

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: Resposta molecular de presseguer a l'aplicació de pèptids elicitors de defenses

Document: Memòria treball experimental de recerca

Alumne: Clàudia Ribas i Verdaguer

Tutor: Anna Nadal i Matamala

Departament: EQATA

Àrea: Tecnologia dels Aliments

Convocatòria (mes/any): Juny 2018

ÍNDEX

RESUM	3
PARAULES CLAU	6
AGRAÏMENTS	7
1. INTRODUCCIÓ	8
1.1 Els fruiters del gènere <i>Prunus</i>	8
1.2 Taca bacteriana causada per <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	9
1.2.1 Descripció del patogen i espècies afectades	10
1.2.2 Simptomatologia.....	10
1.2.3 Situació a Europa i epidemiologia.....	11
1.2.4 Conseqüències econòmiques	12
1.2.5 Prevenció i mètodes actuals de lluita	13
1.3 Noves estratègies de control de la malaltia	13
1.4 Mecanismes de defensa de les plantes	15
1.4.1 Mecanismes de detecció de patògens.....	15
1.4.2 Molècules inductores de la PTI.....	16
1.5 Els pèptids elicitors endògens (Peps).....	16
1.5.1 Interacció amb receptors de membrana (PEPR) i l'activació de PTI.....	17
1.6 MAPK i les seves fosforilacions	18
2. ANTECEDENTS DEL GRUP DE RECERCA	20
3. OBJECTIUS	22
4. MATERIALS I MÈTODES	23
4.1 Disseny i assaig experimental	24
4.2 Material vegetal	25
4.3 Extracció de proteïnes.....	26
4.4 Quantificació pel mètode Bradford	27
4.5 Detecció i quantificació de MAPK: Mètode Western Blot	30
4.5.1 Electroforesi SDS-Page.....	31
4.5.2 Transferència de proteïnes a la membrana.....	33
4.5.3 Detecció de les MAPK	33
4.5.4 Revelat	35

4.5.5 Stripping.....	36
4.6 ImageJ.....	37
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	38
5.1 Extracció proteïna i quantificació pel mètode Bradford.....	38
5.2 Western Blot.....	40
6. APLICABILITAT.....	45
7. CONCLUSIONS.....	46
8. BIBLIOGRAFIA	47

RESUM

El cultiu de presseguer (*Prunus persica*), d'entre els arbres fruiters, és un dels més importants tant a nivell mundial com en l'àmbit local. A nivell europeu, esdevé un dels cultius més productius i amb un gran interès econòmic a tot Europa amb una gran representació en el sector, amb diferència, a Espanya i Itàlia, segon i tercer productors de préssec a nivell mundial respectivament. Aquesta ubicació geogràfica del cultiu a Europa ve donada per la climatologia: temperatures altes a l'estiu però amb uns mínims requeriments de fred a l'hivern. Aquestes condicions són idònies perquè els fruits del presseguer puguin madurar a l'estiu. Espanya i Itàlia es converteixen doncs, en grans productors d'aquesta fruita dolça. A Catalunya representa un 38% del total de la producció estatal, seguit per Aragó i Múrcia. Lleida esdevé la província amb major superfície total plantada, seguida per Tarragona, Girona i Barcelona.

Analitzant l'evolució del cultiu en els darrers anys s'observa una lleugera tendència a incrementar-se. Els factors que justifiquen l'augment en la producció dels cultius de *Prunus spp* són, entre d'altres: un avenç tecnològic i una millora de les metodologies agròniques que ha permès als agricultors incrementar la seva producció. A més a més, ens els darrers anys, la tendència d'hàbits saludables entre els consumidors ha comportat una demanda d'aliments de fruits d'os, com ara el préssec que confereix compostos biològicament actius: antioxidants i rics en omega-3. La producció de préssec mereix l'estudi i dedicació de tots els sectors implicats en la seva producció i comercialització per a una millora continua d'aquest cultiu.

Actualment existeix un llistat extens de plagues i malalties que afecten als fruiters de pinyol. Existeix, però, un patògen en concret que s'ha reconegut com un dels més importants en l'última dècada i un dels que genera més preocupació per l'augment de brots: es tracta de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap), causant de la taca bacteriana i classificat com un patògen de quarantena a Europa. Actualment el bacteri es troba present als cinc continents. Concretament a Europa es considera establert a Itàlia, França, països de l'est i des de l'any 2002 també a Espanya. La susceptibilitat a la taca bacteriana es deu a una combinació de les espècies, varietats i de les condicions climàtiques de la zona. Les condicions ambientals idònies pel desenvolupament de Xap són les temperatures elevades (19-28°C), pluges freqüents, rosades i calamarses afavorint un desenvolupament ràpid de la malaltia. Algunes zones que s'adapten a aquests factors climàtics trobaríem EEUU, Xina i Uruguay, però també el sud de França, Catalunya i els Balcans.

La Xap afecta totes les espècies del gènere *Prunus*, especialment els presseguers, albercoquers, cirerers japonesos i també als ametllers, cirerers europeus i pruneres. Els símptomes són compartits entre les diferents espècies en qüestió. Tant les parts herbàcies (fulles, brots, brots joves, fruits i closca del fruit) com les llenyoses (tronc principal i branques) de la planta poden veure's afectades per la malaltia. A llarg termini, la malaltia acaba alterant la funció dels teixits i causant un debilitament progressiu de l'arbre. La propagació de bacteris fitopatògens com la Xap es pot produir a través de múltiples vies de difusió.

Les pràctiques culturals com les podes i empelts, a més dels vectors com ara àcars i insectes, el vent o la pluja esdevenen la font principal de difusió local. En canvi, com a principals fonts de transferència del patògen a llarga distància trobem el comerç regional, nacional i continental de material vegetal, a més, aquest bacteri és capaç d'infectar la fruita, convertint-se en un altre vector degut a la seva comercialització entre països. Aquests mecanismes de propagació i els seus cicles de vida relativament llargs de cultiu proporcionen un nínxol per a la supervivència i multiplicació d'aquest patògen.

La gestió de la taca bacteriana resulta complicada degut a les limitacions a l'hora de preveure-la i d'eradicar-la i actualment no s'han trobat mètodes curatius que siguin realment eficaços per lluitar contra aquesta malaltia. Fins al moment, no s'ha establert quina és la interacció que hi ha entre els diferents factors de risc que determinen la incidència de la taca bacteriana. Esdevé difícil, doncs, establir un model de predicció realment eficaç. Els tractaments actuals representen pràctiques tradicionals molt agressives amb el medi ambient, com ara tractaments amb compostos basats en coure i d'antibiòtics, entre d'altres. La tendència de la UE és avançar cap a una agricultura cada vegada més sostenible amb l'objectiu de conservar els recursos naturals, reduir les emissions de gasos d'efecte hivernacle, aturar la pèrdua de biodiversitat i preservar els paisatges.

Així doncs, amb l'objectiu de buscar noves alternatives per al control de la malaltia, i intentant que aquestes s'integrin al màxim amb el model d'agricultura sostenible que la UE demana, una estratègia innovadora consisteix en l'estimulació de defenses de les plantes. Actualment en el mercat es poden trobar diversos tipus de productes que treballen amb aquesta tecnologia.

En aquest treball es pretén conduir la investigació en aquesta direcció, aportant alternatives més sostenibles, a fi de potenciar el sistema immunitari de la planta, mitjançant l'ús d'estimuladors naturals que posseeixen les plantes i que intervien directament en el seu sistema de defensa. Les plantes perceben molècules químicament diverses provinents de bacteris, fongs, virus o herbívors (patògens associats a patrons moleculars) a través de receptors específics de membrana, iniciant un conjunt de respostes de defensa conegudes com a immunitat modelada. A través d'una consecució de cadenes de transmissió i amplificació de la senyal activen un conjunt de processos i indueixen la síntesi de gens de defensa per a combatre la malaltia.

El treball esdevé una continuació de la tesi de la Cristina Ruiz sobre l'estudi d'estratègies noves de control de malalties a través de noves molècules (concretament pèptids) aplicats com a estimuladors de defensa per a controlar *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Els pèptids (Peps) són una seqüència de 23 a 29 aminoàcids codificats a l'extrem C-terminal de les seves corresponents proteïnes precursors anomenades PROPEPs. La producció de Peps ve regulada per la mateixa planta hoste davant d'una situació de risc i esdevenen essencials en els estadis inicials de la resposta de defensa de les plantes davant l'atac de diversos patògens: bacteris, fongs o herbívors. Una vegada sintetitzats per la pròpia planta, els Peps surten de la cèl·lula i interaccionen amb receptors de membrana (PEPR) específics, amplificant així el sistema de defensa de les plantes. La interacció Pep-PEPR és específica a nivell de família, especificitat que també s'ha demostrat en el cas de les Rosàcies.

Si bé el grup ha demostrat en estudis previs que els Peps endògens de presseguers aplicats de manera tòpica en fulles de presseguer controlen la malaltia, actualment considera interessant la opció de modificar la seqüència dels Peps naturals per tal d'obtenir-ne d'altres amb activitat millorada. Ara bé, una modificació de la seqüència del Pep però pot comportar una pèrdua de la capacitat d'activació de defenses, degut a que no sigui reconegut pel PEPR de membrana.

En aquest treball s'han posat a punt dues plataformes de criba de Peps, ambdues basades en fulles de presseguer com a material vegetal, però assajades de manera diferent, *ex vivo* i *in planta*. Per a posar a punt les plataformes s'han utilitzat els Peps endògens de presseguer, PpPep1 i PpPep2.

En els últims anys s'ha demostrat que una de les vies de transducció del senyal vegetal durant l'activació de les defenses de les plantes és la cascada de proteïnes MAPK. L'activació d'aquesta via esdevé una de les primeres accions que succeeixen quan interacciona el PEPR amb els Peps. Recentment s'ha demostrat amb la planta model *Arabidopsis*, que després de l'aplicació de AtPep1 en fulles, s'activen un seguit de cascades de fosforilacions. Entre les proteïnes fosforilades es troben les MAPK3/1. L'objecte concret d'aquest projecte rau doncs, en determinar la presència de proteïnes fosforilades MAPK com a indicadores de la transmissió i amplificació de la senyal de la immunitat innata de la pròpia planta i relacionar el grau de fosforilació amb la funcionalitat del pèptid.

La idea del grup de recerca és utilitzar aquesta plataforma per a la selecció de pèptids elicitors millorats per tal de provar-los posteriorment en assajos d'infecció i utilitzar-los, en un futur, com a producte fitosanitari, alternatiu o complementari als tractaments actuals.

PARAULES CLAU

Prunus persica

Xanthomonas arboricola pv. *pruni*

Estimulador de defenses

Plataforma de criba

Pèptid elicitor

MAPK

Fosforilació

Western Blot

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat realitzat amb el suport de les persones integrants del grup de TA de l'INTEA. En primer lloc vull agrair a la Dra. Anna Nadal i a la Dra. Maria Pla per haver-me donat l'oportunitat de realitzar el treball final de grau en el seu grup de recerca, on m'han ofert tot el seu suport, disposició, coneixements i dedicació. I en especial a l'Anna, per haver acceptat tutoritzar-me el treball i per la seva ajuda incondicional en tot moment.

També haig d'agrair a la Laura Foix tota la seva ajuda al llarg de l'estada al grup. Gràcies per la seva implicació i temps que m'ha dedicat durant aquests mesos. Ha esdevingut un exemple de rigor, treball i constància a seguir.

Per últim, donar les gràcies a tota la meva família i a l'Alba, pel suport indispensable que m'han donat sempre, la seva comprensió i recolzament en totes les decisions preses.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Els fruiters del gènere *Prunus*

El presseguer (*Prunus persica*) és un arbre fruiter de fulla caduca, de la categoria de fruita de pinyol i pertany a la família de les Rosàcies. Aquesta família comprèn al voltant de 100 gèneres i més de 3.000 espècies (comestibles i ornamentals) àmpliament distribuïdes per totes les parts del món, amb major presència a les regions temperades i amb gran interès econòmic entre els quals podem trobar: pomers, perers, presseguers, cirerers, ametllers, etc. En el cultiu, de les espècies comestibles els gèneres que més es comercialitzen són: *Malus*, *Prunus* i *Pyrus* (Sánchez 2012).

Originari de Xina i cultivat a Pèrsia, *Prunus persica* va ser introduït a Europa en l'època dels romans, després d'haver augmentat la qualitat dels seus fruits mitjançant encreuaments (Westwood 1993). Actualment esdevé un dels cultius més productius a Europa amb una gran representació en el sector amb una producció de 4 milions de tones (Mt), situant-se en tercer lloc, darrera del cultiu de poma (12,5 Mt) i taronja (6 Mt) (FAOSTAT 2016). Els països que cultiven més aquest fruit són, amb diferència, Espanya (1,5 Mt) i Itàlia (1,4 Mt). A més a més, esdevenen el segon i tercer productors de préssecs a nivell mundial respectivament, essent la Xina el primer productor mundial (14,5 Mt) (FAOSTAT 2016).

El presseguer és un tipus d'arbre fruiter que es cultiva en unes condicions climatològiques força concretes, ja que necessita temperatures fredes a l'hivern, condicions que les zones subtropicals no compleixen; a l'estiu, per contra, requereix temperatures altes perquè es pugui produir la maduració dels seus fruits. Així doncs, la ubicació geogràfica del cultiu ve determinada per la climatologia més favorable pel seu desenvolupament, esdevenint els països de la conca mediterrània les regions productores de préssec a nivell europeu.

Morfològicament esdevé un arbre petit caducifoli que sovint no sobrepassa la mida arbustiva, amb l'escorça llisa que es desprèn en làmines. La seva vida és relativament curta, fins un màxim de 30 anys, que dura en cultius comercials solament uns 12 a 15 anys, iniciant la producció del fruit en el segon o en el tercer any.

Entre les Rosàcies, els gèneres *Malus*, *Pyrus* i *Prunus* es caracteritzen per produir fruit. Els fruits es poden consumir de diverses maneres incloent en fresc, assecat, en suc i a partir de productes processats. La importància econòmica dels cultius comestibles de Rosàcies rau en la varietat de sabors, textures i nivells de dolçor i acidesa associats que satisfan la diversitat de gustos i preferències dels consumidors.

Centrant-nos en el cultiu del presseguer i el valor nutricional del seu fruit, podem remarcar que el préssec esdevé una font de fibra, potassi, vitamina C i carotenoides. Contenen una barreja d'ambdós tipus de fibra (amb predomini de la insoluble) que millora el trànsit intestinal, evitant el restrenyiment i protegeix enfront el càncer de colon i les malalties cardiovasculars.

Aporten petites quantitats de vitamines, entre les quals destaca la vitamina C (amb un préssec cobrim més del 20% de les ingestes diàries recomanades de la vitamina) i proporcions moderades de carotenoides amb activitat provitamínica A com α -carotens, β -carotens i criptoxantina i altres carotenoides com luteïna i zeaxantina. En particular, l'antioxidant β -carotè és el responsable de donar la coloració ataronjada al fruit (FEN 2017).

En els últims 15 anys la producció dels cultius de *Prunus spp* s'ha duplicat (Iglesias 2012). L'augment es podria justificar per diferents factors, primerament per un avenç tecnològic i una millora de les metodologies agronòmiques que han permès als agricultors incrementar la seva producció i, per altra banda, la introducció de noves varietats i finalment per la consciència social dels consumidors en referència a la salut fets que han comportat que, en els darrers anys, les demandes de productes amb compostos biològicament actius, com ara fruits d'os i les nous, entre d'altres, no deixin d'incrementar anualment.

Resulta evident, doncs, la importància i repercussió econòmica del cultiu de presseguer. En conseqüència, els problemes que sorgeixen en les produccions de cada temporada originen pèrdues econòmiques importants en el sector.

Existeixen diverses causes que poden provocar la pèrdua de les collites anuals. Per una banda hi ha les fisiopaties relacionades amb els factors ambientals i meteorològics, com ara l'excés o manca d'aigua i nutrients o les granissades. Per altra banda, les incorrectes manipulacions post-collita provoquen la pèrdua del 10-20% de la producció tenint en compte que Espanya és un país amb un índex d'exportació molt considerable. Un altre punt important són les plagues i malalties que afecten als fruiters de pinyol.

Aquest grup conforma una llista extensa de patògens/insectes entre els quals s'hi inclouen la mosca de la fruita (*Ceratitis capitata*), fongs del gènere *Monilia* i el pugó (Generalitat de Catalunya 2015). Una altra malaltia que pot causar pèrdues importants és la taca bacteriana, causada per *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), un bacteri de quarantena a Europa (Boudon *et al.* 2005).

1.2 Taca bacteriana causada per *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

La taca bacteriana va ser descrita per primera vegada a Michigan (E.E.U.U) l'any 1903 en una varietat japonesa de prunera. Aquesta malaltia es va introduir a Europa l'any 1933, on va ser primerament descrita a Itàlia. En tres anys, del 1998 al 2001, es van passar de 5 casos en cultius de presseguers a descriure'n fins a 550, indicant una ràpida extensió del patogen (Aarrouf *et al.* 2008).

1.2.1 Descripció del patogen i espècies afectades

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* és un bacteri Gram-negatiu, flagel·lat, no formador d'espores, que pertany a la classe dels gammaproteobacteris (EFSA 2014). És aerobi estricte i quimio-organoheteròtrof amb un rang de temperatura de creixement òptim de 24-29° C. Produeix pigment groc característic (xanthomonadina) i polisacàrids extracel·lulars (Bassi & Monet 2008).

Està descrit com un bacteri patogen dels òrgans aeris capaç de desenvolupar-se sobre fulles dels vegetals que parasita. Està considerat com a patogen de quarantena a la Unió Europea.

El patogen afecta sobretot a les espècies *Prunus* spp., especialment ametller, presseguer, nectariner, cirerer, prunera, albercoquer; *P. salicina* i espècies exòtiques com *P. davidiana* i *P. lauroceasus*. Els híbrids de *P. japonica* i *P. salicina* són generalment més susceptibles que les pruneres europees.

1.2.2 Simptomatologia

Els símptomes són similars en totes les espècies i poden ser confosos amb els causats per altres bacteris, fongs, fitotoxicitat o calamarsa. Si concorren condicions meteorològiques favorables per al bacteri, cap varietat es mostra resistent. No obstant això, hi ha una marcada diferència de sensibilitat, fent possible trobar varietats molt afectades al costat d'altres amb símptomes molt lleus. Per tant, els danys varien segons l'espècie, la varietat i les condicions meteorològiques. També són freqüents les infeccions latents (arbres infectats que no mostren símptomes) (Palacio-Bielsa *et al.* 2010).

Al tractar-se d'un patogen de quarantena, la legislació obliga a comunicar al Centre de Protecció Vegetal la presència de símptomes sospitosos de la malaltia.

Els símptomes apareixen primer a les fulles i després poden fer-ho en les branques i en els fruits, com es pot observar en la figura 1. Pot produir pèrdues importants, no només perquè els fruits afectats no tenen valor comercial sinó perquè pot provocar importants defoliacions, que debiliten la planta i disminueixen progressivament la seva productivitat.

En les **fulles** (A), es manifesta com unes petites taques poligonals delimitades pels nervis secundaris d' 1 a 5 mm de diàmetre, visibles tant pel feix com en el revés, envoltades d'un halo groguenc. En ocasions es concentren al llarg del nervi central i molt freqüentment en l'àpex de la fulla (punt de degoteig de l'aigua de pluja i dels tractaments fitosanitaris), tornant-se necroses. El centre de la taca pot assecar-se i es desprèn (cribat), les fulles s'esgrogueeixen (comença per la punta) i cauen prematurament, podent produir una gran defoliació (DAAM 2009). Les infeccions foliars severes en última instància, redueixen el rendiment a causa de la menor capacitat fotosintètica i la captació d'hidrats de carboni (Crisosto *et al.* 2003).

Els símptomes en les **branques** (B) no són tan freqüents a Europa com als observats en altres països (EE. UU. i Austràlia). En presseguer es poden presentar com a (DAAM 2009):

- Xancres de primavera: petites ampelles aquoses enfosquides quan surten les fulles i amb un halo verdós, que poden envoltar el branquilló produint-li la mort.

- Xanques d'estiu: es veuen com a taques roges més o menys enfonsades a la base de les insercions foliars que al pas del temps es tornen necroses.

En els **fruits** (C), els primers símptomes solen aparèixer entre 3 a 5 setmanes després de la caiguda de pètals en forma de petites taques de color verd clar i d'aspecte aquós. Apareixen petites taques, envoltades d'halo groc, que es necrosen amb el temps. En ocasions, les lesions prenen forma d'estrella i es poden combinar entre elles (DAAM 2009).

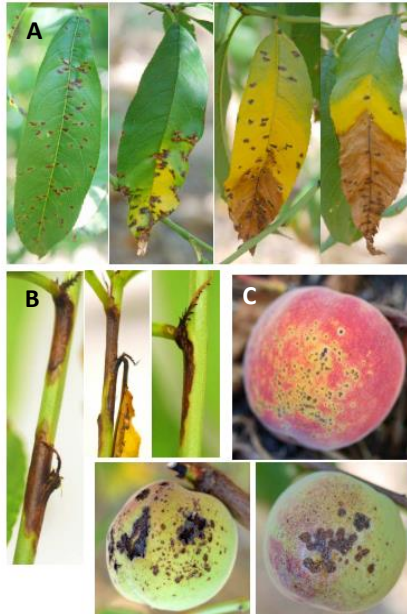


Figura 1. *Xap* en presseguer, símptomes típics en fulles, fruits i branques (Centre de Protecció Vegetal de Zaragoza, 2009)

1.2.3 Situació a Europa i epidemiologia

La distribució de *X. arboricola* pv. *pruni* a la Unió Europea es caracteritza per causar danys rellevants sobretot a les zones del Mediterrani, com ara diverses províncies d'Espanya, zones del sud-est de França i l'est de la vall del riu Po al nord d'Itàlia. La susceptibilitat a la taca bacteriana es deu a una combinació de les espècies i varietats i de les condicions climàtiques de la zona de cultiu.

Actualment, és present a nombrosos països i a Europa es considera establerta a Itàlia, Eslovènia, Bulgària, França, Romania i Rússia. En l'última dècada s'ha reconegut com un dels patògens més importants i un dels que genera més preocupació per l'augment de brots a tots els fruiters de pinyol, en fulla i en fruit.

Aquest bacteri està considerat com a patògen de quarantena a la Unió Europea. Com que no tenen ni competidors ni predadors naturals, la importància dels danys que poden produir és molt elevada i les actuacions envers aquest tipus de patògens són diferents de les que s'adopten per a les plagues ja establertes. En aquest cas, l'objectiu és evitar que s'introdueixin i garantir-ne l'absència.

En cas que se'n declari un focus, s'ha de delimitar la zona demarcada i activar les mesures per evitar que es propagui i eradicar el focus (DAMM 2016).

Xap és capaç de sobreviure a l'hivern en els borrons i a les cicatrius de les fulles. En la prunera japonesa també en els xancre. Les primeres infeccions es donen al començament de la primavera ja que el bacteri requereix una temperatura relativament càlida (20-25°C) i una humectació mantinguda durant unes 8 hores, que pot ser aportada per pluges primaverals freqüents, tempestes, calamarsa, boira i rosada.

Per contra, un temps fred i sec és desfavorable a la malaltia. Tals condicions també es troben a la vall del Po, al sud de França i als Balcans (EFSA 2014).

Cal tenir en compte les condicions que es puguin donar entre les 4 i 6 setmanes després de la floració, ja que suposa un període crític que pot incrementar la gravetat de les infeccions i les pèrdues poden ser majors. El bacteri pot desenvolupar diversos cicles de multiplicació i, per tant, diverses generacions de lesions en un cycle vegetatiu. És important tenir present la utilització d'estris contaminats en els diferents treballs ja que afavoreixen la dispersió de la malaltia en les parcel·les d'una explotació (DAAM 2016).

1.2.4 Conseqüències econòmiques

Una vegada hem descrit els danys causats per aquest patogen, l'impacte econòmic que representa la producció ineficient d'aquest cultiu esdevé important i depèn, en gran mesura, de tres paràmetres:

1. La reducció de la qualitat dels fruits i pèrdua de valor comercial.
2. La debilitat de l'arbre i la disminució de la productivitat dels cultius afectats.
3. L'augment dels costos en vivers per obtenir material vegetal sa i de reproducció en vivers.

Les fruites com les prunes i els préssecs que són susceptibles a ser atacats per *Xap*, tot i que moltes vegades presenten taques superficials, les peces es tornen invendibles. Les normes comercials de qualitat acordades per la majoria de productors de fruita d'os, no permeten la comercialització de fruites afectades ja sigui en la seva totalitat o, en alguns casos, només si cada peça no presenta més d'una o dues taques superficials amb un diàmetre d'aproximadament 1 mm², en aquests casos, els fruits afectats no han d'excedir el 8% de tot el lot comercial (Stefani 2010).

Per exemple, a Itàlia s'ha estimat que les pèrdues poden superar els 10.000 €/ha en cirerer (Stefani 2010). Mentre que a Espanya (Aragó) s'han estimat pèrdues de collites d'ametlles (22,4%-46,7%) i una disminució del rendiment (4,6%-11,3%) (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014).

1.2.5 Prevenció i mètodes actuals de lluita

La gestió de la taca bacteriana resulta complicada degut a les limitacions existents a l'hora de preveure-la i d'eradicar-la i actualment no existeix mètodes curatius que siguin eficaços per lluitar contra aquesta malaltia. El tractament actual es basa en l'aplicació de compostos de coure, l'ús d'antibiòtics i l'aplicació de mesures de quarantena i té una eficàcia limitada.

Per aquest motiu, resulta fonamental l'aplicació combinada de diferents mesures preventives destinades a evitar l'entrada i/o dispersió d'aquest patogen a les plantacions. A continuació es descriuen les mesures que s'apliquen actualment per lluitar contra aquesta malaltia als cultius de *Prunus persica* (DAAM 2009):

- Per tal d'evitar la propagació és de vital importància l'ús de plantes sanes i lliures de l'inòcul, procedents d'una empresa proveïdora de material vegetal autoritzada i que vagin acompanyades del preceptiu Passaport Fitosanitari CE.
- En zones properes a focus de *Xap* plantar aquelles espècies i/o varietats menys sensibles.
- En zones endèmiques de *Xap* evitar el reg per aspersió, ja que genera unes condicions ambientals propícies per al desenvolupament i dispersió del bacteri.
- Evitar els ambients o microclimes favorables al bacteri mitjançant esporgues adequades que permetin tenir la copa de l'arbre el més airejada possible, i evitar també els regs i els adobats nitrogenats excessius.
- En plantacions afectades tallar les branques amb símptomes visibles i cremar-les.
- Desinfectar els estris d'esporga a l'entrada i sortida de cada plantació. En el cas de plantacions afectades la desinfecció s'ha de fer amb la màxima freqüència possible, entre arbre i arbre.
- En plantacions afectades cal establir itineraris de tasques que permetin començar les actuacions a les plantacions sanes i finalitzar amb les infectades.
- Controlar els insectes plaga que puguin provocar ferides que suposin una possible via d'entrada del bacteri, com és el cas de la mosca de la fruita, l'anàrsia, la grafolita, etc.

1.3 Noves estratègies de control de la malaltia

Actualment a Catalunya, el control de plagues, malalties i fisiopaties en fruiters es realitza sobretot amb l'ús de productes químics de síntesi. Paral·lelament però, s'està produint una forta pressió en tota la seva cadena de producció, tant a camp com a post-collita. Els productes fitosanitaris aplicables als conreus es troben immersos a una legislació cada cop més restrictiva, l'evolució de resistències de les plagues i amb diverses normes de qualitat que les cadenes de distribució estan exigint.

Dins d'aquest marc, la Unió Europea i mercats del sector estan regulant la utilització de productes de protecció dels conreus i la presència de residus a les fruites establint una diana d'acció més específica, tenint en compte els efectes negatius que comporten als ecosistemes, com la persistència al medi ambient i la toxicitat per a organismes no diana.

Concretament, la Directiva Europea 91/414/EEC exposa l'elevada reducció del nombre de matèries actives existents de 973 a 313 i la introducció de, només, 82 de noves.

Els requisits de quarantena específics de EPPO recomanen que les comandes de plantes per a la plantació (excepte les llavors i els cultius de teixits), i els fruits, de *Prunus*, han de procedir d'un camp que es trobi lliure de la malaltia per inspecció durant la temporada de creixement (OEPP/EPPO 2003).

La recerca i la innovació del sector, i tal com dicta la Directiva 128/2009, té l'objectiu focalitzat en el disseny d'un marc per aconseguir un ús sostenible dels productes fitosanitaris mitjançant una reducció dels riscos o dels efectes del seu ús per a la salut humana i el medi ambient, a més del foment de la gestió integrada i plantejaments o tècniques alternatives als productes fitosanitaris.

Actualment s'està treballant amb **bioplaguicides**, derivats d'extractes de matèries naturals de plantes, microorganismes o substàncies produïdes per aquests amb la finalitat de reduir l'impacte al medi ambient i tenir una elevada eficàcia i aplicabilitat (Seiber *et al.* 2014). Un exemple d'aquests compostos són els estimuladors de les defenses de les plantes.

En agricultura, la utilització de productes capaços d'estimular mecanismes naturals de defensa de plantes és molt comú, emprat com a complement o alternativa a productes fitosanitaris dirigits contra els agents fitopatògens. Aquests sistemes es basen en l'estimulació, de manera directa o indirecta, d'hormones senyalitzadors i també precursors de l'expressió de gens en el sistema immunitari de les plantes.

Alguns compostos comercials inductors de la defensa de les plantes que treballen amb aquesta tecnologia es citen a continuació:

1. **MSB**: compost hidrosoluble del grup vitamínic K. S'ha registrat sota la marca ACT-2® per al seu ús en camp i es defineix com a elicitador/activador/inductor exogen de la resposta de defensa vegetal davant diversos patògens causants de malalties i virus. A nivell molecular, s'ha descrit una activitat transportadora d'electrons a la membrana plasmàtica de la cèl·lula vegetal, amb funcions clau com la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). Aquestes molècules desenvolupen un paper essencial en el sistema de defensa de les plantes (Agro Pro Centroamerica S.A. 2009).
2. **Harpina**: proteïna àcida estable a elevades temperatures i associada a la paret cel·lular bacteriana. Diversos bacteris (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*) són els responsables de produir-la i és capaç d'actuar com a elicitora, desencadenant la resposta sistèmica adquirida de les plantes (SAR). Aquesta resposta es produeix als teixits distants de la infecció, en la qual s'activa amb força l'expressió de gens de defensa (Akbudak *et al.* 2009).
3. **Àcid jasmònic (JA)**: hormona derivada de l'àcid linoleic que es produeix durant l'activitat del SAR davant l'atac d'insectes.

Desenvolupa un paper clau en la regulació gènica i metabòlica de molts processos cel·lulars davant de l'estrès, en la reproducció i en la comunicació (Gfeller *et al.* 2010).

1.4 Mecanismes de defensa de les plantes

Les plantes, com a organismes sèssils, estan exposades a una àmplia de condicions ambientals (sovint adverses) i la seva adaptació per sobreviure esdevé essencial. Tant és així, que les plantes posseeixen un sistema de defensa innat i eficient capaç de reconèixer la invasió de patògens. Entre els patògens que envaeixen les plantes, només els que eviten el reconeixement o la supressió dels mecanismes de defensa de l'hoste poden causar malalties (Hammond-Kosack and Jones 1997).

El sistema de defensa de les plantes és constitutiu i induïble (Dangl & Jones 2001). El mecanisme de **defensa constitutiu**, també anomenat protecció passiva, inclou diverses estructures com la presència de capes gruixudes de cutícula, deposició de ceres, etc.

Per altra banda, totes les cèl·lules vegetals vives poden detectar els patògens invasors i respondre amb els sistema de **defensa induïble**, ja sigui de manera no específica (per exemple, per microorganismes, o fins i tot per alguns factors abiòtics, com els xocs tèrmics o la sequera), o mitjançant la via específica amb la producció de substàncies tòxiques (enzims degradadors, substàncies o mecanismes que indueixen la mort de les cèl·lules infectades, etc.).

Perquè es produeixi la inducció de la defensa és necessària la intervenció de mecanismes de reconeixement a través dels quals la planta reconeix la presència del patògen. Aquesta detecció provoca l'expressió diferencial de gens i canvis metabòlics en les cèl·lules afectades per lluitar contra l'agressió i, si és necessari, comunicar a la resta de la planta i a les plantes veïnes la presència del patògen.

1.4.1 Mecanismes de detecció de patògens

Les plantes han desenvolupat múltiples nivells de mecanismes sofisticats d'alerta per a reconèixer els patògens i respondre ràpidament abans que aquests causin danys greus. Aquests sistemes d'alerta estan vinculats a les respostes específiques de defensa.

El reconeixement inicial es basa generalment, en uns patrons de molècules conservades associades a microorganismes invasors (*pathogen-associated molecular patterns*) PAMP o MAMP, que inclouen proteïnes, lipopolisacàrids i components de la paret cel·lular que tenen la capacitat d'induir l'anomenada immunitat desencadenant de patró PTI (*pattern-triggered immunity*). Els PAMPs són reconeguts per receptors localitzats a la membrana plasmàtica (*plasma membrane pattern recognition receptors*, PRRs), i activen la cascada de fosforilació que indueix el seguit de reaccions fisiològiques que conformen la resistència basal (Grennan 2006). És la primera línia de defensa constitutiva i induïble que protegeix la planta de manera general contra atacs i sovint, aquesta resposta és suficient per repel·lir l'atac.

A més, existeix un segon grup d'efectors específics dels patògens i els seus corresponents receptors en la planta que esdevenen una altra línia de defensa: la resposta hipersensible (RH).

Aquesta es caracteritza per limitar el patogen d'aigua i nutrients mitjançant la mort de les cèl·lules del lloc d'infecció. El "sacrifici" d'unes poques cèl·lules permet evitar la difusió de la infecció per la resta de la planta. Un cop s'inicia la RH, els teixits vegetals es tornen altament resistents a un ampli rang de patògens durant un extens període de temps. Aquest fenomen s'anomena resistència sistèmica adquirida (SAR) i aporta un major estat d'alerta en el qual es mobilitzen els recursos de defensa de la planta en el cas d'un nou atac (Freeman *et al.* 2008).

1.4.2 Molècules inductores de la PTI

Els PAMPs són molècules essencials per a la detecció dels patògens per part de les cèl·lules vegetals. Aquestes molècules inductores es poden denominar de diferents maneres segons el seu origen: patrons moleculars associats a microbis o patògens (MAMPs/PAMPs), patrons moleculars associats a herbívors (HAMPs) i patrons moleculars associats a virus (VAMPs) (Bartels & Boller 2015).

Una vegada el patogen ha estat detectat, s'activen una sèrie de mecanismes de defensa mitjançant cascades de senyals tant ràpides i transitòries com de llarga durada que es mostren a l'apartat 1.6.1 de continuació.

Generalment, es generen una sèrie de molècules que activen vies de senyals de transducció i provoquen que es reguli positivament l'expressió de gens de defensa mitjançant factors de transcripció. Entre els senyals que es generen en tot el llarg d'aquesta via de transducció del senyal hi trobem les hormones vegetals etilè i àcids jasmònic (JA) i salicílic (SA) i monòxid de nitrogen (NO). En la última dècada s'ha descobert una família de pèptids que tenen una funció específica en aquest sistema PTI.

1.5 Els pèptids elicitors endògens (Peps)

Com s'ha citat anteriorment, les plantes no només reconeixen molècules elicitores derivades d'organismes invasius, sinó que també molècules inductores endògenes de la planta hoste produïdes en situacions de risc per la planta. Els pèptids elicitors de plantes han estat identificats com una classe d'elicitors endògens de plantes que contribueixen en la immunitat contra l'atac de bacteris, fongs i herbívors.

Van ser inicialment identificats en *Arabidopsis thaliana* (Huffaker *et al.* 2006; Yamaguchi & Huffaker 2011), tot i que actualment ja s'han descrit en moltes espècies d'angiospermes (Lori *et al.* 2015).

Els pèptids (Peps) són una seqüència de 23 a 29 aminoàcids codificats a l'extrem C-terminal de les seves corresponents proteïnes precursoras anomenades PROPEPs (Huffaker and Ryan 2006; Bartels *et al.* 2013).

La producció dels Peps es troba controlada per la mateixa planta hoste davant una situació de vulnerabilitat (Yamaguchi & Huffaker 2011). Aquestes molècules esdevenen molt importants en els estadis inicials de la resposta de defensa de les plantes.

Així doncs, es creu que els Peps identificats fins al moment duen a terme la funció d'amplificació de la resposta de defensa inicial mitjançant un sistema de resposta similar a la PTI i regulació positiva d'altres gens de defensa. També es creu que podrien crear una senyal d'alerta des de l'àrea afectada fins a zones més distants de la planta (Ross *et al.* 2013). Realitzant experimentalment un pretractament d'*Arabidopsis* o *Zea mays* amb alguns Peps concrets dona lloc a una major resposta de defensa i suposa una millora significativa de la resistència a diversos patògens: bacteris, fongs o herbívors (Lori *et al.* 2015). Ara bé, per tal de que tot això sigui possible, el Pep ha de sortir de la cèl·lula.

1.5.1 Interacció amb receptors de membrana (PEPR) i l'activació de PTI

La percepció de Peps a nivell cel·lular requereix de la interacció amb uns receptors específics de membrana anomenats Pep-Receptors (PEPRs). La interacció amb els dominis de repetició rics en leucina (LRR) dels PEPRs desencadena una resposta PTI similar a la que desencadenen els MAMPs.

A la figura 2 de continuació es mostra esquemàticament la senyalització de PEPR i l'activació de PTI i quins són els diversos esdeveniments que es desencadenen (Bartels & Boller 2015):

1. La percepció de Pep condueix a la heteromerització de PEPR amb el co-receptor BAK1 (Brassinosteroid Receptor associat Kinase-1) seguit d'una fosforilació recíproca.
2. Els canals iònics s'obren i condueixen a l'alcalinització del medi extracel·lular i probablement a l'afluència de Ca^{2+} . Els PEPR, a més, poden produir CGMP, que pot activar el CNGC2 donant lloc a una major afluència de Ca^{2+} extracel·lular.
3. Es produeixen espècies relatives de l'oxigen (ROS), es desencadena la síntesi de NO i s'activa la CDPK.
4. **En paral·lel, s'activen les cascades MAPK i els nivells de defensa de les hormones ET i JA augmenten. Tots aquests complexos modulen l'activitat d'una multitud de factors de transcripció, que al seu moment indueixen l'expressió de gens de defensa, així com la transcripció de PEPRs i PROPEPs.**
5. És possible que els PROPEPs s'acumulin o continuï processant-se per formar Peps i alliberar-los al medi extracel·lular.

6. A llarg termini, la percepció de Pep condueix a la formació de callosa i la inhibició del creixement de les plàntules: aquests són marcadors típics de respostes secundàries de PTI.

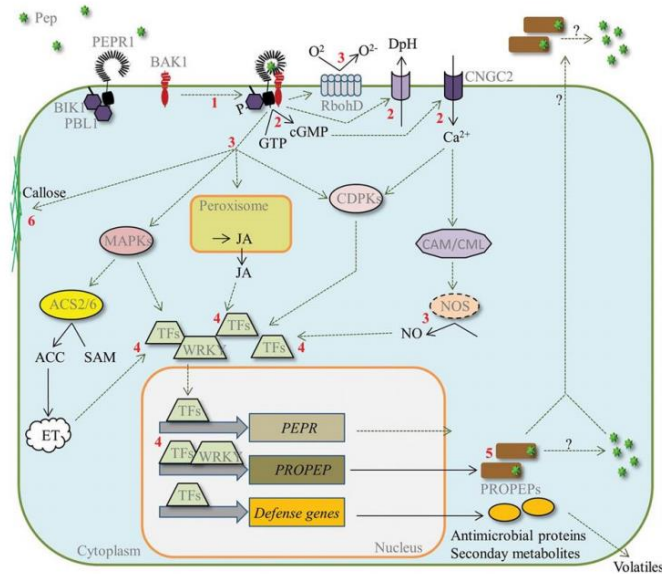


Figura 2. Esdeveniments seguits de la percepció del Pep (Bartels & Boller 2015).

1.6 MAPK i les seves fosforilacions

Les plantes posseeixen xarxes de senyalització integrades que intervien en la percepció i responen a les hormones, nutrients i senyals i estressos mediambientals que regeixen el creixement i el desenvolupament de les plantes. El coneixement actual que tenim de les vies de transducció del senyal vegetal prové de la identificació dels sensors i receptors que perceben el senyal i dels factors de transcripció i els gens diana que coordinen la resposta a les cèl·lules de les plantes (McCarty, D. R., & Chory J. 2000). En els darrers anys, s'ha demostrat que les cascades de proteïnes MAPK juguen un paper essencial en les vies de transducció del senyal vegetal des de la divisió fins a la mort cel·lulars.

Recentment s'ha demostrat en *Arabidopsis* que una de les primeres accions que passen quan interaccionen el PEPR i el Pep és que s'inicia la cascada de fosforilacions i es fosforilen les MAPK (Ortiz-Morea *et al.* 2016).

A les plantes, les cascades de MAPK estan associades a diverses respostes fisiològiques, de desenvolupament i hormonals. Els estudis moleculars i bioquímics que utilitzen anticossos específics a MAPK particulars han revelat que l'activació de MAPK es correlaciona amb tractaments estimulants com la infecció per patògens, ferides, baixa temperatura, sequera, hiper- i hiposmolaritat, alta salinitat i espècies d'oxigen (Ichimura *et al.* 2002).

A continuació, es mostra un model d'activació de la resposta de defensa per part de *Flagellin Sensitive 2* (pèptid del flagel del patogen) estudiat en *Arabidopsis* i on es poden observar les MAPK abans i després de l'activació de la cascada de senyalització i les fosforilacions que es desenvolupen.

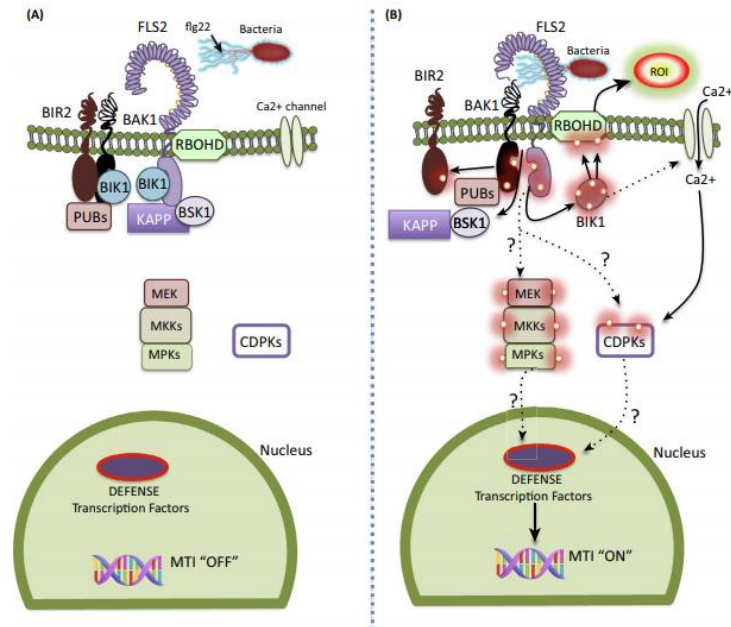


Figura 3. Model de defensa pel control de FLS2 en *Arabidopsis*. (Belkhadir *et al.* 2014).

Com es pot observar en la figura 3, quan es produeix la unió de flg22 (un MAMP) amb el receptor FLS2 es desencadenen un seguit de fosforilacions (indicat a la figura com a halos vermells amb rodones blanques) i una d'aquestes es dona en les MAPK que contribuiria a la inducció de la resposta immunitària de flg22. Les molècules/rutes fosforilades, expressades amb fletxes discontinuïques i interrogants, indiquen que actualment no es coneixen tots els detalls de l'activació d'aquestes rutes de senyalització. Per tant, i tal i com s'observa en aquest model, l'activació de les MAPK mitjançant fosforilació és un dels primers estadis de la ruta de transducció del senyal.

2. ANTECEDENTS DEL GRUP DE RECERCA

El grup de recerca de Tecnologia del Aliments (TA), on realitzo el treball de fi de grau pertany a l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona. Una de les línies de recerca del grup es basa en l'estudi i desenvolupament de noves estratègies fitosanitàries pel control de la malaltia causada pel patògen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en fruiters del gènere *Prunus*. Tal com s'ha comentat anteriorment, els fruiters del gènere *Prunus* resulten de rellevant interès econòmic en la societat actual i sobretot a l'Estat Espanyol. Els tractaments actuals són poc efectius i estan basats en l'aplicació de productes poc respectuosos amb el medi ambient. La investigació de noves estratègies preveu aportar alternatives més sostenibles.

En els darrers anys el grup ha iniciat una línia de recerca basada en potenciar el sistema immunitari de la planta, per així poder complementar i millorar els mètodes actualment disponibles de control de la taca bacteriana. El grup està treballant en la possible utilització de pèptids endògens de la planta i que de manera natural funcionen com a elicitors de les defenses de la pròpia planta. La idea seria utilitzar-los, en un futur, com a producte fitosantiari.

Fins al moment, el grup ha confirmat i descrit la presència de dos Peps (Pep1 i Pep2) i dos PEPR (PEPR1A i PEPR1B) en diferents espècies de valor comercial del gènere *Prunus* (Ruiz *et al.* 2017;2018), entre elles *Prunus persica*. Assajos d'infecció amb Xap en fulles de presseguer han demostrat que l'aplicació de PpPep1 i PpPep2 24 o 48 hores abans de la inoculació amb Xap controlen de manera eficient la malaltia. Les fulles pretractades amb els Peps presentaven una disminució significativa dels símptomes de la malaltia (Ruiz *et al.* 2017). Dins del treball de Ruiz *et al.*, 2017 també es va demostrar que PpPep1 i PpPep2 estimulaven l'expressió d'alguns gens de defensa.

En aquest treball, es pretén continuar l'estudi d'estratègies noves de control de malalties iniciat per Cristina Ruiz i que va formar part de la seva tesi doctoral. Els pèptids fins ara testats en presseguer són els naturals, els propis de presseguer. La idea del grup és modificar la seqüència d'aquests pèptids amb l'objectiu de trobar-ne de més eficients. Una modificació de la seqüència, però, pot fer que el pèptid no tingui la funció esperada d'estimulació de defenses. Per aquesta raó, el grup està interessat en trobar una plataforma manejable per a poder cribar pèptids modificats i seleccionar els possibles candidats, que posteriorment es provarien en assajos d'infecció.

En els darrers anys, s'ha demostrat que una de les vies de transducció del senyal vegetal és la cascada de proteïnes MAPK. L'activació d'aquesta via esdevé una de les primeres accions que succeeixen quan interacciona el receptor dels pèptids amb els propis pèptids elicitors i s'inicien un conjunt de cascades de fosforilacions. Entre les proteïnes fosforilades es troben les MAPK. Per tant, la fosforilació de les MAPK podria ser un indicador que el PEPR i el Pep han interaccionat i iniciat la resposta de defensa. Una plataforma basada en la determinació de la fosforilació de les MAPK seria molt útil per a poder determinar l'efectivitat dels Peps modificats, ja que l'efectivitat vindrà determinada per una bona transmissió i amplificació de la senyal de la immunitat de la pròpia planta.

A continuació, a la figura 4 es mostra un esquema global del projecte del grup de recerca i la contribució del meu treball en aquesta línia d'investigació.

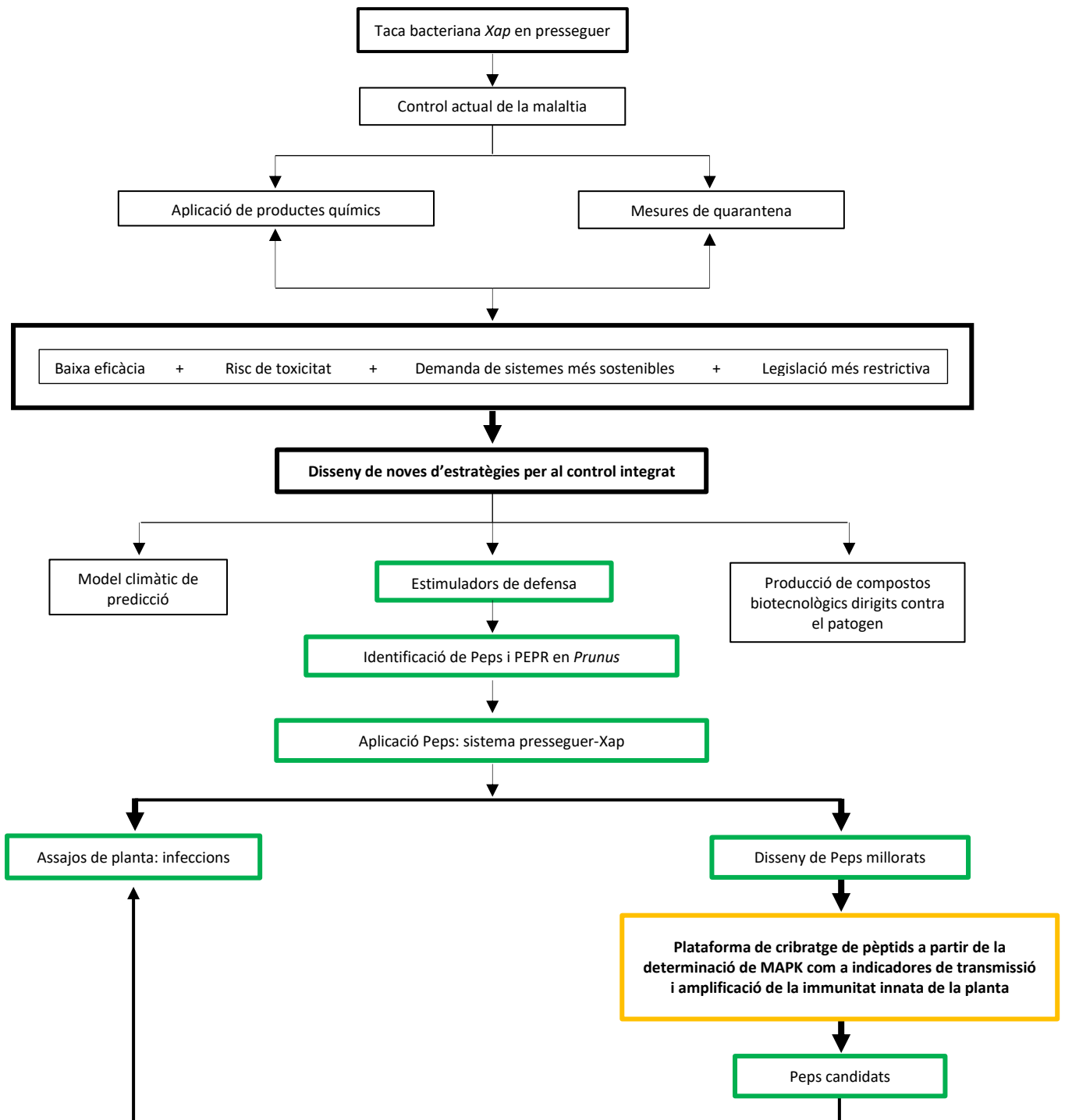


Figura 4. Esquema global del grup de recerca INTEA i de la integració del meu projecte.

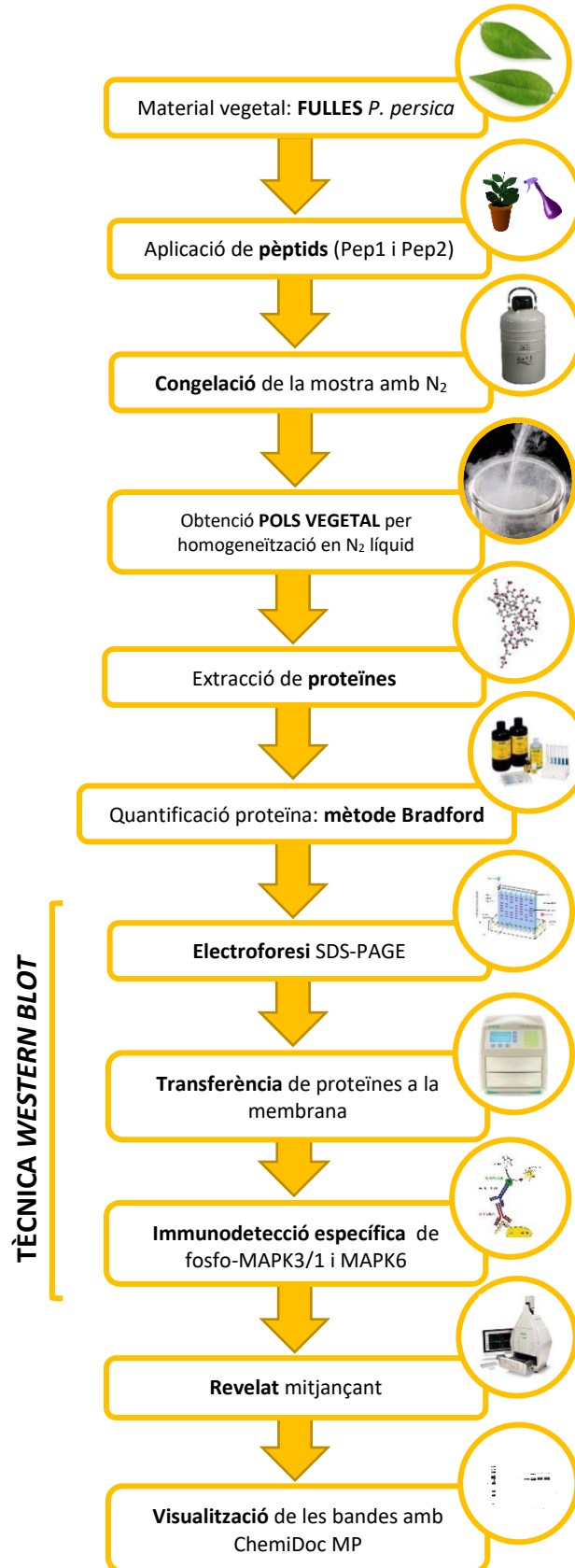
3. OBJECTIUS

L'objectiu final d'aquest treball és posar a punt una plataforma de criba de pèptids elicitors de les defenses de plantes (Peps) en presseguer, que es basi en la detecció d'un dels primers passos en la transducció del senyal: la fosforilació de MAPKs. Per assolir aquest objectiu s'han definit diversos objectius concrets:

- Tractament de fulles de presseguer amb els Peps PpPep1 i PpPep2, dels quals es coneix la forta activitat elicitora de les defenses en aquesta espècie, seguint dues aproximacions experimentals, *in planta* i *ex vivo*. Els tractaments es realitzaran a diferents dosis de Peps i durant diferents temps.
- Optimització de l'assaig *Western Blot* per a la determinació de la presència de MAPK6 (control), i de MAPK1 i MAPK3 fosforilades, utilitzant les mostres de fulla de presseguer tractades amb PpPep1 i PpPep2.
- Càlcul, mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge, del percentatge de MAPKs fosforilades respecte la MAPK control.
- Avaluació i comparació de les dues aproximacions experimentals, *in planta* i *ex vivo*.

4. MATERIALS I MÈTODES

Per tal de facilitar la comprensió d'aquest projecte s'ha desenvolupat un esquema general del treball.



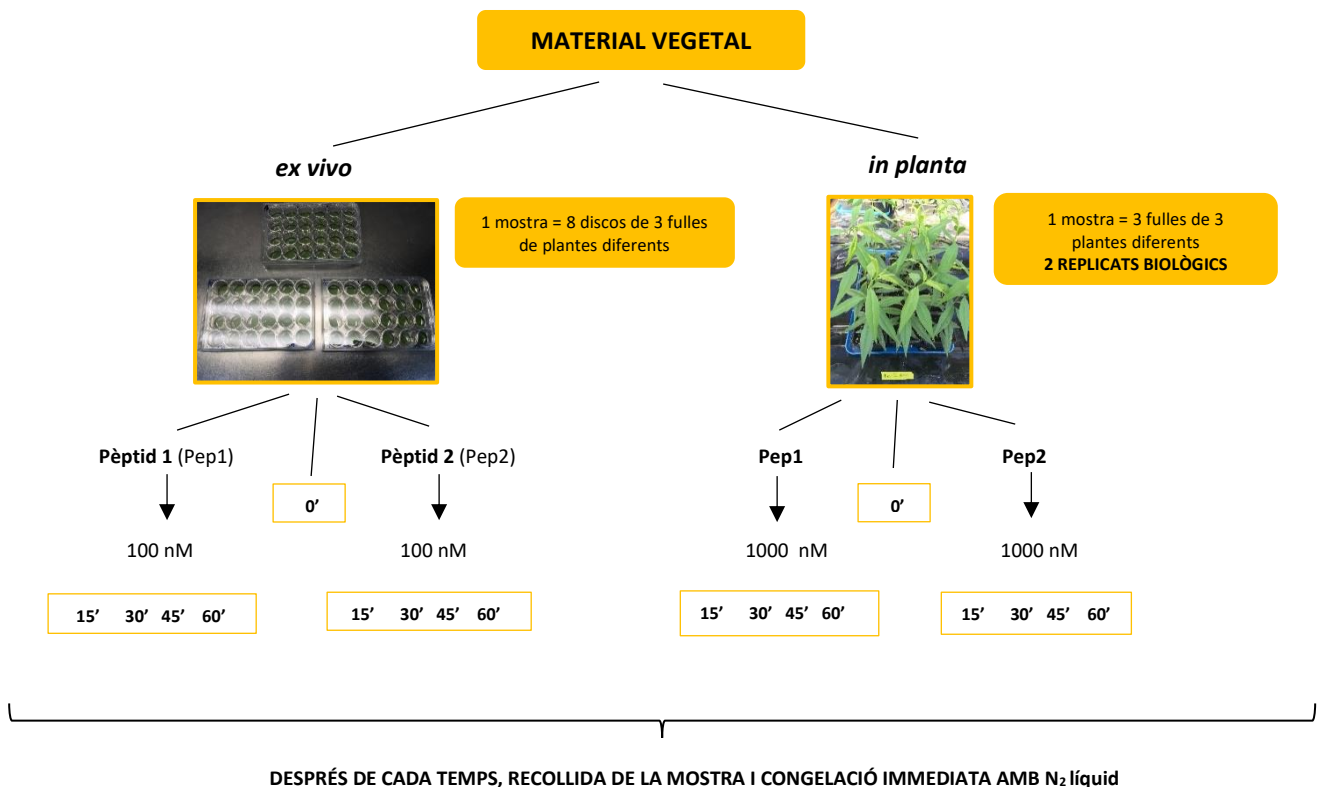
4.1 Disseny i assaig experimental

Tal com es descriu a l'esquema general del pla de treball es va partir de plantes de l'espècie *Prunus persica*. Es va treballar amb dues aproximacions diferents: *ex vivo* i *in planta*. Per una banda, els assajos *ex vivo* es van realitzar sobre discos de fulla, que una vegada obtinguts es van incubar en un fitotró (Sartorius) en condicions de temperatura i llum controlades on posteriorment es van aplicar els pèptids elicitors corresponents a cada disc.

Per altra banda, en els assajos *in planta* es va treballar sobre plantes senceres crescudes en un hivernacle. L'aplicació de pèptids elicitors (Pep) va ser directa (aplicació per esprai) i sense danyar el material vegetal. Aquesta aproximació seria la que presenta més similituds amb l'aplicació a camp.

Tal i com s'indica a l'esquema, en el cas de l'assaig *ex vivo* només es va realitzar 1 replicat biològic obtingut a partir de 8 discos de fulles de 3 plantes diferents. Per altra banda, en l'assaig *in planta* es van fer 2 replicats biològics.

A continuació es mostra un esquema del disseny experimental del meu treball.



4.2 Material vegetal

Tot seguit es descriu la preparació del material vegetal **ex vivo**.

1. Es parteix de 40 fulles obtingudes de 40 plantes diferents (desenvolupades i sense presència aparent de decoloracions o talls superficials). Cada mostra està formada per 8 discos de 3 fulles de plantes diferents.
2. Es tallen les fulles, es renten i es desinfecten: 1 recipient amb 0,5 L lleixiu 10% i 2 recipients 0,5 L aigua destil·lada (AD) estèril. Es submergeixen 30 segons a cada recipient.
3. Amb l'ajuda d'un bisturí, es retira el nervi principal de cada fulla. Seguidament, es fan talls en forma de quadrats petits (discos) que mesurin 1 cm x 1 cm aproximadament.
4. S'aplica 900 µL d'AD estèril en cada pouet de la placa i amb l'ajuda d'unes pinces es col·loca un disc de fulla dins del pouet de tal manera que quedin flotant a l'aigua.
5. Es col·loquen les plaques a l'incubador a 22°C i llum contínua durant la nit per reduir la resposta a les ferides prèviament a l'assaig (Chouchani *et al.* 2014).
6. S'apliquen els pèptids Pep1 i Pep2 a una concentració final de 100 nM.
7. Es deixen les plaques a l'incubador durant el temps que es vol aplicar el tractament (0', 15', 30', 45' o 60').
8. S'homogeneïtza la mostra submergida en N₂ líquid durant pocs segons fins que quedi una pols ben fina.
9. Es guarden les mostres en tubs de 1,5 ml a -70°C.

Tot seguit es descriu la preparació del material vegetal **in planta**:

1. Es parteix de 40 plantes i s'utilitzen en total 12 fulles per planta. S'organitzen en 2 replicats biològics, on cada replicat està format per 3 fulles de 3 plantes diferents.
2. S'apliquen els pèptids a les fulles a concentració final de 1000 nM. Segons la mida de la fulla, s'espraia 2 o 3 vegades, tant a anvers com revers.
3. Es tallen les fulles de la planta i amb l'ajuda d'un bisturí s'elimina el nervi principal que dificultaria el procés d'obtenció de la pols vegetal.
4. Es col·loquen les mostres en un paper d'alumini i es submergeixen en N₂ líquid durant 10-15 segons.
5. S'homogeneïtza la mostra submergida en N₂ líquid durant pocs segons fins que quedi una pols ben fina.
6. Es codifiquen les mostres en tubs de 1,5 mL i 2 mL.
7. Es guarden les mostres al congelador de -70°C.

4.3 Extracció de proteïnes

Les molècules que pretenem identificar en aquest treball són les proteïnes MAPK, per tal de determinar els seus índexs de fosforilació després de l'aplicació dels pèptids corresponents i relacionar-ho amb la seva activitat. Per obtenir-les s'ha de realitzar una extracció de proteïnes provocant la lisi de les cèl·lules vegetals contingudes en la pols de fulla.

Les proteases naturals que poden digerir les proteïnes diana en la mostra són una amenaça pel durant el procés d'extracció. Per a solucionar el problema, s'afegeixen inhibidors de proteases per impedir que degradin les proteïnes, però llavors cal eliminar-les en etapes posteriors del procés de purificació. S'ha de cercar un procés equilibrat per a la purificació i extracció, per poder mantenir l'activitat biològica de les proteïnes.

MATERIAL DE LABORATORI

- Micropipetes
- Pipetes Pasteur de vidre i de plàstic
- Tubs de 5 mL, 1,5 mL i tubs "protein LowBind" de 1,5 mL
- Campana extractora (Telstar)

TAMPONS/REACTIUS

- a) Tampó d'extracció proteica (Taula 1). Aquest tampó conté TRIS-base (Sigma), un estàndard basimètric i tampó establert en bioquímica i biologia molecular. S'utilitza en la formulació de solucions tampó en el rang de pH entre 7,5 i 8,5. Les solucions tampó TRIS són àmpliament utilitzades en biologia cel·lular i molecular per processos com l'extracció i purificació de proteïnes i àcids nucleics.

Taula 1. Reactius utilitzats per preparar el tampó d'extracció proteica (Vélez-Bermúdez 2013).

Buffer normal			
Reactiu	Concentració stock	Concentració final	Volum de 250 mL
TRIS-base	50 mM	10 mM	50 mL
KCl	-	50 mM	900 mg
MgCl ₂	-	6 mM	300 mg
EDTA	-	10 mM	930 mg
NaCl	-	0,4 M	5,84 g
Tritó X-100 (Polyethylene glycol 200)	100%	1%	2.5 ml
H ₂ O			Enrasar

- b) Inhibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Powder de Sigma-Aldrich).

PROTOCOL

1. Prèviament es dissol la mescla comercial d'inhibidors de proteases en 10 mL d'aigua mili Q estèril per obtenir una mescla d'inhibidors a una concentració 10X. Es fan 9 alíquotes d'1 mL i 10 de 100 µL i es conserven a -20°C. Un cop gastades les de 100 µL, cada vegada que en tornem a necessitar, es subaliquota 1 mL en 10 tubs de 100 µL. Tot a dins de la campana extractora.
2. S'afegeixen 22 µL de la mescla d'inhibidors 10X a 2,2 mL (6 mostres x 350 µL de tampó d'extracció= 2'1 mL → s'aproxima a 2,2 mL) de tampó d'extracció 1X.
3. S'homogeneïtzen 100-200 mg de material vegetal en un tub còrex i amb l'ajuda d'una vareta de vidre. L'homogeneïtzació es fa amb N₂ líquid fins aconseguir una pols molt fina. Si ja ho teníem fet d'un altre dia, retirem l'alíquota de la pols vegetal del congelador -70 °C i evitant que la mostra es descongeli, ràpidament procedir al següent pas.
4. S'afegeixen 300 µL de Buffer normal 1X que conté la mescla d'inhibidors i es vortexa. Si encara no queda la pols dissolta podem afegir més tampó d'extracció.
5. Es transfereix la suspensió del material vegetal a un tub de 2mL amb una pipeta Pasteur de plàstic.
6. S'incuba la mostra 10 minuts en gel.
7. Es centrifuga 15 minuts a 14.000 rpm i a 4°C per sedimentar el material no soluble.
8. Es transfereix el sobrenedant per aspiració amb pipeta Pasteur a un nou tub eppendorf de 1,5 mL.
9. S'afegeixen 50 µL de tampó d'extracció (sense inhibidors de proteases) al pèl-let i es ressuspèn.
10. Es torna a centrifugar 15 min a 14.000 rpm a 4°C.
11. Es transfereix el poc sobrenedant amb una pipeta Pasteur estirada al mateix tub on havíem guardat el primer sobrenedant.
12. Es separa una alíquota de 43 µL en un tub "lowBind", per tal de poder analitzar-lo per Bradford.
13. Es congelen les mostres a -70°C per a la seva conservació.

4.4 Quantificació pel mètode Bradford

En la majoria de treballs bioquímics és interessant quantificar la proteïna total d'un extracte proteic després dels diferents passos d'extracció, purificació, etc., per tal de poder saber els rendiments d'aquests processos i si aquests han estat adequats i/o suficients.

Hi ha diversos mètodes de quantificació de proteïnes, però els més utilitzats són aquells en què un colorant s'uneix, de manera inespecífica, a les proteïnes, donant a l'extracte una coloració característica i quantificable en un colorímetre.

Els diferents mètodes colorimètrics tenen diferents característiques pel que fa a sensibilitat i linealitat de resposta, però el més utilitzat de tots ells és la quantificació amb el reactiu de Bradford (1976), que es basa en la reacció entre el colorant *Brilliant Blue G* del reactiu de Bradford amb les proteïnes d'un extracte proteic. Aquest complex proteic desplaça l'absorbància màxima del colorant de 465 nm (vermell) a 595 nm (blau).

Per tal de quantificar una mostra desconeguda es realitza una recta patró amb concentracions conegudes d'estàndard, en aquest cas albúmina bovina (BSA), amb concentracions entre 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Es parteix d'una alíquota de 40 μL de l'extracte de proteïnes de conservada al congelador a -80°C .

MATERIAL DE LABORATORI

- Micropipetes
- Tubs de 2 mL
- Gradeta
- Espectrofotòmetre (Shimadzu UV-160A)

TAMPONS/REACTIUS

- a) Reactiu de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 450 mL).

PROTOCOL

1. Es prepara una solució de BSA de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 mg de BSA en 100 mL d'aigua destil·lada). Es filtra la solució a través d'un filtre de 0.45 μm i es fan alíquotes de 10 mL en tubs falcon15 per conservar a -20°C .
2. Es dilueix la solució de BSA a 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de la solució inicial d' 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.1 mL BSA solució inicial en 0.9 mL de Tris HCl 0.1 M pH8).
3. A partir de la concentració de BSA de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ es preparen les dilucions que formaran part de la recta patró:

Taula 2. Dilucions per la recta patró de BSA 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Concentració final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	μL BSA 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	μL TRIS 0.1 M pH 8
0	0	1000
1	10	990
3	30	970
5	50	950
7	70	930
10	100	900
20	200	800

4. Es prepara un banc de dilucions de l'extracte de proteïnes:

Taula 3. Banc de dilucions de l'extracte de proteïnes de les mostres.

			Volum total	Volum a treure (volum total 750)
Dilució 1/50	40 µL extracte	1960 µL Tris HCl 0.1 M pH 8	1600	850
Dilució 1/250	400 µL dilució 1/50	1600 µL Tris HCl 0.1 M pH 8	1250	500
Dilució 1/500	750 µL dilució 1/250	750 µL Tris HCl 0.1 M pH 8	1000	250
Dilució 1/1000	500 µL dilució 1/500	500 µL Tris HCl 0.1 M pH 8	1000	250

La cubeta d'espectrofotometria on es col·loca la mostra a analitzar a l'espectrofotòmetre té una capacitat de 750 µL i nosaltres vam partir de volums més elevats com s'observa en la columna de volum total de la taula 3. És per això, que vam haver d'eliminar els corresponents volums per tal d'arribar als 750 µL requerits.

Un exemple del banc s'observa en la figura 5 de continuació.

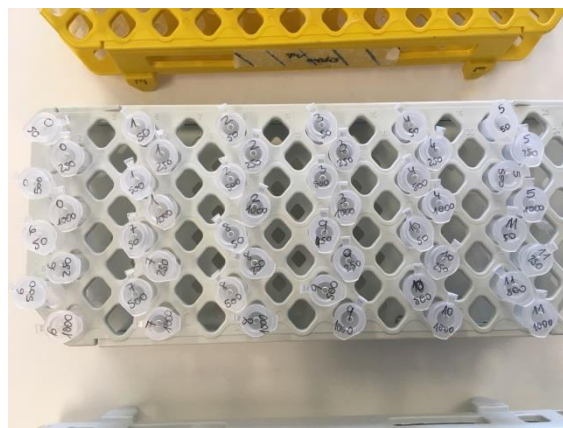


Figura 5. Distribució de les dilucions de l'extracte de proteïnes en la gradeta (Font: Pròpia).

- Es barregen bé 0.75 mL d'estàndard o mostra amb 0.75 mL del reactiu de Bradford.
- Es deixa incubar la mescla un mínim de 10 minuts i un màxim de 30 minuts. S'observen unes coloracions blavoses de les mostres corresponents a la tinció del reactiu de Bradford, es mostra en la figura 6.
- Es llegeix l'absorbència a **595 nm** a l'espectrofotòmetre.
- Es fa una recta patró amb el valor de la concentració d'estàndard i la corresponent absorbència. S'utilitza aquesta recta per a calcular la concentració de proteïna total extreta en cada cas. Per aquest càlcul s'utilitzen les mesures d'absorbència corresponents a les dilucions que es troben dins la recta patró.



Figura 6. Coloració del reactiu de Bradford de les mostres (Font: Pròpia).

4.5 Detecció i quantificació de MAPK: Mètode Western Blot

El *Western Blot* (WB), també conegut com a *protein blotting* o *immunoblotting*, és una tècnica introduïda per Towbin *et al.* l'any 1979 que serveix per a la immunodetecció i quantificació de proteïnes específiques en complexos cel·lulars.

La tècnica permet transferir les proteïnes d'un gel de poliacrilamida sòdic dodecil sulfat (SDS) a una membrana absorbent. Les proteïnes transferides a la membrana esdevenen una còpia exacta del gel obtingut per electroforesi.

La membrana s'incuba amb dos anticossos; l'anticòs primari s'uneix a les proteïnes de la membrana, en canvi, l'anticòs secundari s'uneix a l'anticòs primari. L'exposició de les proteïnes presents en una mostra a un anticòs específic contra la proteïna en estudi i el revelat amb un anticòs contra el primer acoblat a un enzim com l'HRP (*horseradish peroxidase*) permet la seva identificació en separacions electroforètiques.

En qualsevol experiment d'immunodetecció s'utilitzen dos conjunts d'anticossos i es pot veure representat esquemàticament a la figura 7 de continuació:

- L'anticòs primari, que es dirigeix contra la proteïna diana (antigen).
- El reactiu secundari, en aquest cas un anticòs que es reconeix i s'uneix a l'anticòs primari; es conjuga a un enzim com HRP, que converteix el substrat en quimioluminescència, que després es detecta mitjançant un aparell de revelat.

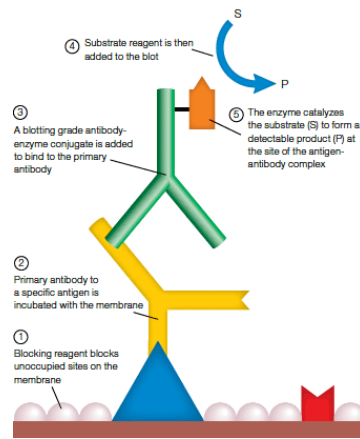


Figura 7. Detecció enzimàtica específica de la membrana amb els corresponents antigens (Font: BIO-RAD 2018).

4.5.1 Electroforesi SDS-Page

L'objectiu de l'electroforesi és la separació de proteïnes de la mostra en funció del seu pes molecular. L'estratègia més comuna és utilitzar Tris-glicina SDS-PAGE. Les proteïnes de la mostra (prèviament desnaturitzades per calor) s'uneixen amb l'SDS, creant complexos negativament carregats; la quantitat de SDS que s'uneix a les proteïnes desnaturitzades és proporcional al pes molecular d'aquestes. Això provoca que una vegada hem aplicat corrent, els complexos SDS-proteïna (carregats negativament) migrin pel gel de poliàcrilamida en base de la mida del polipèptid.

MATERIAL DE LABORATORI

- Falcons de 15 mL
- Micropipetes i puntes
- Tubs de 5 mL
- Cubeta electroforesi i accessoris (Bio-Rad)
- Font electroforesi (Bio-Rad)

TAMPONS/REACTIUS

a) Gels

Gel separador (x 1 gel)	
Reactiu	Quantitat
H ₂ O	2,26 mL
Tampó Tris-HCl pH 8,5	1,25 mL
Acril:basacril (5:1)	1,50 mL
SDS 20%	50 µL
Temed	5 µL
Persulfat d'amoni 15%	50 µL

Gel aplicador (x 1 gel)	
Reactiu	Quantitat
H ₂ O	1,5 mL
Tampó Tris-HCl pH 8,5	500 µL
Acril:basacril (5:1)	330 µL
SDS 20%	20 µL
Temed	4 µL
Persulfat d'amoni 15%	20 µL

b) Tampons

Tampó Tris-HCl 3 M	
Reactiu	Quantitat
Tris base (Mol 15 – Sigma)	18,171 g
H ₂ O MiliQ	50 mL

(Comprovar pH= 8,5)

Tampó de càrrega per les mostres (4x)	
Reactiu	Quantitat
Tris-HCl 1 M pH 6,8	2,0 mL
SDS	1,6 g
Glicerol	4,8 mL
DDT	0,62 g
Blau de bromofenol	Enrasar fins a 10 mL

Tampó d'electroforesi (10x)	
Reactiu	Quantitat
Tris base	15,1 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

(Comprovar pH entre 8,3 i 8,7)

Tampó Tris-HCl 1 M	
Reactiu	Quantitat
Tris base (Mol 15 – Sigma)	1,2114 g
H ₂ O MiliQ	15 mL

(Comprovar pH= 6,8)

c) Reactius

SDS 20%	
Reactiu	Quantitat
SDS	0'5 g
H ₂ O MiliQ	5 mL

Blau de bromofenol (al 0,05%)	
Reactiu	Quantitat
Blau bromofenol	25 mg
Etanol 50%	50 mL

Persulfat d'amoni (al 15%)	
Reactiu	Quantitat
Persulfat d'amoni	50 mg
H ₂ O MiliQ	333 µL

PROTOCOL

1. Es prepara la mescla pel gel separador 1x en un falcon de 50 mL nou. Un cop afegits els 4 primers reactius, mesclar suaument. Es barreja i aplica entre els dos vidres, fins la marca. S'aplica una fina capa d'aigua MiliQ (50 µL). Es deixa polimeritzar 30 minuts, fins que s'observi la línia entre l'aigua i el gel.
2. Passats els 30 minuts, s'elimina l'aigua destil·lada amb paper de poiata. S'afegeix el gel apilador 1x entre els vidres. Es col·loca la pinta i es deixa polimeritzar 30 minuts més.
3. Es preparen les mostres. Es carreguen 20-30 µg per mostra. Es dilueixen totes les mostres per igual, i així es carrega sempre la mateixa concentració. Es pren la quantitat de mostra adequada i s'aplica 8,3 µg de tampó de càrrega.
4. Es bullen les mostres 5 minuts a 95 °C per a desnaturalitzar les proteïnes.
5. Es deixa temperar uns minuts (mentre preparem els buffers per la cubeta) i es carrega en el gel.
6. Es situa el gel + suports a dins la cubeta, amb les pintes per la part interna. Es comprova que no té pèrdues. S'afegeix el tampó a la part de dins (cànode). S'acaba d'afegir tampó d'electroforesi fins a dalt de les pintes, i després a fora fins la marca de la cubeta.
7. Es carreguen les mostres (25 µL). S'afegeix 2 µL de pes molecular Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards.
8. Es fa córrer el gel durant 30 minuts a 70 volts i posteriorment, durant 80 minuts a 120 volts.
9. S'atura el front d'electroforesi quan arribi a la part inferior del gel. Un vegada acabada l'electroforesi, es separa el vidre prim amb l'ajuda d'un bisturí. Es tallen els pouets i es retira el gel.

4.5.2 Transferència de proteïnes a la membrana

La transferència de proteïnes a la membrana de nitrocel·lulosa es realitza mitjançant l'equip de transferència *Trans-Blot Turbo™ Transfer System* de Bio-Rad. És la tècnica més utilitzada per a la transferència de proteïnes d'un gel a una membrana, un cop l'electroforesi ha finalitzat.

A continuació, a la figura 8 es visualitza la col·locació de les membranes Mini PVDF Transfer Packs i la disposició de les càrregues perquè la transferència sigui efectiva.

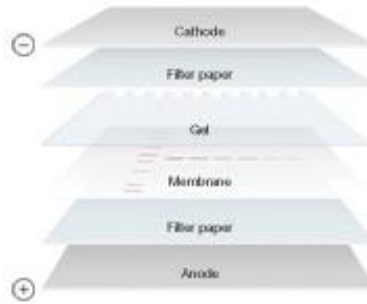


Figura 8. *Western Blotting Membranes and Filter Paper.* (Font: Bio-Rad 2018).

MATERIAL DE LABORATORI

- Membranes Mini PVDF Transfer Packs de Bio-Rad
- H₂O MiliQ
- Estisores
- Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad)

PROTOCOL

1. Muntar el "sàndwich" de transferència amb el gel, la membrana i els papers Whatman d'acord amb les instruccions del fabricant (esponja/membrana/gel/esponja).
2. Transferir a 25V durant 30 min. L'amperatge depèn del nombre de membranes que transferim. Si és només una membrana cal 0,4 A.
3. Desmuntar la transferència i rentar la membrana 2-3 cops amb aigua estèril per eliminar les restes de tampó de transferència.
4. Tallar uns 10 cm per la part inferior de la membrana.

4.5.3 Detecció de les MAPK

En el nostre estudi, les proteïnes diana són MAPK6 (control) i fosfo-MAPK3 i fosfo-MAPK1 (fosforilades). D'aquesta manera, els anticossos que s'han utilitzat per tal d'identificar i hibridar les proteïnes diana i posteriorment l'anticòs primari amb el secundari han sigut els següents:

Anticossos primaris

- **Específics per a la detecció de MAPK3/MAPK1 fosforilades:** s'han provat anticossos de dues cases comercials, Sigma i Cell Signaling. D'acord amb les instruccions de la casa comercial, ambdós anticossos s'han assajat a una dilució 1:1000.
Si bé ambdós anticossos detecten la fosforilació de Thr202 i Tyr204 de la MAPK3 i Thr185 i Tyr187 de MAPK1 en el cas de Sigma, necessita dues fosforilacions conjuntes per a la detecció i en el cas de Cell Signaling amb una és suficient.
A més a més l'anticòs no reacciona de manera creuada amb els corresponents residus fosforilats, i és específic de fosforilació, és a dir no reconeix les MAPK quan no estan fosforilades.
El pes molecular és de 44 KDa (MAPK3) i 42 KDa (MAPK1).
- **Específics per a la detecció de MAPK6:** s'han utilitzat de la casa comercial Sigma i a una dilució de 1:8000. Aquest anticòs, igual que els anterior, es produeix en conill utilitzant com a immunogen un pèptid sintètic corresponent al terme C de *Arabidopsis thaliana* MPK6 (AtMPK6) 1a (aminoàcids 384-395).
El pes molecular és de 47 KDa.

Anticòs secundari

- **Específics per a la detecció dels anticossos primaris produïts en conill:** s'ha utilitzat de la casa comercial Sigma i l'anticòs està purificat a partir de l'antisèrum de cabra per cromatografia d'immunoafinitat i seguidament es conjuga amb *horseradish peroxidase* (enzim necessari per a la visualització dels resultats). Reacciona amb les cadenes pesants i lleugeres IgG d'anticòs de conill (els anticossos primaris estan sintetitzats en conill).
D'acord amb les instruccions de la casa comercial, ambdós anticossos s'han assajat a una dilució 1:6000.

MATERIAL DE LABORATORI

- Capses petites de plàstic per a guardar les membranes
- Cronòmetre
- Micropipetes i puntes
- Centrífuga (Eppendorf)
- Tubs d'assaig
- Pots de vidre

TAMPONS/REACTIUS

a) Tampons

PBS 10x	
Reactiu	Quantitat
NaCl	39,7 g
KCl	1 g
Na ₂ HPO ₄	7,24 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O MiliQ	Fins a 500 mL

(Comprovar pH a 7,4)

PBS + Tween20 0,1%	
Reactiu	Quantitat
Tween20	0,1 mL
PBS 1x	100 mL

Solució de bloqueig	
Reactiu	Quantitat
BSA 5%	0,5 g
PBS 1x Tween 0,1%	10 mL

PROTOCOL

1. Es bloqueja la membrana amb solució de bloqueig (PBS + Tween20 + BSA) durant 1h a T^a ambient amb agitació a 46 rpm.
2. Es fan 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tween20, agitant a 46 rpm. Important: guardar la solució bloquejant per a reutilitzar-la posteriorment.
3. S'hibrida tota la nit a 4°C i 46 rpm amb l'anticòs primari Anti-fosfo-MAPK3/MAPK1 o Anti-MAPK6.

Rabbit Anti-fosfo-MAPK3/1 1:1000 → 20 mL PBS-T + 20 µL d'anticòs (en tenim 100 µL)

Rabbit Anti-MAPK6 0,3 µg/mL 1:8000 → 20 mL PBS-T + 3,3 µL d'anticòs (en tenim 200 µL)

4. L'endemà es torna a preparar PBS-Tween20.
5. Es descarta la solució d'hibridació i fer 6 rentats de 5 min amb PBS-T (l'últim fer-lo de 15 min).
6. Es prepara la solució amb l'anticòs secundari. Primer es prepara la solució bloquejant (20 mL de PBS-Tween20 + 1 g BSA). Quan anem a fer l'últim rentat de 15 min, s'afegeix a la solució l'anticòs secundari: *Goat Anti-Rabbit Ig1 (HRP conjugate)*
7. S'hibrida 1 h a T^a ambient a 46 rpm amb l'anticòs secundari + 1,3 µL de *Precision Protein StrepTactin-HRP*.

Goat Anti-Rabbit IgG 1:6000 → 20 mL PBS-T + 3,3 µL d'anticòs (en tenim 500 µL)

8. Es fan 6 rentats de 5 min amb PBS-T.
9. Es fan 2-3 rentats amb aigua destil·lada estèril per eliminar les restes de Tween20 que puguin interferir en el revelat.

4.5.4 Revelat

En aquest pas del WB, mitjançant diferents reactius (ECL substrate i luminol, Millipore) i un equipament adequat (ChemiDoc MP, Bio-Rad), s'aconsegueix quantificar la proteïna existent a la mostra. En aquest pas cal programar l'aparell de quimioluminiscència (ChemiDoc MP) per obtenir les imatges de les bandes de proteïna; cal definir un temps d'exposició (el temps durant el qual el ChemiDoc pren imatges de la membrana) i el nombre de imatges a prendre durant el temps d'exposició. Una exposició massa perllongada fa que els reactius emetin un senyal que satura la imatge. Per contra, una exposició massa breu pot fer que la quantificació sigui menor que la real (els reactius no han estat en contacte suficient temps amb els enzims).

La HRP unida a l'anticòs secundari, catalitza la oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen. Com a resultat d'aquesta reacció, el luminol es descomposa emetent una senyal lluminosa, la qual recull el sistema de l'aparell ChemiDoc MP i ens permet detectar i posteriorment si és necessari quantificar la quantitat de proteïna específica present a la mostra.

MATERIAL DE LABORATORI

- H₂O MiliQ
- Micropipetes i puntes
- Pinces
- Aparell de quimiluminiscència Chemi Doc MP (Bio-Rad)

TAMPONS/REACTIUS

- a) Substrat Clarity™ i Clarity Max™ Western ECL Blotting de Bio-Rad

PROTOCOL

1. Es revela la membrana amb el substrat Clarity™ i Clarity Max™ Western ECL Blotting. Per un mini gel calen 3,5 mL de substrat.
 - a. Es posa la membrana de cares amunt i s'afegeix el substrat.
 - b. S'incuba 5 min a T^o ambient. Anar girant la membrana de tant en tant per tal que el substrat sempre estigui en contacte amb tota la membrana.
 - c. En cas de tenir més d'una membrana per revelar, primer posar el substrat en una. L'altra es deixa en aigua destil·lada fins que s'hagi analitzat l'anterior.
2. S'elimina l'excés de substrat i posar la membrana de cara amunt entre els dos plàstics evitant l'aparició bombolles.

4.5.5 Stripping

Stripping és el terme utilitzat per descriure l'eliminació d'anticossos primaris i secundaris d'una membrana del *Western Blot*. Aquest pas és necessari per estudiar més d'una proteïna amb la mateixa transferència, en el nostre cas concret primer s'analitzen les fosfo-MAPK3/1 i després les MAPK6. L'anàlisi de les MAPK6 servirà com a control de proteïna de la mostra.

Totes les mostres haurien de tenir la mateixa quantitat de MAPK6, independentment de si les MAPK3/1 estan o no fosforilades.

MATERIAL DE LABORATORI

- Pots de vidre
- Micropipetes i puntes
- Tubs anaclin de 100 mL
- H₂O MiliQ
- Campana extractora (CRUMA)

TAMPONS/REACTIUS

a) Tampons

TBST 10x	
Reactiu	Quantitat
NaCl	8,77 g
Tris	2,42 g
Tween 20	2 mL
H ₂ O MiliQ	Fins a 100 mL

(Comprovar pH a 7,8)

TBST 1x	
Reactiu	Quantitat
TBST 10x	25 mL
H ₂ O MiliQ	225 mL

Stripping buffer (1 membrana)	
Reactiu	Quantitat
Tris HCl 0,5 M	2,5 mL
SDS 20%	2 mL
β-mercaptà etanol	140 µL
H ₂ O MiliQ	Fins a 20 mL

Tris HCl 0,5 M	
Reactiu	Quantitat
Tris	6,057 g
H ₂ O MiliQ	Fins a 100 mL

(Comprovar pH a 6,8)

PROTOCOL

1. Després de l'exposició al film, es fan quatre rentats de la membrana durant 5 minuts cadascuna en TBST. Els millors resultats s'obtenen si la membrana no es deixa assecar.
2. Es prepara el tampó d'*stripping* a dins la campana d'extracció.
3. S'incuba la membrana durant 30 minuts a 50°C en tampó d'*stripping* (amb agitació suau).
4. ES fan sis rentats de 5 minuts amb TBST per eliminar les restes de tampó.
5. La membrana ja es troba a punt per a ser reutilitzada. Es comença de nou el protocol d'hibridació amb l'anticòs d'interès corresponent.
6. A partir d'aquí, es segueixen els protocols descrits als apartats 4.5.3 i 4.5.4.

4.6 ImageJ

ImageJ és un programa de processament d'imatge digital desenvolupat en el National Institutes of Health (Maryland, USA) que permet calcular l'àrea, la intensitat i estadístiques de valor de píxel de seleccions definides per a l'usuari de les imatges.

En el nostre estudi ens ha interessat utilitzar el programa per a calcular la intensitat de les bandes obtingudes en l'anàlisi per *Western Blot* traduint el píxels a distàncies. A partir de les distàncies ens calcula l'àrea que ocupa la zona mostrejada i ens presenta uns percentatges corresponents a la intensitat que presenta la selecció definida (banda de *Western Blot*). A partir d'aquí podem conèixer la intensitat de fosforilació de les MAPK estudiada (MAPK3/1) de manera objectiva i el percentatge de fosforilació respecte a la banda control (MAPK6).

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest treball es van plantejar inicialment dues plataformes de criba, ambdues basades en fulles de presseguer com a material vegetal, però assajades de manera diferent, *ex vivo* i *in planta*. Aquesta plataforma de criba està basada en la resposta molecular de presseguer a l'aplicació de pèptids elicitors de defensa. Per a posar a punt la/les plataformes es van utilitzar els Peps endògens de presseguer, PpPep1 i PpPep2. Es va treballar amb dues concentracions de Pep, 100 nM pels assajos *ex vivo* i 1000 nM pels assajos *in planta*. La diferència de concentració és deguda al tipus de mètode d'aplicació del pèptid. En els assajos *ex vivo*, el disc de fulla es submergeix en una solució de pèptid, per tant es garanteix una aplicació uniforme de les mostres i per tant la concentració aplicada pot ser més baixa. En els assajos *in planta*, es va augmentar la concentració a 1000 nM per garantir una bona exposició al pèptid ja que l'aplicació amb esprai és més heterogènia. A continuació, s'exposen els resultats que van obtenir-se per a cadascun dels procediments realitzats.

5.1 Extracció proteïna i quantificació pel mètode Bradford

L'extracció de proteïna és el mètode utilitzat per a provocar la lisi de les cèl·lules vegetals i alliberar les proteïnes intracel·lulars. Per a l'estudi, ens interessava purificar les proteïnes ja que volíem identificar proteïnes MAPK. Concretament, hem volgut estudiar la presència de la MAPK6 i les MAPK 1 i 3 fosforilades.

Una vegada extreta la proteïna total es va quantificar per tal de conèixer els rendiments del procés i determinar si eren adequats i/o suficients. Existeixen diferents mètodes de quantificació de proteïnes però els més utilitzats són els colorimètrics. Concretament, les mostres es van quantificar amb el mètode Bradford, que es basa en la reacció entre el colorant *Brilliant Blue G* del reactiu de Bradford amb les proteïnes de l'extracte. Aquest complex proteic desplaça l'absorbància màxima del colorant de 465 nm a 595 nm. D'aquesta manera, i amb la realització d'una recta patró d'albúmina bovina (BSA) de concentracions conegudes i amb la preparació d'un blanc de patrons vam poder quantificar les nostres mostres.

Com es pot observar en la figura 9, la recta patró obtinguda amb concentracions des de 0 a 20 µg/ml BSA va mostrar un coeficient de regressió (R^2) de 0,9993. Podem afirmar, doncs, que l'absorbància i la concentració de BSA tenen una relació lineal i que totes les concentracions de la recta patró inicialment plantejada determinen el rang de quantificació.

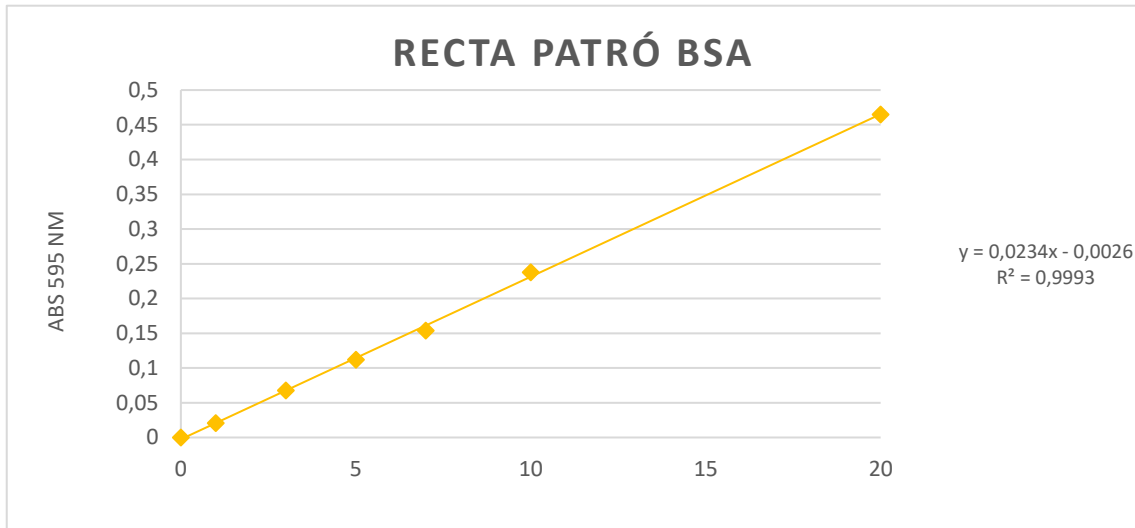


Figura 9. Relació de l'absorbància a 595 nm en funció de la concentració de BSA (µg/ml).

Es va aplicar un factor de dilució de 1/50 a cada mostra per a la quantificació de les mostres mitjançant espectrofotometria. Tal i com es mostra en la figura 10, totes les extraccions de proteïna mostren una absorbància que es troba dins del rang de quantificació.

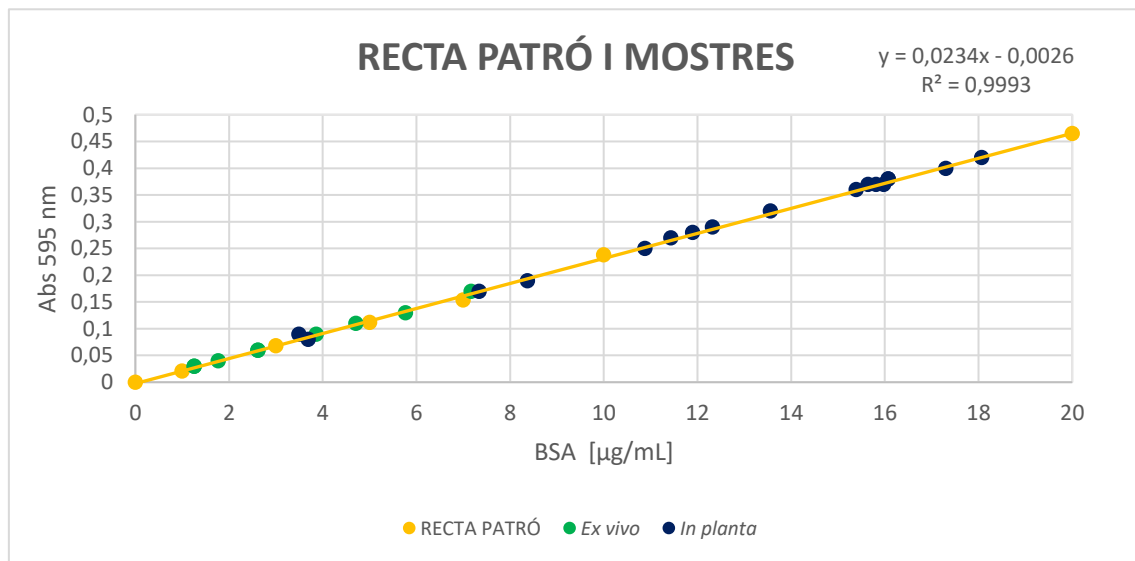


Figura 10. Relació de l'absorbància a 595 nm en funció de la concentració de BSA i de les mostres d'estudi. (µg/ml).

El càlcul de la concentració de proteïna es va realitzar mitjançant l'aplicació de l'equació de la recta patró:

$$y = 0,0234x - 0,0026$$

$$R^2 = 0,9993$$

Finalment per obtenir la quantitat de proteïna real a cada mostra, es va multiplicar el valor obtingut a partir de la recta patró, pel factor de dilució aplicat (taules 4 i 5).

Taula 4. Concentració ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de proteïna total de les mostres que fan referència a l'assaig *ex vivo*.

100 nM	PÈPTID 1					PÈPTID 2			
Temps exposició (min)	0	15	30	45	60	15	30	45	60
Concentració ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,13	0,06	0,09	0,06	0,13	0,29	0,36	0,19	0,24

Taula 5. Concentració ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de proteïna total de les mostres que fan referència a l'assaig *in planta*.

1000 nM	PÈPTID 1					PÈPTID 2			
Temps exposició (min)	0	15	30	45	60	15	30	45	60
Concentració replicat 1 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,80	0,20	0,18	0,37	0,42	0,59	0,54	0,78	0,80
Concentració replicat 2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,77	0,68	0,57	0,87	1,60	0,80	0,90	0,62	0,79

Com es pot observar en les taules 4 i 5 l'extracció de proteïna en general va ser més eficient en les mostres procedents de l'assaig en planta, ja que es parteix d'una quantitat de material més gran. També s'observa que les mostres corresponents a l'assaig *ex vivo*, l'aplicació del pèptid 1 corresponen a les menys concentrades i en canvi les mostres corresponents al segon replicat de Pep2 de l'assaig en planta, són les que en general mostren una concentració més elevada. Això s'atribueix a l'ordre en què es van realitzar les extraccions al laboratori. El domini de la tècnica es va anar adquirint a mesura que es processaven les extraccions. Les primers extraccions realitzades corresponien precisament a les menys concentrades. Tot i que seria convenient repetir l'extracció de proteïna de les mostres que s'ha obtingut poca quantitat de proteïna, es va disposar de suficient proteïna per realitzar l'anàlisi per *Western Blot*.

5.2 Western Blot

La plataforma/es de criba que s'ha posat a punt en aquest treball es basa en demostrar la fosforilació de MAPK, mitjançant la tècnica de *Western Blot*. Les proteïnes d'interès han estat les MAPK3/1 fosforilades i com a control s'ha utilitzat la proteïna MAPK6.

La clau per obtenir un resultat fiable i consistent en el *Western Blot* resideix en la interacció antigen-anticòs i, per tant, l'elecció dels anticòssos no s'ha de centrar solament en base de l'assaig d'immunodetecció, sinó atenen, a més a més, en els aspectes específics de les condicions de l'assaig, la naturalesa de l'antigen o el mètode de detecció utilitzat.

En el nostre estudi s'ha treballat amb dos anticòssos primaris i un de secundari. El primer anticòs primari era específic per a la detecció de MAPK3/MAPK1 fosforilades. L'anticòs s'ha unit a l'epítip Thr202 i Tyr204 de la MAPK3 i Thr185 i Tyr187 de MAPK1 respectivament. El pes molecular d'aquestes dues proteïnes és de 44 kDa (MAPK3) i 42 kDa (MAPK1).

En el nostre estudi també hem treballat amb una proteïna control, la MAPK6. També hem utilitzat un anticòs primari per la seva detecció. Li correspon un pes molecular de 47 kDa.

La utilització d'un anticòs secundari ens ha permès identificar les proteïnes fosforilades a través de la quimioluminescència que confereix l'enzim HRP acoblat a l'anticòs, ja que permet la identificació de les proteïnes d'interès a través de la seva identificació en separacions electroforètiques.

A la figura 11 es poden observar dos exemples de membranes revelades amb *Western Blot*, i que fan referència a estudis amb material *ex vivo* i *in planta*.

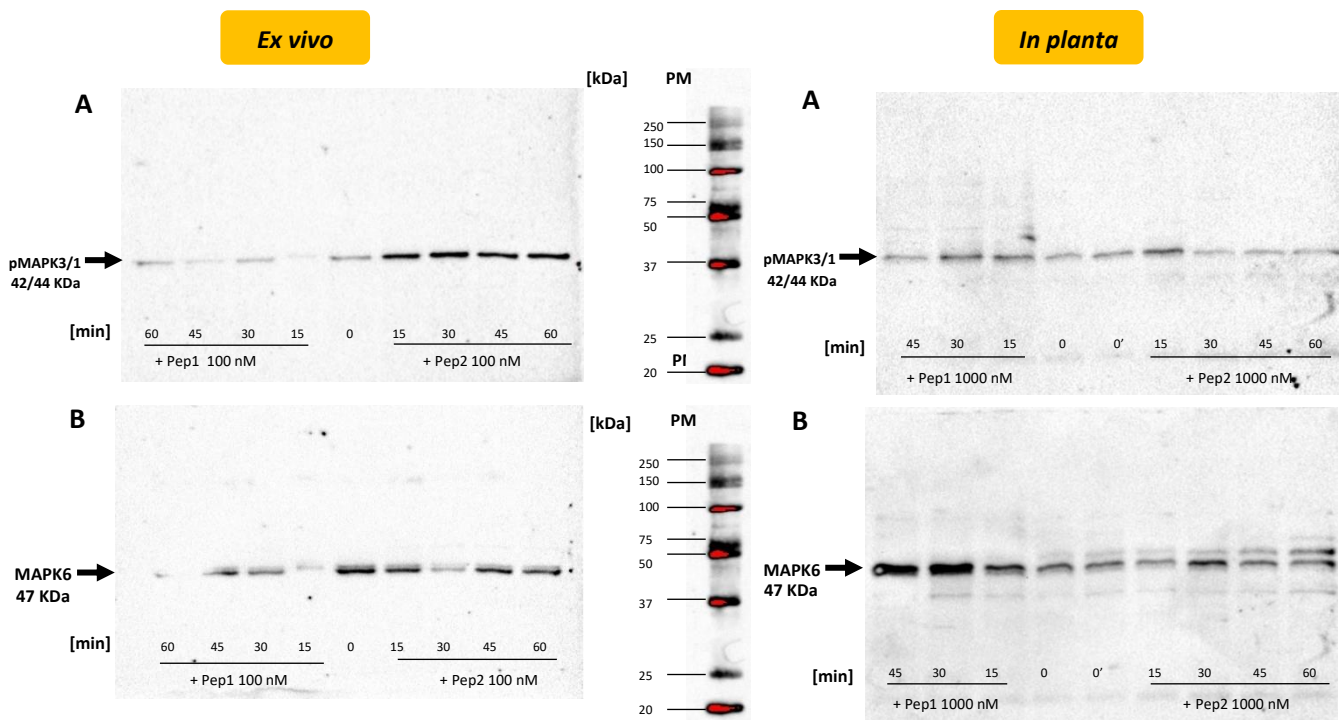


Figura 11. Exemples de *Western Blot* per *ex vivo* amb aplicació de pèptid 1 i 2 a 100 nM (esquerra) i *Western Blot* per *in planta* amb aplicació de pèptid 1 i 2 a 1000 nM (dreta). Utilització d'anticòs per detecció de MAPK3/1 fosforilades (A) i d'anticòs per detecció de MAPK6 (control) (B).

Primer de tot cal remarcar que s'ha aconseguit detectar de manera específica, tant per a les mostres obtingudes a partir dels assajos *ex vivo* com *in planta*, la banda corresponent a les MAPK3/1 fosforilades. Recordar que l'anticòs només detecta aquestes MAPK quan estan fosforilades. El pes molecular de les bandes obtingudes coincideix amb l'esperat (membranes A), concretament 42 kDa per MAPK1 i 44 kDa per MAPK3. Tot i ser dues proteïnes, només s'observa una banda perquè la mida del gel no és suficient per a resoldre com a diferents aquestes dues proteïnes que tenen un pes molecular pràcticament idèntic.

Els primers gels d'electroforesi SDS es van realitzar carregant 10 µg de mostra en 25 µL de volum de càrrega. Els resultats van indicar que era una concentració de proteïna massa elevada, ja que la membrana presentava molt de *background* i s'observaven moltes bandes que no es corresponien amb les proteïnes d'interès.

Es va millorar la tècnica i es van carregar, en el cas *ex vivo*, 1,5 µg en 25 µL de volum de carrega per les mostres p1 a t= 15, 30, 45 i 60 i 4 µg en 25 µL de volum de càrrega per les mostres a temps 0, p2 a t=15, 30, 45 i 60. I en el cas de *in planta* 4 µg en 25 µL per totes les mostres. La diferència de càrrega observada en *ex vivo* és a la poca quantitat que es va obtenir en la purificació de les mostres assajades amb Pep1. Al final del revelat es va obtenir una imatge digital de la membrana per tal de poder quantificar la intensitats de les bandes, tal i com s'explicarà més endavant.

La mateixa membrana, una vegada analitzada per l'anticòs fosfo-MAPK3/1 es va utilitzar per a l'anàlisi de la MAPK control, la MAPK6. Abans però d'incubar la membrana amb l'anticòs anti-MAPK6, la membrana s'ha de tractar per eliminar els anticossos prèviament utilitzats, mitjançant una tècnica anomenada *stripping*. L'*stripping* utilitzat ha estat eficient, i ens ha permès treballar només amb una membrana de transferència estudiant dues proteïnes diferents. Com es pot observar en la figura 11 (membranes B), s'han visualitzat bandes corresponents a les proteïnes MAPK6, tant en les mostres *ex vivo* com en *in planta* i en la majoria dels temps d'exposició proposats (0, 15, 30, 45 i 60 minuts). El pes molecular de les bandes observades, es correspon amb l'esperat per a la MAPK6, que és de 47 kDa. Es poden observar residus de bandes a la membrana B per *in planta* que, segons el pes molecular, correspondrien a restes de la primera hibridació amb l'anticòs primari de les MAPK3/1.

Per tant, en el marc del treball s'ha posat a punt la tècnica de *Western Blot* per a detectar les proteïnes d'interès MAPK3/1 fosforilades (44 i 42 kDa) i MAPK6 (47 kDa). A més a més, s'ha aconseguit posar apunt la tècnica per ambdues aproximacions experimentals, és a dir *ex vivo* i en *in planta*.

Una vegada identificades de manera específica les proteïnes d'interès es va procedir a la quantificació de la intensitat de les bandes per conèixer el patró de fosforilació les MAPK3/1 a diferents temps. Per a cada mostra, és imprescindible quantificar la banda corresponent a MAPK3/1 fosforilada i també la banda de la proteïna control, MAPK6. Tal i com s'ha comentat anteriorment, es quantifica la intensitat de les bandes mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge anomenat ImageJ. Per a la determinació del patró de fosforilació, per a veure si el grau de fosforilació varia en funció del temps d'aplicació de Pep, és necessari normalitzar el valor de MAPK3/1 amb el valor de la proteïna control MAPK6. Només així es pot calcular objectivament el percentatge de MAPK fosforilada respecte la MAPK control.

A la figura 12 es mostra un exemple del càlcul de la intensitat que fa el programa ImageJ. L'anàlisi calcula el percentatge d'intensitat de l'àrea de la selecció definida en base a la intensitat total de la membrana que s'analitza, és a dir, la suma de les intensitat de totes les bandes. Per a cada banda problema, s'obté un valor, que fa referència al percentatge d'intensitat de la banda en aquella membrana concreta.

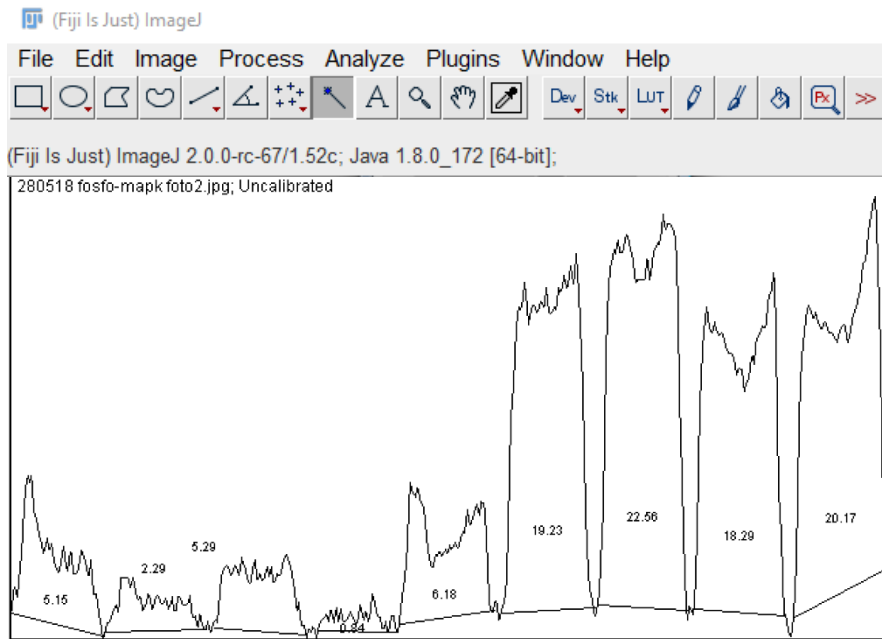


Figura 12. Àrea i intensitat de les bandes obtingudes en la membrana A *ex vivo* corresponent a la utilització d'anticòs específic per MAPK3/1 mitjançant la utilització de l'anàlisi d'imatge informàtic ImageJ. Els nombres indiquen el percentatge d'intensitat que representa cada banda en relació a la intensitat de total (suma de la intensitat de totes les bandes).

Totes les membranes obtingudes amb la tècnica de *Western Blot* es van analitzar de la mateixa manera. A la taula 6 es presenta la intensitat de cada banda, el percentatge d'intensitat respecte la suma d'intensitats de totes les bandes de la membrana i el càlcul de l'índex de fosforilació, calculat en base a la normalització de la intensitat de MAPK3/1 amb la intensitat de la MAPK control, MAPK6.

Taula 6. Valors d'intensitats, percentatges d'intensitat i índex de fosforilació normalitzats de les mostres *ex vivo* i *in planta*. Les fletxes indiquen pics intensos de fosforilació de les MAPK3/1 respecte la MAPK control.

Mostra	MAPK3/1		MAPK6		NORMALITZACIÓ MAPK3/1 vs MAPK6
	Intensitat MAPK3/1	% intensitat	Intensitat MAPK6	% intensitat	
P1 t=60	3349,69	5,15	n.d.	n.d.	n.d.
P1 t=45	1489,79	2,29	6780,57	10,05	0,2
P1 t=30	3441,05	5,29	6199,33	9,19	0,6
P1 t=15	546,77	0,84	1271,77	1,89	0,4
t=0	4025,45	6,19	16853,62	24,99	0,2
P2 t=15	12515,62	19,23	11111,38	16,48	1,2
P2 t=30	14683,67	22,56	3173,21	4,71	4,8
P2 t=45	11905,50	18,29	10994,62	16,30	1,1
P2 t=60	13129,54	20,17	10357,15	15,36	1,3

n.d.: no determinat degut a un problema de revelació de la membrana en aquesta zona de la membrana

Mostra	MAPK3/1		MAPK6		NORMALITZACIÓ MAPK3/1 vs MAPK6
	Intensitat MAPK3/1	% intensitat	Intensitat MAPK6	% intensitat	
P1 t=45	6569,78	9,68	12515,08	17,45	0,6
P1 t=30	14198,56	20,91	14284,81	19,92	1,0
P1 t=15	11013,76	16,22	7688,57	10,72	1,5
t=0	5172,50	7,62	5656,72	7,89	1,0
t=0'	6699,79	9,87	5960,69	8,31	1,2
P2 t=15	12269,40	18,07	3988,62	5,56	3,2
P2 t=30	3929,08	5,79	8052,57	11,23	0,5
P2 t=45	3751,98	5,53	5429,93	7,57	0,7
P2 t=60	4286,07	6,31	8126,44	11,33	0,6

Els resultats que es resumeixen a la taula 6, evidencien que hi ha fosforilació de la MAPK3/1 amb l'aplicació de Pep2, en les dues aproximacions experimentals assajades, és a dir tant *ex vivo* com *in planta*. Concretament, en les mostres obtingudes de l'assaig *ex vivo* s'observa un pic de fosforilació 30 minuts després de l'aplicació de Pep2, que disminueix a partir del minut 45. En l'assaig *in planta* s'observa fosforilació transitòria en el minut 15 després de l'aplicació del pèptid 2. La fosforilació no es prolonga en el temps, ja que a partir del minut 30 ja ha disminuït significativament. En el cas de Pep1, no es detecta un increment de les fosforilacions respecte a temps 0. Només podríem remarcar un petit increment en el minut 15 en l'assaig *in planta*, tot i així no esdevé significatiu.

Ortiz-Morea *et al.* (2016) ha treballat amb *Arabidopsis thaliana* i ha estudiat la resposta molecular d'aquesta espècie a l'aplicació del seu Pep endògen AtPep1. Entre diferents assajos experimentals que es troben en aquest article, presenten dos patrons de bandes. Després de realitzar 5 replicats biològics també van ser capaços de detectar fosforilació de MPK3/1 amb anticòs antifosfo p-44/p-42-MAPK. Per la hibridació dels epítops corresponents de les MAPK amb els anticòs específics es van utilitzar: antifosfo p42/44 per la MAPK3/1 i anti-p47 per la MAPK6 que esdevenen els mateixos utilitzats en el nostre estudi. Els nostres resultats mostren un patró de fosforilació en els temps inicials d'exposició al pèptid aplicat. Els pics de fosforilació es concentren entre 15 i 30 minuts després de l'aplicació de Pep2 i aquests temps concideixen amb els patrons de fosforilació que van obtenir Ortiz-Morea *et al.* (2016) treballant amb *Arabidopsis thaliana* i AtPep1.

Si bé els resultats obtinguts en el nostre estudi esdevenen molt interessants, ja que demostren que es poden detectar les MAPK3/1 fosforilades i les MAPK6 (control), convindrà repetir els experiments per tenir més replicats biològics i poder arribar a resultats més concloents, sobretot en el cas de l'assaig *ex vivo*. Hem comprovat que no s'observen diferències molt significatives pel que fa als resultats obtinguts amb les dues aproximacions experimentals, *ex vivo* i per *in planta*. Des d'un punt de vista de facilitat de maneig, l'aproximació *ex vivo* resultaria més adient, si bé té un punt crític, no estem treballant amb tota la planta sencera. En aquest sentit les repeticions biològiques haurien de validar i comparar les aproximacions, per tal de decidir si són totalment comparables.

Els resultats preliminars indiquen que hem sigut capaços de posar a punt una plataforma per a la criba de pèptids elicitors de les defenses de les plantes en presseguir. Hem comprovat que aquesta plataforma funciona, ja que es visualitzen fosforilacions de les MAPK3/1 pocs minuts després de l'aplicació del Pep i perquè hi ha evidències moleculars ja que s'activa la via de transducció del senyal vegetal, la cascada de proteïnes MAPK. Podem concloure que, sempre i quan es realitzin les repeticions experimentals necessàries per partir de més replicats biològics, ens trobarem davant d'un mètode factible, portable i manejable. La plataforma s'ha posat a punt amb els pèptids endògens de presseguir, però es preveu utilitzar-la, després dels ajustaments necessaris, per a la criba de pèptids elicitors modificats, per tal de trobar activitats millorades.

6. APLICABILITAT

La tasca desenvolupada en aquest treball d'inici en la recerca és aplicable a curt i a llarg termini. Per una banda, a curt termini hi ha l'aplicació de la plataforma per a la criba de pèptids estimuladors de defenses. A partir d'ara resultarà interessant la seva utilització per testar pèptids nous i millorats, que poden esdevenir possibles candidats com a productes estimuladors de defenses en presseguer. Per altra banda, l'aplicabilitat en agricultura és a llarg termini, ja que actualment els pèptids elicitors encara estan en fase d'estudis bàsics (o com a molt hivernacle), que són previs a la utilització en camp.

La investigació desenvolupada en aquest treball, sembla, d'entrada, estrictament molecular i bàsica. Però en canvi té una vessant d'aplicabilitat important, ja que ens ha permès dissenyar i posar a punt una plataforma de criba que servirà per identificar Peps candidats per ser utilitzats com a productes fitosanitaris. La recerca i innovació actual del sector agrícola, rau en establir un marc per aconseguir un ús sostenible de productes fitosanitaris: reducció dels riscos o dels efectes del seu ús per a la salut humana i el medi ambient, gestió integrada, plantejaments o tècniques alternatives a l'ús dels productes fitosanitaris, etc.

L'aplicació exògena de Peps, com a productes estimuladors de les defenses de les plantes podria suposar una millora en control de diversos fitopatògens. A més a més, entesos com a estimuladors naturals de defenses de les plantes, esdevenen interessants com a complements o alternatives capaços de reduir l'impacte al medi ambient, conferir una elevada eficàcia a dosis reduïdes i són de fàcil aplicabilitat.

7. CONCLUSIONS

En aquest treball s'ha posat a punt una plataforma per a la criba de pèptids elicitors capaços d'activar les defenses de la planta en presseguer. A partir dels resultats obtinguts es conclou:

- El rendiment d'extracció de proteïnes a partir del material vegetal utilitzat en les dues aproximacions experimentals, *ex vivo* (discos de fulla) i *in planta* (plantes) ha estat suficient per analitzar les mostres mitjançant *Western Blot*. Concretament, la quantitat de 4 µg de proteïna permet la detecció específica de les proteïnes d'interès.
- Mitjançant la tècnica de *Western Blot* s'han detectat de manera específica les MAPK1 i MAPK3 fosforilades, amb un pes molecular de 42 i 44 KDa respectivament; i les MAPK6 (control) amb un pes molecular de 47 KDa. La detecció ha estat efectiva en les dues aproximacions experimentals, *ex vivo* i *in planta*.
- La tècnica *stripping* utilitzada ha permès treballar només amb una membrana de transferència per mostra, optimitzant així el temps d'obtenció de resultats i facilitant-ne la interpretació, ja que de la mateixa mostra analitzada per *Western Blot* s'hi poden aplicar els dos anticossos primaris diferents (MAPK3/1 i MAPK6).
- El percentatge de MAPK3/1 fosforilada respecte la MAPK6 control s'ha pogut quantificar objectivament mitjançant ImageJ. S'han detectat canvis dels nivells de fosforilació en funció del temps d'exposició Pep2, amb un pic de fosforilació a 30 minuts després de l'aplicació en el cas de l'aproximació *ex vivo* i un pic a 15 minuts, completament en les mostres *in planta*. Després de l'aplicació de Pep1 no s'ha observat un canvi de patró de fosforilació respecte el temps 0.
- Les dues aproximacions experimentals assajades, *ex vivo* i *in planta*, poden esdevenir dues plataformes de criba factibles, ja que els resultats preliminars obtinguts per ambdós assajos són semblants. Des d'un punt de vista estrictament de plataforma de criba, l'aproximació *ex vivo* té avantatges ja que és més manejable i condicions d'aplicació d'assaig més homogènies, per tant seria més reproduïble.

8. BIBLIOGRAFIA

Aarouf, J., Garcin, A., Lizzi, Y., & Maataoui, M. E. (2008). Immunolocalization and histocytopathological effects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on naturally infected leaf and fruit tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of phytopathology*, 156(6), 338-345. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01364.x

Agro Pro Centroamerica S.A. (2009). Información técnica ACT-2. Recuperat de: <http://www.agroproca.com/>

Akbudak, B., Tezcan, H., & Eris, A. (2009). Evaluation of messenger plant activator as a preharvest and postharvest treatment of sweet cherry fruit under a controlled atmosphere. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(5), 374-386. doi: 10.1080/09637480701712420

Bartels, S., & Boller, T. (2015). Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of experimental botany*, 66(17), 5183-5193. doi: 10.1093/jxb/erv180

Bartels, S., Lori, M., Mbengue, M., van Verk, M., Klauser, D., Hander, T., ... & Boller, T. (2013). The family of Peps and their precursors in *Arabidopsis*: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of experimental botany*, 64(17), 5309-5321. doi: 10.1093/jxb/ert330

Belkhadir, Y., Yang, L., Hetzel, J., Dangl, J. L., & Chory, J. (2014). The growth–defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends in biochemical sciences*, 39(10), 447-456. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.006

Boudon, S., Manceau, C., & Nottéghem, J. L. (2005). Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology*, 95(9), 1081-1088. doi: 10.1094/PHYTO-95-1081

Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., ... & Eyassu, F. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431. doi: 10.1038/nature13909

Crisosto, C. H., Crisosto, G., & Bowerman, E. (2003, July). Understanding consumer acceptance of peach, nectarine and plum cultivars. In *International Conference on Quality in Chains. An Integrated View on Fruit and Vegetable Quality 604*, 115-119. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.604.10

Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826. doi: 10.1038/35081161

Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació (2009). La taca bacteriana dels fruiters de pinyol. Recuperat de http://agricultura.gencat.cat/web/.content/ag_agricultura/ag02_sanitat_vegetal/ag02_02_plagues/documents_plagues/fitxers_estatics/fitxa_63_xantomones_fruiters.pdf

Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació (2016). Plagues de quarantena. Recuperat de <http://agricultura.gencat.cat/ca/ambits/medi-natural/gestio-forestal/sanitat-forestal/plagues-quarantena/>

EFSA Panel on Plant Health (PLH). (2014). Scientific Opinion on pest categorisation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith, 1903). *EFSA Journal*, 12(10), 3857.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (2006). *Bulletin OEPP/EPPO*, 36, 129-133.

FAOSTAT, F. (2016). Agriculture organization of the united Nations statistics division (2014). Recuperat de: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>

FEN (2017). Melocotón. Recuperat de <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/melocoton.pdf>

Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

Generalitat de Catalunya (2015). Sanitat vegetal en fruiters de pinyol: on som? , 3–4.

Gfeller, A., Liechti, R., & Farmer, E. E. (2010). Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal.*, 3(109), cm4-cm4. doi: 10.1126/scisignal.3109cm4

Grennan, A. K. (2006). Plant response to bacterial pathogens. Overlap between innate and gene-for-gene defense response. *Plant physiology*, 142(3), 809-811. doi: 10.1104/pp.106.900207

Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual review of plant biology*, 48(1), 575-607. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.575

Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 10098-10103. doi: 10.1073/pnas.0603727103

Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., ... & Heberle-Bors, E. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science*, 7(7), 301-308. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02302-6

Iglesias, I. (2012). Producción, consumo e innovación varietal en el melocotón. *Alimentación, Equipos y tecnología*, 268, 25-31.

Bassi, D., & Monet, R. (2008). Botany and taxonomy. *The peach: botany, production and uses*, 1-36.

Lori, M., Van Verk, M. C., Hander, T., Schatowitz, H., Klauser, D., Flury, P., ... & Bartels, S. (2015). Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors: interfamily incompatibility of perception but compatibility of downstream signalling. *Journal of experimental botany*, 66(17), 5315-5325. doi: 10.1093/jxb/erv236

McCarty, D. R., & Chory, J. (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*, 103(2), 201-209. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00113-6

OEPP/EPPO (2003). Data sheets on quarantine organisms. *Xanthomonas arboricola pv. pruni*.

Ortiz-Morea, F. A., Savatin, D. V., Dejonghe, W., Kumar, R., Luo, Y., Adamowski, M., ... & Lu, Q. (2016). Danger-associated peptide signaling in Arabidopsis requires clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 11028-11033. doi: 10.1073/pnas.1605588113

Palacio-Bielsa, A., Cambra Alvarez, M. A., Tomás, L., & María, C. (2010). Sintomatología en almendro de la mancha bacteriana de los frutales de hueso *Xanthomonas arboricola pv. Pruni*.

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., Cubero, J., Cambroner, J. G., Roselló, M., & Lopez, M. M. (2014). La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola pv. pruni*), una grave enfermedad emergente en España. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (259), 36-43.

Ross, A., Yamada, K., Hiruma, K., Yamashita-Yamada, M., Lu, X., Takano, Y., ... & Saijo, Y. (2013). The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *The EMBO journal*, e201284303. doi: 10.1002/embj.201284303

Ruiz, C., Nadal, A., Foix, L., Montesinos, L., Montesinos, E., & Pla, M. (2018). Diversity of plant defense elicitor peptides within the Rosaceae. *BMC genetics*, 19(1), 11. doi: 10.1186/s12863-017-0593-4

Ruiz, C., Nadal, A., Montesinos, E., & Pla, M. (2018). Novel Rosaceae plant elicitor peptides as sustainable tools to control *Xanthomonas arboricola pv. pruni* in *Prunus* spp. *Molecular plant pathology*, 19(2), 418-431. doi: 10.1111/mpp.12534

Sánchez, J.Manuel (2012). Família Rosaceae. Recuperat de <http://www.arbolesornamentales.es/familias.htm>

Sánchez, J.Manuel (2012). *Prunus persica*. Recuperat de <http://www.arbolesornamentales.es/familias.htm>

Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., & Gross, A. D. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(48), 11613-11619. doi: 10.1021/jf504252n

Stefani, E. (2010). Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola pv. pruni*. *Journal of Plant Pathology*, S99-S103.

Westwood, M. N. (1993). Plant efficiency: growth and yield measurements. *Temperate Zone Pomology (3rd ed.)*. Timber Press, Portland, OR, USA, 220-228.

Wu, S., Shan, L., & He, P. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 228, 118-126. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.001

Yamaguchi, Y., & Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 351-357. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.001