostre estudi perquè es fa servir GelRed™ com a agent de tinció i s'uneix tant a ADN com a ARN. El marcador consisteix en 18 fragments d'ADN individuals d'entre 100 i 15.000 parells de bases (pb), i la banda de referència és de 1.500 pb (Invitrogen 2017).

Si l'ARN està intacte i té bona qualitat, s'espera veure dues bandes corresponents a les subunitats ribosòmiques de 28S i 18S de l'ARN en el gel d'electroforesi, on la primera hauria de ser el doble d'intensa que la segona (Agarose gel electrophoresis of RNA n.d.). De fet, s'hauria de veure quatre bandes, dues de les subunitats de l'ARNr de la nectarina i dues de les subunitats de l'ARNr de *M. laxa*, tot i que les del fong sovint són inapreciables.

A més, s'espera veure a la part superior una banda amb menys intensitat corresponent a l'ADN genòmic residual. Per eliminar-lo, es fa un tractament amb ADNases.

3.4.4. Eliminació d'ADN genòmic

Per evitar possibles interferències en l'anàlisi de l'expressió gènica, es va eliminar l'ADN genòmic contaminant present a l'ARN en cada mostra. Per fer-ho, es va utilitzar el kit comercial Turbo ADN-free™ (Ambion) i es van seguir les indicacions de la casa comercial. Primer, per fer la digestió, es van afegir 0,1 volums del tampó ADNasa 10X Turbo (com que hi havia 50 µL de mostra, es van afegir 5 µL de tampó a cada tub) i 1 µL d'ADNasa Turbo a les mostres d'ARN i es van agitar suaument. En el cas de les mostres que tenien molta concentració (> 2.000 ng µL⁻¹) es va addicionar 2 µL d'ADNasa Turbo i en alguns casos va caldre una segona tanda d'eliminació. Seguidament, es van incubar les mostres al *termoblock* durant 30 min a 37 °C. Passat aquest temps, es va produir la inactivació de l'enzim mitjançant l'addició de 0,1 volums del reactiu

d'inactivació d'ADNasa (va correspondre a 5 μL de reactiu) i la incubació a temperatura ambient durant 5 min amb agitació esporàdica. Després, es van centrifugar a 10.000 g durant 1,5 min a temperatura ambient. Finalment, es va transferir el sobrenedant de cada mostra amb l'ARN suposadament lliure d'ADN a un nou Eppendorf d'1,5 mL de tipus *low binding*, és a dir, de baixa unió de molècules. Per agilitzar el procés, les eliminacions es van realitzar en tandes de 12 mostres.

Es va determinar la concentració, la qualitat i la integritat d'ARN net, així com també l'absència d'ADN, seguint la metodologia descrita en el punt '3.4.3. Avaluació de la concentració, qualitat i integritat de l'ARN'.

3.4.5. Síntesi d'ADN complementari

L'expressió gènica es realitza en ADN i, per tant, cal obtenir ADN complementari (ADNc) de doble cadena a partir d'ARN mitjançant la transcripció inversa o retrotranscripció.

En aquest estudi, es va fa servir el kit comercial de síntesi de primera cadena SuperScript™ IV (Invitrogen). Es va preparar la *mix 1* afegint 1.000 ng d'ARN (prèviament es va calcular quants μL d'ARN obtingut calia addicionar per una concentració final de 1.000 ng per cada mostra) a una barreja d'1 μL d'Oligo d(T)₂₀ 50 μM , 1 μL de *mix* dNTP 10 mM i aigua lliure d'ARNases fins a un volum final de 13 μL . Es van incubar els tubs durant 5 min a 65 °C al termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) per tal que es donés la desnaturalització de l'encebador i de l'ARN. Després, es van posar a refredar durant 1 min a 4 °C per permetre la hibridació de l'encebador amb el motlle d'ARN. A cada mostra s'hi va afegir la *mix 2*, una barreja (7 μL) que contenia 4 μL de tampó SSIV 5X, 1 μL de DTT 100 mM, 1 μL d'inhibidor de ribonucleasa i 1 μL de transcriptasa inversa SuperScript IV (200 U/ μL), i per tant, fins a un volum final de 20 μL . Les incubacions següents al termociclador van ser d'1 min a 4 °C, de 10 min a 50 °C i de 10 min a 80 °C, on es va donar la transcripció i la posterior inactivació de l'enzim SuperScript (condicions d'incubació a la Figura 4). Per optimitzar el procés, les síntesis es van realitzar en tandes de 6 mostres. Finalment, es va mesurar la concentració i la qualitat d'ADNc mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 per tal de comprovar que s'havia transcrit la totalitat de 1.000 ng d'ARN, és a dir, obtenir unes concentracions de 50 ng/ μL finals. Seguidament, les mostres es van diluir a 10 ng/ μL per utilitzar-les en la posterior quantificació relativa de l'expressió dels gens d'interès.

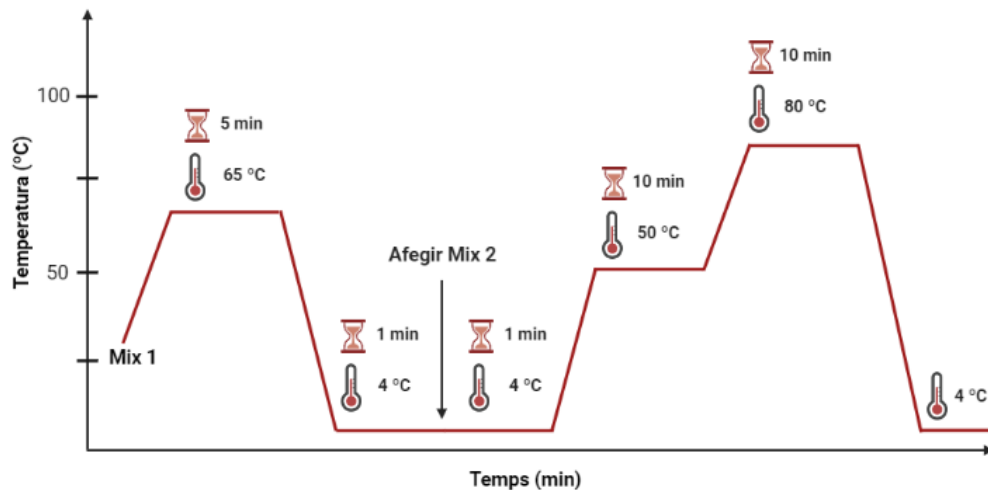


Figura 4 | Condicions d'incubació (temps i temperatura) per la síntesi d'ADNc.

3.4.6. Quantificació relativa per qPCR

La Reacció en Cadena de la Polimerasa a temps real o quantitativa (qPCR) es fa servir per amplificar un gen d'interès utilitzant una parella d'encebadors que hibriden específicament amb el gen d'interès, i quantificar-los després de cada cicle. La quantificació es fa a partir de la fluorescència emesa per un fluorocrom, com el SYBR Green. La quantitat de productes amplificats en cada cicle és proporcional a l'increment de fluorescència emesa. En aquest anàlisi, els resultats s'obtenen en nombre de cicles (Ct), és a dir, quants cicles de PCR s'han de realitzar perquè la corba d'amplificació creui la línia llindar (*threshold line*). El valor Ct s'utilitza com una mesura relativa de la concentració del gen d'interès en cada mostra i és inversament proporcional a aquesta concentració. És a dir, els valors més baixos de Ct (per sota 29) indiquen concentracions altes del gen d'interès, mentre que els valors més alts de Ct (per sobre 38) indiquen concentracions baixes del gen d'interès (Real-Time PCR: understanding Ct n.d.).

La qPCR es va realitzar en el termociclador 7500 Real Time qPCR System (Applied Biosystems) i es va utilitzar per avaluar l'eficiència dels encebadors i l'expressió relativa dels gens d'interès en les mostres d'estudi.

Per avaluar l'eficiència dels encebadors, es va barrejar 1 µL de totes les mostres de 'Venus' i 'Albared', dels dos estats de maduresa i de tots els temps de mostreig a 10 ng/µL de concentració (96 en total), en una barreja anomenada 'mescla d'ADNc', i se'n va fer dos bancs de dilucions independents de cinc concentracions. Primer es va fer un banc de dilucions 1/5 però els valors d'eficiència obtinguts estaven per sota el 90 %. Tot seguit, es va fer un banc de dilucions 1/3 i els resultats van donar dins l'interval adequat, de forma que es va repetir el banc de dilucions 1/3. Seguidament, es va preparar una *master mix* amb el kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems)

seguint les indicacions del fabricant. Es van afegir 5,0 μL /mostra de SYBR, 2,2 μL /mostra d'aigua lliure de nucleases i 0,2 μL /mostra de ROX Lox del kit (fluorocrom inert que normalitza la senyal fluorescent a la qPCR per reduir la variabilitat entre rèpliques tècniques). Tot seguit, es va dividir la solució final en 4 tubs, un per cada gen (*PpTEF2*, *PpRPII*, *PpSQS* i *PpSM*), i a cada un dels tubs s'hi va afegir els encebadors directe i revers a 300 nM (0,3 μL /mostra) corresponents, obtenint 4 *master mix* diferents. Es va repartir 8 μL de la *master mix* de cada gen als pouets corresponents de la placa i, a continuació, es van carregar 2 μL de dilució de mescla d'ADNc als pouets on ja hi havia la *master mix*. Es van fer 3 rèpliques tècniques de cada solució i la mescla d'ADNc va actuar de motlle durant l'amplificació.

Per avaluar l'expressió gènica de cada mostra, es va preparar i repartir una *master mix* per cada gen, tal i com es va fer per avaluar l'eficiència dels encebadors. Seguidament, es va afegir 2 μL de la mostra d'ADNc 10 ng/ μL als pouets on ja hi havia la *master mix* i es van fer 3 rèpliques tècniques de cada. Tots els experiments van incloure un control sense motlle (NTC) fet amb 8 μL de cada *master mix* i 2 μL d'aigua lliure de nucleases, i *PpTEF2* i *PpRPII* com a gens de referència.

Les condicions aplicades en els cicles d'amplificació i la corba de fusió s'indiquen a la Figura 5.

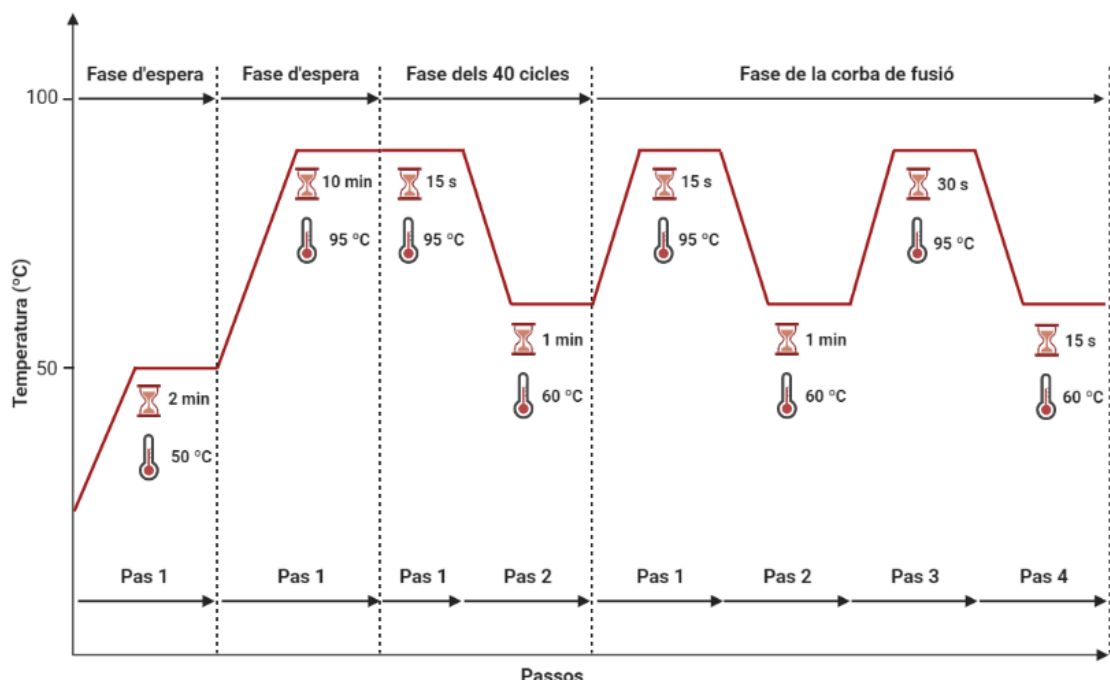


Figura 5 | Condicions aplicades en els cicles d'amplificació i la corba de fusió durant la qPCR.

Per cada parell d'encebadors específics de cada un dels gens (*PpSQS*, *PpSM*, *PpTEFII* i *PpRP1I*), es va calcular l'eficiència dels encebadors (E) en base a la pendent de la corba estàndard (Equació 1). S'obté una E òptima quan els encebadors hibriden correctament amb la cadena d'ADNc motlle i en la fase exponencial de cada cicle de la PCR, es duplica el nombre de còpies d'ADNc. En aquest cas, l'eficiència seria de 2 i aquest valor també es pot expressar en forma de percentatge. El valor de l'eficiència dels encebadors respecte 2 es fa servir per calcular l'expressió relativa dels gens *PpSQS* i *PpSM* normalitzats als gens de referència *PpTEFII* i *PpRP1I*. Es va seguir l'Equació 2 descrita per Muller *et al.* (2002) i primer es va calcular la mitjana aritmètica dels valors de Ct de les rèpliques tècniques dels gens d'interès i de referència (r_1 , r_2 i r_3 de l'Equació 2). Després, tenint en compte aquests resultats i l'eficiència dels encebadors (E), es va calcular l'expressió relativa normalitzada (ERN) als gens de referència.

$$E = -10^{\frac{-1}{pendent}} \quad (1)$$

$$ERN = \frac{(E_{interès})^{\frac{Ct_{interès,r1} + Ct_{interès,r2} + Ct_{interès,r3}}{3}}}{(E_{referència})^{\frac{Ct_{ref,r1} + Ct_{ref,r2} + Ct_{ref,r3}}{3}}} = \frac{(E_{interès})^{Ct_{interès,mitjana}}}{(E_{referència})^{Ct_{ref,mitjana}}} \quad (2)$$

3.5. TRACTAMENT DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les dades es van analitzar estadísticament amb el programa JMP® versió 13.1.0 (SAS Institute Inc.). Es van descartar els valors atípics (*outliers*) i es van avaluar les suposicions del model (heteroscedasticitat de la variància de l'error, normalitat dels residus (test de Shapiro-Wilk) i homogeneïtat de les variàncies (test de Levene)) per les dades originals i amb transformació logarítmica. Les dades originals complien la majoria de les suposicions del model però com que les dades transformades a logaritme eren molt similars a les originals i no milloraven més, es va decidir seguir l'estudi amb les dades originals. Es va fer un anàlisi de la variància (ANOVA) i quan l'estadístic F va ser estadísticament significatiu, es va fer servir el test t de Student (per dues mitjanes) o el test de Tukey HSD (per més de dues mitjanes) per comparar mitjanes utilitzant un nivell significatiu de $p < 0,05$.

4. RESULTATS

4.1. PARÀMETRES DE QUALITAT DELS FRUITS

A partir de la fruita collida inicialment, es van analitzar i comparar els paràmetres de qualitat (Taula 1) entre les nectarines 'Venus' i 'Albared' en estat immadur i madur. El pes, el diàmetre i el contingut de sòlids solubles van ser més elevats en els fruits 'Venus' que en els fruits 'Albared'. L'interval de l'índex de maduresa i la fermesa van ser semblants entre les dues varietats.

Taula 1 | Paràmetres de qualitat de les nectarines 'Venus' i 'Albared' en estat immadur i madur.

Cultiu	Collita (d julians)	I _{AD}	Pes (g)	Diàmetre (mm)	Fermesa (N)	CSS (°Brix)	
'Venus'	Immadur	184	1,99 – 2,26	70,98 ± 2,56	48,95 ± 0,59	108,76 ± 1,91	9,83 ± 0,19
	Madur	211	0,25 – 1,60	187,65 ± 10,60	67,71 ± 1,30	74,43 ± 2,74	13,34 ± 0,32
'Albared'	Immadur	219	1,00 – 2,06	123,13 ± 8,53	59,18 ± 1,40	105,60 ± 1,70	12,37 ± 0,25
	Madur	246	0,16 – 1,32	235,90 ± 8,78	75,15 ± 0,96	73,45 ± 2,30	14,05 ± 0,25

I_{AD}, valors mínims i màxims de la diferència d'absorbància; CSS, contingut en sòlids solubles. Les dades corresponen a la mitjana de 20 fruits ± error estàndard.

4.2. OBTENCIÓ DE MATERIAL VEGETAL SA I INFECTAT

Un cop al laboratori, es van inocular les nectarines 'Venus' i 'Albared' en els dos estats de maduresa diferents amb *M. laxa* i amb una suspensió control. La malaltia es va desenvolupar de forma similar en la fruita madura de les dues varietats però la infecció es va observar abans en la varietat 'Albared' (Figura 6b). En canvi, a la fruita immadura, la resposta del fruit a l'inòcul de *M. laxa* va ser diferent entre les dues varietats. Les nectarines 'Venus' no van mostrar símptomes de malaltia i per tant van ser menys susceptibles (només es va observar una decoloració per la gota d'inòcul a les 48 hpi i 72 hpi), mentre que les nectarines 'Albared' en van ser susceptibles (decoloració per la gota a les 48 hpi i maceració del fruit a les 72 hpi) (Figura 6a).

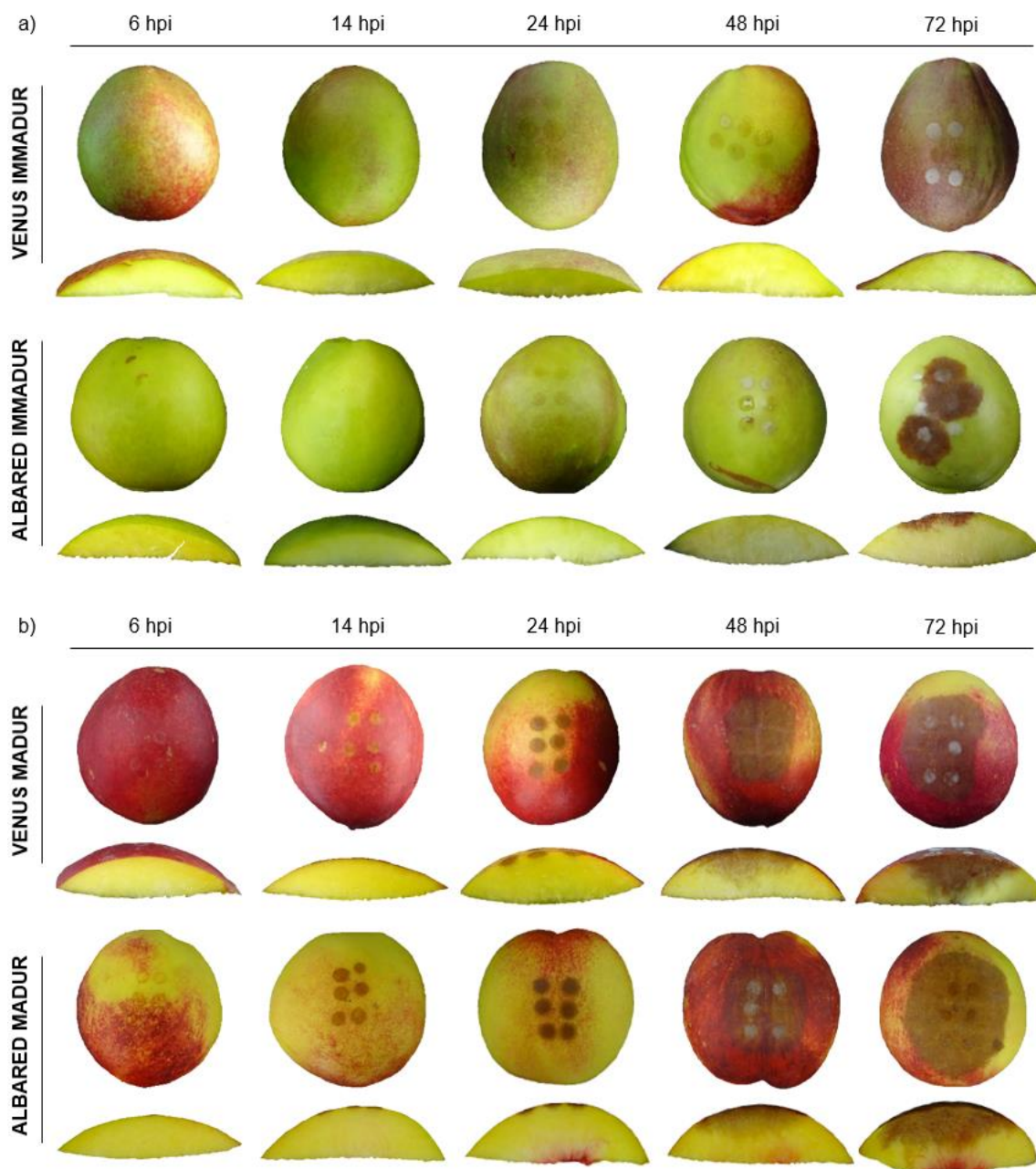


Figura 6 | Desenvolupament de la podridura marró causada per *Monilinia laxa* en nectarines 'Venus' i 'Albared'. a) Estat immadur i b) estat madur a diferents temps (6, 14, 24, 48 i 72 hores post-inoculació (hpi)). Es mostra a cada temps la cara inoculada (part superior) i un tall perpendicular (part inferior) del fruit en el lloc d'inoculació. Imatges cedides pel grup de Patologia de la Postcollita de l'IRTA.

4.3. OBTENCIÓ D'ARN CRU, D'ARN NET I DE LES MOSTRES D'ADNc

En l'extracció d'ARN es van obtenir concentracions d'ARN cru d'una mitjana de 1.000 ng/ μ L en 'Venus' i 4.500 ng/ μ L en 'Albared', sent generalment superior en les mostres immadures que en les madures, i bona integritat de l'ARN. Per eliminar l'ADN genòmic residual present a les mostres (es va veure una banda a la part superior del gel, tal i com es mostra a la Figura 7a), es va fer el tractament amb ADNases. Es va obtenir

concentracions d'ARN net d'una mitjana de 800 ng/μL en 'Venus' i 1.500 ng/μL en 'Albared', les quals també van ser generalment superiors en les mostres immadures que en les madures, bona integritat de l'ARN i no es va apreciar pràcticament contaminació d'ADN genòmic. En el cas d'"Albared", va destacar la diferència en la concentració d'ARN després del tractament amb ADNases. Es va observar que algunes mostres tenien una concentració molt elevada i això feia augmentar la mitjana. Aquest increment en la concentració d'ARN d'algunes mostres podria ser degut a una contaminació i/o interferència d'un elevat contingut d'ADN genòmic.

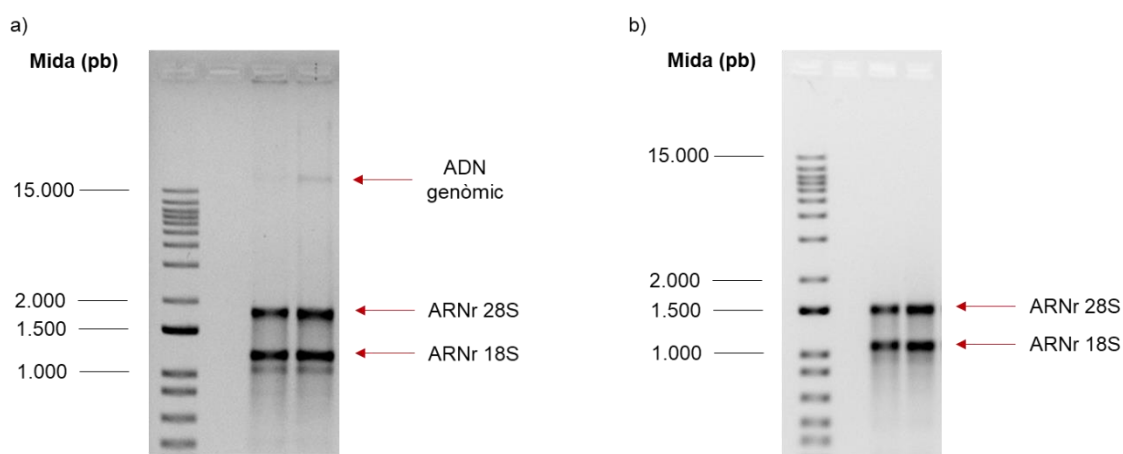


Figura 7 | Resultats del gel d'electroforesi després de carregar a) ARN cru i b) ARN net de dues mostres (com a exemple). En la Figura 7a es distingeix una banda corresponent a l'ADN genòmic residual. Després del tractament amb ADNases, a la Figura 7b no s'identifica ADN genòmic. En les dues figures la banda corresponent a ARNr 28S es troba sobre 1.700 pb i la corresponent a ARNr 18S sobre 1.200 pb.

Després de la síntesi d'ADNc a partir d'1 μg d'ARN, la concentració d'ADNc va tenir una mitjana de 750 ng/μL en 'Venus' i 850 ng/μL en 'Albared'. Això demostra que la transcripció es va realitzar correctament. Pel que fa als ràtios 260/280 i 260/230, el primer és un bon indicador de la puresa d'ADN i ARN i es considera que la mostra és pura quan el valor és 1,8 i 2,0, respectivament. Si el ràtio és inferior en qualsevol dels dos casos, podria indicar presència de proteïna, fenol o altres contaminants. El ràtio 260/230 s'utilitza com a mesura secundària de la puresa dels àcids nucleics. Els valors esperats són entre 2,0 i 2,2, i si el ràtio és inferior, podria ser per la presència de contaminants que absorbeixen a 230 nm (NanoDrop 2007). En l'estudi, els ràtios de les mostres d'ADNc van ser d'entre 1,6-2,0, correctes i adequats per continuar analitzant l'expressió gènica dels gens d'interès.

4.4. EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT qPCR

4.4.1. Eficiència dels encebadors

Prèviament a l'anàlisi de l'expressió gènica, el grup de Patologia de la Postcollita de l'IRTA va dissenyar els encebadors pels gens d'interès *de novo*. La Taula 2 comprèn els encebadors dissenyats.

Taula 1 | Encebadors directe (FW) i revers (RV) dels gens de biosíntesi d'esteroides (*PpSQS* i *PpSM*) i dels gens de referència (*PpTEF2* i *PpRPII*) (Tong *et al.* 2009).

Gen	Encebador	Seqüència (5' – 3')	Eficiència
<i>PpSQS</i>	PpSQS_FW PpSQS_RV	TGTGCCATCCCTCAGATCAT AGGCCCTCCTCATTTTGAC	91,26 %
<i>PpSM</i>	PpSM_FW PpSM_RV	GGAGGCATCTGCTCGTATGG TGATTCCTGACGCACCCAAGA	95,31 %
<i>PpTEF2</i>	PpTEF2_FW PpTEF2_RV	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG	97,34 %
<i>PpRPII</i>	PpRPII_FW PpRPII_RV	TGAAGCATACCTATGATGATGAAG CTTTGACAGCACCAGTA GATTCC	98,07 %

L'eficiència (E) és òptima si els encebadors hibriden correctament amb la cadena d'ADNc i en la fase exponencial de la PCR, es duplica el nombre de còpies d'ADNc. El valor es pot expressar respecte 2 o en forma de percentatge i el rang d'eficiència òptima establert és de 90-110 % (Efficiency of Real-Time PCR n.d.). Si en cada replicació s'obté menys del doble de còpies d'ADNc, l'eficiència és menor de 2 i, per tant, del 100 %. Això pot ser degut a un disseny erroni dels encebadors, a una concentració no òptima dels reactius i/o a la formació d'estructures secundàries, entre altres. Pel que fa al màxim d'eficiència, tot i que hauria de ser del 100 % perquè l'ADN només té dues cadenes i, per tant, en cada cicle com a màxim es pot duplicar les molècules del gen d'interès, també es donen casos on l'eficiència es troba per damunt de 2, i per tant, per damunt del 100 %. Aquest fenomen té lloc quan hi ha una inhibició de la polimerasa provocada per contaminants de la mostra com heparina, hemoglobina, polisacàrids..., o provinents de l'extracció del material genètic, com fenol. En aquest cas, per molt que s'afegeixi ADN motlle, no augmenta el valor Ct i això provoca que en últim terme el pendent sigui més baix i l'eficiència superi el 100 % (Cepin 2017; Efficiency of Real-Time PCR n.d.).

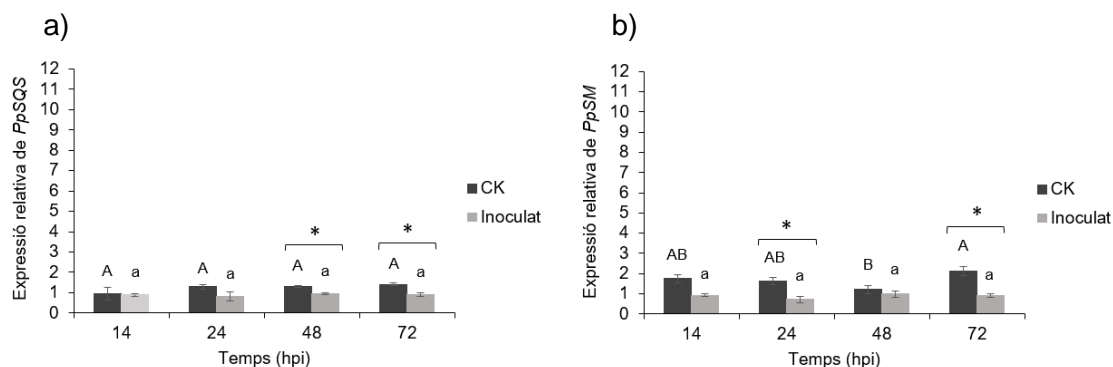
En tots els casos l'E es va trobar dins l'interval 90-100 %: 97,34 % i 98,07 % pels gens de referència *PpTEF2* i *PpRPII*, respectivament, i 91,26 % i 95,31 % pels gens d'interès *PpSQS* i *PpSM*, respectivament.

4.4.2. Expressió dels gens d'interès

Els gens avaluats mostren una expressió major en el teixit sa que en l'infectat i, específicament, *PpSM* mostra un major nivell d'expressió en la varietat 'Albared' que en la 'Venus'. En les nectarines 'Venus' immadures l'expressió de *PpSQS* va ser constant en el temps tant en el teixit control com en el teixit inoculat amb *M. laxa*. A les 48 i 72 hpi la diferència de l'expressió gènica en el teixit control i el teixit inoculat va ser significativa (0,43 i 0,68 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figura 8a). Pel que fa a l'expressió de *PpSM*, en el teixit control immadur, aquesta va disminuir fins a les 48 hpi i, seguidament, va augmentar fins les 72 hpi, moment en què va ser màxima. En el teixit inoculat amb *M. laxa*, l'expressió de *PpSM* es va mantenir constant en el temps. A les 24 i 72 hpi la diferència en l'expressió de *PpSM* entre el teixit control i l'inoculat va ser significativa (1,18 i 1,25 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figura 8b).

En nectarines 'Albared' immadures, l'expressió de *PpSQS* en el teixit control es va mantenir constant al llarg del temps i en el teixit inoculat pràcticament es va comportar igual. En comparar l'expressió de *PpSQS* entre el teixit control i l'inoculat a cada temps, a les 48 i 72 hpi la diferència va ser significativa (1,13 i 2,08 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figura 8c). Quant a l'expressió de *PpSM*, en el teixit control, es va donar un pic d'expressió a les 24 hpi, mentre que en el teixit inoculat l'expressió de *PpSM* va disminuir al llarg del temps. A partir de les 24 hpi, la diferència en l'expressió gènica entre els dos teixits va ser significativa, sent màxima a les 72 hpi (3,41 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figura 8d).

'Venus' immadur



'Albared' immadur

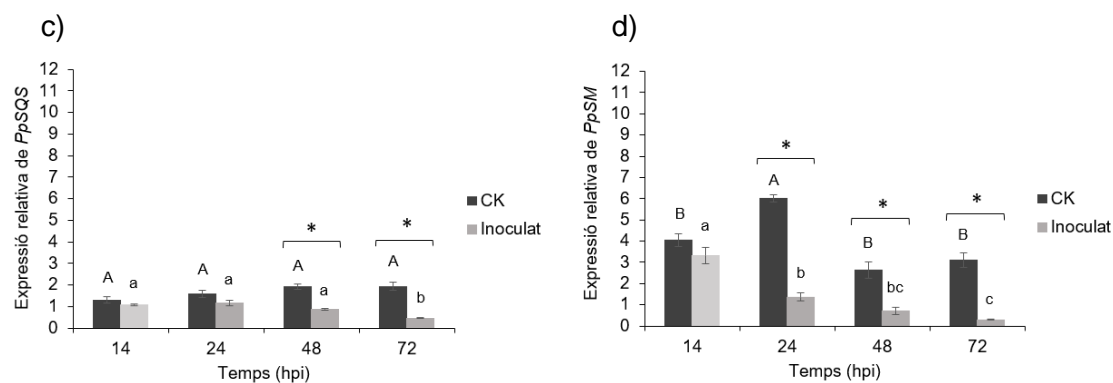
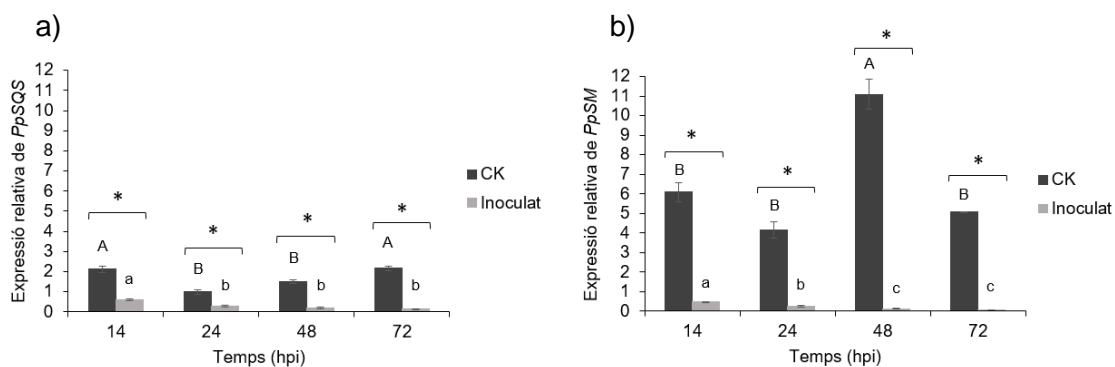


Figura 8 | Nivells d'expressió gènica dels gens de biosíntesi d'esteroides (*PpSQS* i *PpSM*) normalitzats respecte els gens de referència (*PpTEF2* i *PpRPII*) en nectarines immadures. Expressió de a) *PpSQS* i b) *PpSM* en nectarines 'Venus' i expressió de c) *PpSQS* i d) *PpSM* en nectarines 'Albared'. Cada columna representa la mitjana aritmètica ($n=3$) de les mostres després de 14, 24, 48 i 72 hpi i les barres verticals indiquen els errors estàndard de la mitjana. Les lletres majúscules i minúscules indiquen les diferències segons el test Tukey ($p < 0,05$) en teixit control (CK) i inoculat, respectivament, al llarg del temps. Els asteriscs (*) indiquen les diferències significatives segons el test t Student ($p < 0,05$) entre el teixit control i inoculat per cada temps.

Les nectarines madures mostren nivells més elevats d'expressió gènica que les immadures. Els patrons d'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides s'assemblen molt entre les nectarines 'Venus' i 'Albared'. L'expressió de *PpSQS* en el teixit control de les dues varietats és constant al llarg del temps, així com també ho és en el teixit inoculat d'Albared'. En canvi, en el teixit inoculat 'Venus', disminueix a partir de les 24 hpi. La màxima diferència de l'expressió de *PpSQS* entre el teixit control i l'inoculat va ser a les 72 hpi en 'Venus', i a les 48 hpi en 'Albared' (3,95 i 3,80 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figures 9a i 9c). Quant a l'expressió de *PpSM*, en el teixit control de les dues varietats es va donar un pic d'expressió a les 48

hpi. En el teixit inoculat 'Venus' l'expressió va disminuir al llarg del temps mentre que en 'Albared' es va mantenir constant. La diferència més gran entre els dos teixits es va produir a les 48 hpi tant en 'Venus' com en 'Albared' (6,61 i 5,71 vegades menys l'inoculat respecte el control, respectivament) (Figures 9b i 9d).

'Venus' madur



'Albared' madur

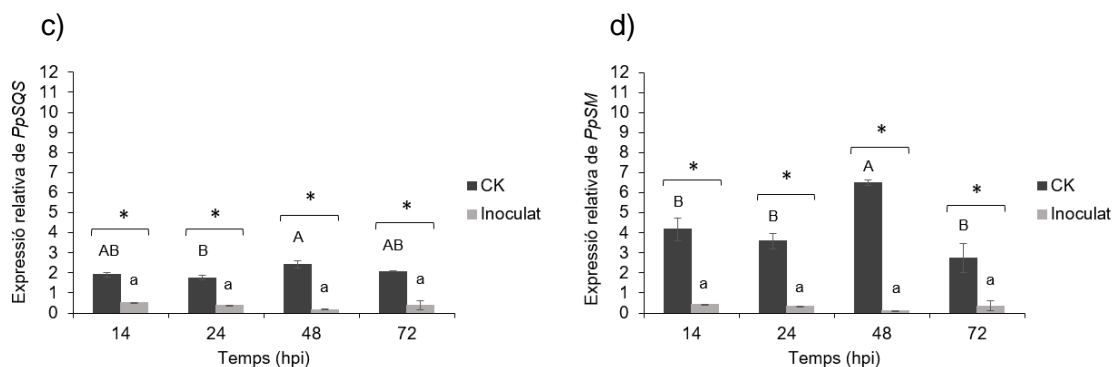


Figura 9 | Nivells d'expressió gènica relativa dels gens de biosíntesi d'esteroides (*PpSQS* i *PpSM*) normalitzats respecte els gens de referència (*PpTEF2* i *PpRPII*) en nectarines madures. Expressió de a) *PpSQS* i b) *PpSM* en nectarines 'Venus' i expressió de c) *PpSQS* i d) *PpSM* en nectarines 'Albared'. Cada columna representa la mitjana aritmètica ($n=3$) de les mostres després de 14, 24, 48 i 72 hpi i les barres verticals indiquen els errors estàndard de la mitjana. Les lletres majúscules i minúscules indiquen les diferències segons el test Tukey ($p < 0,05$) en teixit control (CK) i inoculat, respectivament, al llarg del temps. Els asteriscs (*) indiquen les diferències significatives segons el test t Student ($p < 0,05$) entre el teixit control i inoculat en cada temps.

5. DISCUSSIÓ

Aquest estudi consisteix en caracteritzar l'expressió dels gens de biosíntesi dels esteroides, *PpSQS* i *PpSM*, per determinar el paper que tenen els esteroides en la resposta de defensa de les nectarines 'Venus' i 'Albared' davant l'atac de *Monilinia laxa*.

A l'inici de l'estudi, es va observar que les nectarines madures de les varietats 'Venus' i 'Albared' van ser més susceptibles a la infecció de *M. laxa* que les nectarines immadures, especialment les de la varietat 'Venus', on no es va apreciar símptomes de la malaltia. Mari *et al.* (2003) i Guidarelli *et al.* (2014) van descriure tres i quatre etapes de desenvolupament, respectivament, amb diferent susceptibilitat del préssec a *M. laxa*. Van coincidir en què la susceptibilitat augmentava amb la maduració del fruit i els préssecs més resistents eren els immadurs, especialment, els que estaven en la fase d'enduriment de l'os. Tant en préssecs com en nectarines, aquesta fase comença a finals d'abril i s'allarga fins a principis de juny. L'augment de la susceptibilitat, en part, podria ser degut a la disminució de la fermesa i augment del contingut en sòlids solubles que es dona amb la maduració dels fruits, tal i com es va observar amb l'avaluació dels paràmetres de qualitat (Taula 1). Tot i així, en el nostre estudi, a les 48 hpi, les nectarines 'Albared' immadures van mostrar símptomes de la malaltia a la pell i a les 72 hpi ja havia penetrat a la polpa, mentre que les nectarines 'Venus' no. En base a aquests resultats, se suggereix que els metabolismes relacionats amb la resposta al patogen poden ser dependents de varietat i és per això que en aquest treball també s'avaluen les diferències entre varietats a nivell d'expressió gènica.

En un estudi transcriptòmic del patosistema nectarina-*M. laxa*, Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van observar que les vies relacionades amb la biosíntesi dels terpenoides estaven enriquides en fruita inoculada respecte fruita control i, en especial, l'enriquiment era superior en fruita immadura que no havia mostrat símptomes de malaltia que en madura que sí havia estat susceptible. Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van suggerir que l'hoste podia estar produint terpenoides en el teixit immadur per evitar l'atac fúngic o que *M. laxa* podia estar inhibint la seva biosíntesi en el teixit madur.

Donat que alguns metabòlits secundaris com els terpenoides fan funcions de defensa davant l'estrès biòtic provocat per una infecció fúngica (Bartwal *et al.* 2013), es va decidir estudiar la implicació dels gens de biosíntesi d'esteroides en aquesta resposta. Dins l'àmplia família dels terpenoides, els esteroides són un tipus de triterpenoides que formen part de la membrana cel·lular i afecten la flexibilitat d'aquesta en les cèl·lules vives (Bot 2018). Els fitosterols són una subclasse d'esteroides alcohols vegetals i

inclouen els esterols i els estanols (Bot 2018). A partir del fitosterol campesterol s'obtenen els brassinoesteroides (Ohnishi *et al.* 2006). En diversos estudis s'ha observat la implicació d'aquests terpenoides en la defensa de la planta davant l'atac fúngic. Per exemple, els triterpenoides i les lactones sesquiterpèniques aïllats de les fulles i els fruits del fals pebrell (*Schinus molle*) van mostrar activitat antifúngica *in vitro* contra diverses espècies d'*Aspergillus*, *Alternaria*, *Microsporum* i *Penicillium*, suggerint que podrien ser antifúngics naturals contra un ampli ventall de patògens (Quiroga *et al.* 2001). A més, un extracte d'escorça de caoba africana (*Khaya ivorensis*) que contenia diversos triterpens també va mostrar activitat antifúngica contra el patogen *Botrytis cinerea* (Abad *et al.* 2007), espècie de fong pertanyent a la mateixa família que *M. laxa*.

En aquest estudi es va analitzar l'expressió dels gens d'interès en base a l'expressió de gens de referència, els quals han de ser constitutius. Un gen constitutiu és aquell que codifica per una proteïna involucrada en el manteniment de les cèl·lules i, com a tal, s'expressa de forma constant en totes les cèl·lules i condicions (Eisenberg i Levanon 2013). Tong *et al.* (2009) van demostrar que *PpTEF2*, el gen que codifica pel factor 2 d'elongació de la traducció, era un gen de referència adequat, ja que la seva expressió era constant en diferents mostres de préssec i diferents estadis de la fruita. A més, Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van comprovar que en nectarines 'Venus', l'expressió de *PpTEF2* era constant als dos estadis, immadur i madur. Tot i així, en un altre estudi del grup es va veure que no era constant entre les varietats 'Venus' i 'Albared'. Per això, es va decidir utilitzar un segon gen constitutiu com a gen de referència, el *PpRP11*, que codifica per l'ARN polimerasa II i el qual Tong *et al.* (2009) també van descriure com a gen de referència per diferents mostres de préssec i diferents estadis de desenvolupament. Es va calcular l'expressió dels gens d'interès relativa a la mitjana de l'expressió gènica de *PpTEF11* i *PpRP11* com a valor de referència.

Es va comparar l'expressió dels dos gens de biosíntesi d'esteroides en els fruits control per veure com canvien segons l'estat de maduresa i la varietat (Figures 8 i 9). L'expressió de *PpSQS* en totes les condicions generalment va ser constant, mentre que la de *PpSM* va canviar en funció de la varietat i en 'Venus' també ho va fer segons l'estat de maduresa. Per tal d'estudiar la funció de l'enzim SQS, Navarro-Gallón *et al.* (2017) van silenciar mitjançant un virus el gen que codifica per les dues isoformes d'SQS en *Malus domestica*. Aquesta modificació va comportar un impacte negatiu en la síntesi dels fitosterols i, en conseqüència, es va alterar la pigmentació dels cloroplasts i el creixement de les fulles. Amb tot, van determinar que els gens relacionats amb la biosíntesi dels fitosterols s'expressen constitutivament ja que aquests compostos són essencials pel creixement i desenvolupament de les plantes. Així mateix, Sun *et al.*

(2011) van avaluar l'expressió d'SQS de *Solanum nigrum* mitjançant una RT-qPCR i van veure que s'expressava constitutivament en tots els teixits testats, sent màxima a les fulles. Així doncs, el patró d'expressió seguit per *PpSQS* en el nostre estudi, constant independentment de la condició, és el mateix que el descrit per Navarro-Gallón *et al.* (2017) i Sun *et al.* (2011) i, per tant, es podria concloure que les variacions que es veuen en l'expressió de *PpSQS* en fruita inoculada és una resposta a la infecció de *M. laxa*. Pel que fa a *PpSM*, no s'ha descrit prèviament el seu patró d'expressió en fruita sana però els nostres resultats indiquen que l'estat de maduresa i la varietat modifiquen l'expressió gènica.

En nectarines 'Venus' immadures es va produir una disminució de l'expressió de *PpSM* en el teixit inoculat respecte el control a les 24 hpi (Figura 8b), moment en què Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van destacar un enriquiment de múltiples vies metabòliques i la major inducció d'expressió gènica en nectarines 'Venus' immadures. Tot i que els dos resultats semblen indicar comportaments diferents, ja que en el primer la biosíntesi d'esteroides estaria reprimida i en el segon, potenciada, Balsells-Llauradó *et al.* (2020) van descriure un pic de biomassa fúngica a les 14 hpi i un pic de gens expressats diferencialment (DEGs) de *M. laxa* a les 24 hpi. Tot això podria indicar que la infecció fúngica inhibeix l'expressió de *PpSM*, especialment a partir de les 24 hpi. Pel que fa a *PpSQS* (Figura 8a), la seva expressió es va trobar disminuïda als últims temps, i podria ser que fos un gen d'expressió a llarg termini i comencés a inhibir-se un cop passat el pic de biomassa fúngica i de DEGs de *M. laxa*.

En fruita 'Albared' immadura, en els últims temps, l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* (Figures 8c i 8d) disminueix en la fruita inoculada amb *M. laxa* respecte la fruita control. Sembla, doncs, que es doni una inhibició de l'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides a mesura que avança la infecció fúngica. Devarenne *et al.* (2002) van comprovar que en tractar la planta *Nicotiana tabacum* amb un elicitor fúngic de *Phytophthora parasitica*, tant el nivell d'ARNm com l'activitat de l'enzim SQS disminuïa ràpidament en un 65-70 %. Aquests resultats reforcen la idea que la infecció fúngica podria inhibir l'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides.

No obstant, altres autors han reportat efectes diferents davant l'estrès biòtic i abiòtic. Per exemple, Sun *et al.* (2011) van comprovar que després del tractament amb espores de *Fusarium Oxysporum*, els nivells d'ARNm de l'enzim SQS de *Solanum nigrum* augmentaven significativament. Així mateix, davant l'estrès provocat per la salinitat, es va observar un increment en el contingut de triterpenoides i en l'expressió de gens involucrats en la producció de 2,3-epoxiesqualè (com *PpSM*) en les plantes *Kandelia*

candel i *Bruguiera gymnorrhiza* (Basyuni *et al.* 2012). A més, Tosetti *et al.* (2014) van sotmetre nectarines 'Glohaven' i 'Big Top' a l'estrès provocat per una ferida i, passat el mateix temps, les 'Big Top' tenien més bon aspecte que les 'Glohaven'. Es va detectar una sobreexpressió de *PpSM* en nectarines 'Glohaven' ferides però no en 'Big Top' ferides. Així mateix, en el *microarray* es va veure que tres gens que codifiquen per la β -amirina estaven sobreexpressats en 'Glohaven' mentre que mostraven una expressió reduïda en 'Big Top'. Per tant, tot sembla suggerir que davant l'estrès biòtic i abiòtic la planta no sempre actua de la mateixa manera. A més, seria interessant comparar els resultats amb d'altres experimentats en plantes de la família *Rosaceae* per veure si la resposta també depèn de la família i/o del gènere.

En comparar l'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides en nectarines immadures 'Venus' i 'Albared', es va veure que diferia en funció de la varietat. En nectarines 'Venus' immadures inoculades amb *M. laxa* l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* es va mantenir constant al llarg del temps, mentre que en 'Albared', l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* va disminuir a partir de les 72 hpi i 24 hpi, respectivament. Tal i com s'ha reportat prèviament, visualment, en 'Venus' no es van detectar símptomes de la malaltia però en 'Albared', a partir de les 48 hpi, es va observar penetració del fong a la superfície i, després, escampament. Aquest fet reforça la hipòtesi que l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* podria estar implicada en la resposta de defensa davant *M. laxa* i que la disminució de l'expressió en 'Albared' es podria relacionar amb la susceptibilitat observada visualment.

A nivell temporal, es va veure que en les dues varietats de nectarines immadures, l'expressió de *PpSQS* i *PpSM* es reprimia a partir de les 48 hpi i 24 hpi, respectivament. Això suggereix que la inhibició de la síntesi d'esteroides segueix un ordre cronològic dins la via de síntesi, ja que el gen *PpSQS* és un dels últims abans de la producció d'esteroides i triterpenoides.

En teixit madur, es va observar un fenotip de desenvolupament de la malaltia similar entre 'Venus' i 'Albared' i es volia comprovar si a nivell d'expressió gènica hi havia diferències entre les dues varietats per aquests gens de biosíntesi en fruita madura. L'expressió gènica (Figura 9) va ser més alta en teixits control que en teixits inoculats a tots els temps, independentment de la varietat. Aquest fet suggereix que en el teixit madur inoculat es produeix una resposta similar entre varietats, és a dir, pròpia de les nectarines. En fruita madura, el fong va augmentar el nombre de DEGs al llarg del temps d'infecció, però en els primers temps ja se'n va detectar més que en els últims temps en teixit immadur (Balsells-Llauradó *et al.* 2020). Per tant, podria ser que el fong estigués

modulant l'activitat de resposta de la fruita i inhibint l'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides.

En l'avaluació visual es va detectar que els teixits susceptibles van ser 'Albared' immadur i madur, i 'Venus' madur. A nivell d'expressió gènica, es va observar un patró similar entre el teixit de 'Venus' madur i el teixit d'Albared' immadur, ja que en els dos casos, tant l'expressió de *PpSQS* com la de *PpSM* va disminuir al llarg del temps. En canvi, en les 'Albared' madures l'expressió dels dos gens no va disminuir al llarg del temps. Això pot relacionar-se amb el fet que el fong en aquest teixit controla i inhibeix la resposta de defensa des dels primers temps d'infecció, de manera que no es veu una disminució en l'expressió al llarg del temps. O bé, en aquest estat de desenvolupament de la malaltia, la fruita 'Albared' madura ja no té mecanismes per combatre la infecció i no altera la via de biosíntesi dels esteroides.

Altres estudis indiquen una interrelació entre el metabolisme dels sesquiterpenoides i dels esteroides. Vögeli i Chappell (1988) van avaluar els nivells de sesquiterpè ciclase i esqualè sintasa en cèl·lules de tabac tractades amb un elicitor fúngic preparat a partir de paret cel·lular de *Phytophthora parasitica*. Després del tractament, va augmentar considerablement l'activitat de la sesquiterpè ciclase i la concentració dels sesquiterpenoides. En canvi, va disminuir l'activitat de l'esqualè sintasa i, per tant, la concentració d'esterols, fins a un 10 % del contingut inicial. A més, Zook i Kuć (1991) van estudiar la inducció de la sesquiterpè ciclase i la supressió de l'esqualè sintasa en cèl·lules de patata tractades amb àcid araquidònic extret de *Phytophthora infestans*. Després del tractament, es va produir un increment de l'activitat de la sesquiterpè ciclase i de la concentració dels sesquiterpenoides rishitina i lubimina. En canvi, l'activitat de l'esqualè sintasa va augmentar en tractar les cèl·lules amb aigua i va disminuir en tractar-les amb l'elicitor. Per tant, davant l'estimulació fúngica, la concentració d'esterols va disminuir en aquells estudis. No hi ha estudis més recents sobre la interacció entre els dos metabolismes però els resultats d'aquests coincideixen amb els obtinguts en el nostre assaig: la inoculació de *M. laxa* va provocar una disminució de l'expressió de *PpSQS*.

Així doncs, en els estudis revisats s'obtenen diferents respostes sobre l'alteració de la ruta de síntesi dels esteroides davant l'atac fúngic. En alguns se suggereix que l'hoste produeix terpenoides per defensar-se de l'atac fúngic (Balsells-Llauradó *et al.* 2020), mentre que en altres se suggereix que el fong podria estar inhibint la síntesi d'alguns terpenoides (Vögeli i Chappell 1988; Zook i Kuć 1991). Aquest seria un possible raonament dels resultats obtinguts en el nostre estudi.

6. CONCLUSIONS

En aquest estudi s'ha analitzat l'expressió dels gens de biosíntesi dels esteroides en *Prunus persica* (*PpSQS* i *PpSM*) durant la interacció nectarina-*Monilinia laxa*. S'ha comparat l'expressió en dues varietats de nectarina ('Venus' i 'Albared') i en dos estats de maduresa diferents. Visualment es va detectar que les nectarines madures de les dues varietats eren més susceptibles a la infecció fúngica que les nectarines immadures, i en estat immadur, les nectarines 'Albared' eren més susceptibles que les 'Venus'. En base a això se suggereix que la resposta a l'atac fúngic pot ser dependent de varietat. En l'anàlisi dels gens d'interès, es van observar diferències en l'expressió gènica entre estats de maduresa i varietats. En fruita 'Venus' immadura, la inhibició de l'expressió de *PpSM* en fruita inoculada amb *M. laxa* respecte fruita control va tenir lloc abans que la inhibició de l'expressió de *PpSQS*, cosa que suggereix que els dos gens s'inhibeixen en diferents estats de desenvolupament de la malaltia. En fruita 'Albared' immadura, també va tenir lloc abans la inhibició de l'expressió de *PpSM* que de *PpSQS* en fruita inoculada respecte fruita control. A més, en fruita inoculada, l'expressió dels gens de biosíntesi d'esteroides va disminuir al llarg del temps, cosa que no va ocórrer en nectarines 'Venus' immadures. Aquest resultat es podria relacionar amb la susceptibilitat observada visualment en nectarines 'Albared' immadures però no en nectarines 'Venus' immadures. En fruita madura es va observar un fenotip i un patró d'expressió gènica similar entre varietats. Coincidint amb un augment notable de gens expressats diferencialment (DEGs) del fong, se suggereix que en aquest estat de maduresa el fong podria estar inhibint des del primer temps l'expressió dels gens d'interès. Malgrat alguns autors suggereixen que l'hoste produeix terpenoides per defensar-se de l'atac fúngic, d'altres proposen una inhibició de la síntesi d'aquestes molècules provocada pel fong, i aquesta podria ser una explicació pels resultats obtinguts en aquest estudi.

Els propers estudis es podrien centrar en continuar caracteritzant la via dels terpenoides per tenir una visió global d'aquest metabolisme en les respostes de defensa en front un patògen de postcollita. A més, també es podria detectar i avaluar la presència dels terpenoides volàtils en les mostres analitzades en aquest treball. És a dir, de nectarina immadura i madura, de les varietats 'Venus' i 'Albared', i inoculada amb *Monilinia laxa* i control. Això permetria comprovar si l'alteració en la via de biosíntesi dels esteroides en resposta a l'atac fúngic varia la formació i l'alliberament dels esteroides de la nectarina.

7. AUTOAVALUACIÓ

Aquest treball ha estat elaborat a partir dels resultats obtinguts durant les pràctiques extracurriculars de l'estiu 2019 i les pràctiques curriculars de l'estiu 2020 a l'IRTA Fruitcentre de Lleida. En aquest centre es fan molts assajos amb fruita de pinyol, la collita de la qual es du a terme durant els mesos d'estiu. Per tant, durant les meves dues estades a l'IRTA he col·laborat en molts assajos *in vivo* i he realitzat tasques molt diverses, des de la collita de la fruita fins l'anàlisi de l'expressió gènica, passant per tots els processos intermedis. Això m'ha permès participar en tots els passos descrits en materials i mètodes del meu Treball de Final de Grau (TFG).

El principal objectiu del TFG és acreditar que he adquirit les competències associades al títol de Biotecnologia i considero que així ha estat. Durant l'elaboració del treball he fet una cerca bibliogràfica sobre el paper dels terpenoides i l'alteració de la via de síntesi dels esteroides davant l'atac fúngic, especialment, davant *Monilinia* spp. Per fer-ho, he accedit a bases de dades com NCBI i WOS, i he seleccionat i sintetitzat la informació adequada pel treball. Sense els coneixements bàsics de les assignatures de Biologia vegetal i animal, Metabolisme vegetal, Microbiologia i Biotecnologia molecular vegetal i animal m'hagués resultat més difícil comprendre els articles consultats. A més, en l'apartat de materials i mètodes, he descrit els procediments que al seu dia em vaig anotar a la llibreta de laboratori tal i com he anat aprenent al llarg de les pràctiques del grau. Per analitzar els resultats he recorregut als fonaments d'estadística i, en la discussió d'aquests, ha estat molt important la comprensió del tema, el punt de vista crític que he anat assolint en diverses assignatures i, sobretot, la comunicació amb els investigadors de l'IRTA. Especialment, aquest últim punt ha estat fonamental en el meu treball perquè els resultats obtinguts no han estat els que esperàvem inicialment. Això m'ha fet buscar altres possibilitats per explicar què podia estar passant en cada cas.

Per tot el que he descrit valoro molt positivament la formació adquirida durant l'elaboració d'aquest treball ja que considero que ha complementat i posat en pràctica diversos coneixements que havia estudiat únicament a nivell conceptual.

8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Abad, M.J., Ansuategui, M., Bermejo, P. (2007) 'Active antifungal substances from natural sources', *Arkivoc*, 2007(7), 116-145.
- Agarose gel electrophoresis of RNA* (n.d.) Thermo Fisher Scientific, disponible: <https://www.thermofisher.com/ie/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html> [accedit 15 abr 2021].
- Balsells-Llauradó, M., Silva, C.J., Usall, J., Vall-llaura, N., Serrano-Prieto, S., Teixidó, N., Mesquida-Pesci, S.D., de Cal, A., Blanco-Ulate, B., Torres, R. (2020) 'Depicting the battle between nectarine and *Monilinia laxa*: the fruit developmental stage dictates the effectiveness of the host defenses and the pathogen's infection strategies', *Horticulture Research*, 7(1).
- Baró-Montel, N. (2019) *Noves aproximacions en els estudis d'interacció de fruita de pinyol i Monilinia spp. per al control sostenible de la podridura marró* (tesi doctoral), Universitat de Lleida.
- Baró-Montel, N., Vall-llaura, N., Giné-Bordonaba, J., Usall, J., Serrano-Prieto, S., Teixidó, N., Torres, R. (2019a) 'Double-sided battle: the role of ethylene during *Monilinia* spp. infection in peach at different phenological stages', *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 324-333.
- Baró-Montel, N., Vall-llaura, N., Usall, J., Teixidó, N., Naranjo-Ortíz, M.A., Gabaldón, T., Torres, R. (2019b) 'Pectin methyl esterases and rhamnogalacturonan hydrolases: weapons for successful *Monilinia laxa* infection in stone fruit?', *Plant Pathology*, 68(7), 1381-93.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., Arora, S. (2013) 'Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses', *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 216-232.
- Basyuni, M., Baba, S., Kinjo, Y., Putri, L.A.P., Hakim, L., Oku, H. (2012) 'Salt-dependent increase in triterpenoids is reversible upon transfer to fresh water in mangrove plants *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*', *Journal of Plant Physiology*, 169(18), 1903-1908.
- Bostock, R.M., Wilcox, S.M., Wang, G., Adaskaveg, J.E. (1999) 'Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(1-2), 37-50.

- Bot, A. (2018) 'Phytosterols', *Encyclopedia of Food Chemistry*, 225-228.
- Byrde, R.J.W., Willetts, H.J. (1977) *The brown rot fungi of fruit: their biology and control*, Pergamon Press.
- Casals, C., Vinas, I., Torres, R., Grieria, C., Usall, J. (2010) 'Effect of temperature and water activity on *in vitro* germination of *Monilinia* spp.', *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 47-54.
- Cepin, U. (2017) *Understanding qPCR efficiency and why it exceeds 100 %*, BioSistemika, disponible: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/> [accedit 10 abr 2021].
- Chou, C.M., Yu, F.Y., Yu, P.L., Ho, J.F., Bostock, R.M., Chung, K.R., Huang, J.W., Lee, M.H. (2015) 'Expression of five endopolygalacturonase genes and demonstration that *MfPG1* overexpression diminishes virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*', *PLOS ONE*, 10(6), 1-17.
- De Cal, A., Melgarejo, P. (1993) 'Effects of pyroquilon on the infection process of *Monilinia laxa* causing peach twig blight', *Pesticide Science*, 39(4), 267-269.
- De Cal, A., Sandín-España, P., Martínez, F., Egüen, B., Chien-Ming, C., Lee, M.H., 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.
- Devarenne, T.P., Ghosh, A., Chappell, J. (2002) 'Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco', *Plant Physiology*, 129(3), 1095-1106.
- Efficiency of Real-Time PCR* (n.d.) Thermo Fisher Scientific, disponible: <https://www.thermofisher.com/ie/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html> [accedit 10 abr 2021].
- Eisenberg, E., Levanon, E.Y. (2013) 'Human housekeeping genes, revisited', *Trends in Genetics*, 29(10), 569-574.
- EFSA (2011) 'Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options', *EFSA Journal*, 9(4).
- FAOSTAT. Database of Food and Agriculture Organization of the United Nations (n.d.) disponible: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [accedit 24 feb 2021].
- García-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.
- Glazebrook, J. (2005) 'Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205-227.
- Guidarelli, M., Zubini, P., Nanni, V., Bonghi, C., Rasori, A., Bertolini, P., Baraldi, E. (2014) 'Gene expression analysis of peach fruit at different growth stages and with different susceptibility to *Monilinia laxa*', *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 503-513.
- Holst-Jensen, A., Kohn, L.M., Jakobsen, K.S., Schumacher, T. (1997) 'Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*) based on coding and noncoding run a sequences', *American Journal of Botany*, 84(5), 686-701.
- Invitrogen (2017) *1 Kb Plus DNA Ladder*, Product information sheet nº MAN0000898, Thermo Fisher Scientific.
- Lagaert, S., Beliën, T., Volckaert, G. (2009) 'Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(9), 1064-1073.
- Lange, B.M., Ghassemian, M. (2003) 'Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism', *Plant Molecular Biology*, 51(6), 925-948.
- Lee, M.H., Bostock, R.M. (2007) 'Fruit exocarp phenols in relation to quiescence and development of *Monilinia fructicola* infections in *Prunus* spp.: a role for cellular redox?', *Phytopathology*, 97(3), 269-277.
- Lee, M.H., Chlu, C.M., Roubtsova, T., Chou, C.M., Bostock, R.M. (2010) 'Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, *MfCUTI*, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp.', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 176-186.
- Lino, L.O., Quilot-Turion, B., Dufour, C., Corre, M.N., Lessire, R., Génard, M., Poëssel, J.L. (2020) 'Cuticular waxes of nectarines during fruit development in relation to surface conductance and susceptibility to *Monilinia laxa*', *Journal of Experimental Botany*, 71(18), 5521-5537.
- Martini, C., Mari, M. (2014) '*Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia* Rot, Brown Rot)', *Postharvest decay: control strategies*, Academic Press.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z. (2002) 'Short technical report processing of gene expression data generated', *Gene Expression*, 32(6), 1372-

1379.

- NanoDrop (2007) *260/280 and 260/230 ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-sample spectrophotometers*. Technical support bulletin n° T009.
- Navarro Gallón, S.M., Elejalde-Palmett, C., Daudu, D., Liesecke, F., Jullien, F., Papon, N., Dugé de Bernonville, T., Courdavault, V., Lanoue, A., Oudin, A., Glévarec, G., Pichon, O., Clastre, M., St-Pierre, B., Atehortúa, L., Yoshikawa, N., Giglioli-Guivarc'h, N. (2017) 'Virus-induced gene silencing of the two squalene synthase isoforms of apple tree (*Malus x domestica* L.) negatively impacts phytosterol biosynthesis, plastid pigmentation and leaf growth', *Planta*, 246(1), 45-60.
- Noda, J., Brito, N., González, C. (2010) 'The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity', *BMC Plant Biology*, 10.
- Ohnishi, T., Szatmari, A.M., Watanabe, B., Fujita, S., Bancos, S., Koncz, C., Lafos, M., Shibata, K., Yokota, T., Sakata, K., Szekeres, M., Mizutani, M. (2006) 'C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis', *Plant Cell*, 18(11), 3275-3288.
- 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 Chemistry*, 64(20), 4029-4047.
- Pandey, D., Rajendran, S.R.C.K., Gaur, M., Sajeesh, P.K., Kumar, A. (2016) 'Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens', *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1159-1174.
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2001) 'Screening antifungal activities of selected medicinal plants', *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1), 89-96.
- Real-Time PCR: understanding Ct* (n.d.) Thermo Fisher Scientific, disponible: <https://www.thermofisher.com/ie/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> [accedit 22 març 2021].
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., Espeso, E.A. (2020) 'Proteomic studies to understand the mechanisms of peach tissue degradation by *Monilinia laxa*', *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-12.
- Rungjindamai, N., Jeffries, P., Xu, X. M. (2014) 'Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*', *European Journal of Plant Pathology*, 140(1), 1-17.

- Sun, Y., Zhao, Y., Wang, L., Lou, H., Cheng, A. (2011) 'Cloning and expression analysis of squalene synthase, a key enzyme involved in antifungal steroidal glycoalkaloids biosynthesis from *Solanum nigrum*', *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(5), 242-248.
- Tholl, D. (2015) 'Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants', *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, 63-106.
- Tian, S., Torres, R., Ballester, A.R., Li, B., Vilanova, L., González-Candelas, L. (2016) 'Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: virulence and resistance', *Postharvest Biology and Technology*, 122, 11-21.
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., Zhang, Z. (2009) 'Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR', *BMC Molecular Biology*, 10(1), 1-13.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) 'Reactive oxygen species signaling in response to pathogens', 141(2), 373-378.
- 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.
- Vögeli, U., Chappell, J. (1988) 'Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor', *Plant Physiology*, 88(4), 1291-1296.
- Wang, G.Y., Michailides, T.J., Hammock, B.D., Lee, Y.M., Bostock, R.M. (2000) 'Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1), 31-38.
- Whetzel, H.H. (1945) 'A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate *Discomycetes*', *Mycologia*, 37(6), 648-714.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C. (2013) 'The formation and function of plant cuticles', *Plant Physiology*, 163(1), 5-20.
- Zipfel, C. (2014) 'Plant pattern-recognition receptors', *Trends in Immunology*, 35(7), 345-351.
- Zook, M.N., Kuć, J.A. (1991) 'Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activity in elicitor-treated or fungal-infected potato tuber tissue', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(5), 377-390.