

## **Treball final de grau**

**Estudi:** Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

**Títol:** INTERACCIÓ ENTRE PÈPTIDS ELICITORS DE LES DEFENSES DE LES PLANTES (PEPS) I ELS SEUS RECEPTORS EN PRESSEGUER

**Document:** Memòria treball experimental de recerca

**Alumne:** Sara Moreno Cintas

**Tutor:** Anna Nadal Matamala

**Departament:** Enginyeria química, agrària i tecnologia agroalimentària

**Àrea:** Tecnologia dels Aliments

**Convocatòria (mes/any):** Juny 2018

## ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	5
1.1 EL CULTIU DE PRESSGUER ( <i>Prunus persica</i> )	5
1.2 LA TACA BACTERIANA CAUSADA PER <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> ( <i>Xap</i> )	6
1.3 TRACTAMENTS PER A CONTROLAR <i>Xap</i>	8
1.3.1 Noves estratègies	9
1.4 EL SISTEMA DE DEFENSA DE LES PLANTES	10
1.4.1 Peps i interacció amb els receptors transmembrana (PEPRs)	11
1.5 ANTECEDENTS I PUNT DE PARTIDA DEL TREBALL	14
<b>2. OBJECTIUS</b>	16
<b>3. METODOLOGIA</b>	17
3.1 CULTIU DE NICOTIANA BENTHAMIANA	19
3.2 OBTENCIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS D' <i>E. Coli</i> DH5 $\alpha$	20
3.3 AMPLIFICACIÓ DELS RECEPTORS DE <i>PRUNUS PERSICA</i> (PpPEPRs), PROPEPs i PEPs	22
3.4 ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA	25
3.5 PURIFICACIÓ PRODUCTES DE PCR	27
3.6 L·LIGACIÓ DE L'AMPLICÓ AMB EL PLASMIDI I TRANSFORMACIÓ EN <i>E. Coli</i> DH5 $\alpha$	29
3.6.1 Reacció de lligació	29
3.6.2 Transformació a cèl·lules d' <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competents	31
3.7 SCREENING DE COLÒNIES PER A VERIFICAR LA L·LIGACIÓ	33
3.7.1 Preparació de les colònies a analitzar per PCR	33
3.7.2 PCR	34
3.8 OBTENCIÓ DELS PLASMIDIS TRANSFORMATS EN <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$	35
3.8.1 Preparació d'un cultiu O/N ( <i>overnight</i> )	35
3.8.2 Glicerinat	36
3.8.3 Minipreparació d'ADN plasmídic	37
3.9 REACCIONS DE RESTRICCIÓ	38
3.9.1 Reacció de restricció amb l'enzim <b>Sal I</b>	38
3.9.2 Visualització en gel d'agarosa de la reacció de restricció amb Sal I	39
3.9.3 Purificació del producte la reacció de restricció amb Sal I	39
3.9.4 Reacció de restricció amb l'enzim <b>Sbf I</b>	41
3.9.5 Purificació final de l'ADN tallat amb els dos enzims de restricció	41
3.10 L·LIGACIÓ DELS DOMINIS DELS RECEPTORS I DELS PROPEPS	41
3.10.1 Desfosforilació dels vectors	41
3.10.2 Reacció de lligació	43
3.11 TRANSFORMACIÓ EN CÈL·LULES <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ COMPETENTS	45
3.11.1 Obtenció de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i> DH5	45
3.11.2 Transformació en cèl·lules competents	45
3.12 SCREENING DE COLÒNIES PER A VERIFICAR LA L·LIGACIÓ	46
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	47

4.1	DISSENY DELS ENCEBADORS.....	47
4.2	AMPLIFICACIÓ DELS RECEPTORS DE <i>PRUNUS PERSICA</i> (PpPEPRS), PROPEPs i PEPs.....	49
4.3	FASE 1 CLONATGE: LLIGACIÓ DE L'AMPLICÓ EN EL PLASMIDI I TRANSFORMACIÓ EN <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	53
4.4	SCREENING CLONATGE FASE 1.....	53
4.5	REACCIONS DE RESTRICCIÓ AMB SBF I SALI.....	56
4.6	FASE 2 CLONATGE: OBTENCIÓ DEL PLASMIDI FINAL DONOR.....	58
4.7	SCREENING CLONATGE FASE 2.....	59
4.8	ESTUDI DE LES SEQÜÈNCIES DE PEPR1b, PROPEP1, PEP1 I PEP2.....	60
5.	<b>APLICABILITAT</b> .....	62
6.	<b>CONCLUSIONS</b> .....	63
7.	<b>REFERÈNCIES</b> .....	64

## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc, agrair a la Dra. Anna Nadal i la Dra. Maria Pla del grup de Tecnologia Agroalimentària de l'INTEA l'oportunitat d'haver pogut realitzar el meu treball de final de grau en el seu equip. Així mateix, agrair el suport i l'ajuda constant que m'han ofert durant tot el procés.

Especialment, vull agrair a la Laura Foix, que ha estat la persona que m'ha guiat en el projecte, la seva involucració, dedicació i ajut que m'ha ofert durant tot el projecte.

Finalment, donar les gràcies a tota la meva família i a l'Adrià pel seu suport incondicional i per recolzar-me en tot moment.

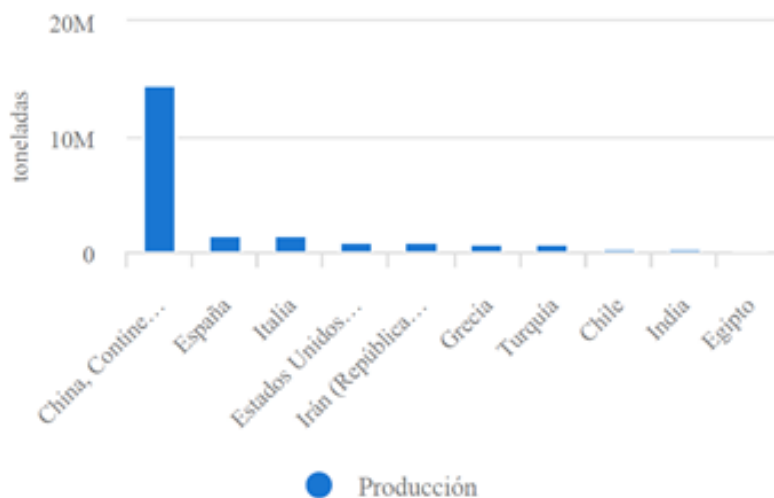
# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 EL CULTIU DE PRESSGUER (*Prunus persica*)

Dins de la família de les Rosàcies es troba, entre moltes altres, l'espècie *Prunus persica* que engloba els cultius de nectarina i presseguer. En els darrers anys, la producció del cultiu de presseguer ha augmentat gràcies als avenços tecnològics i una millora de les tècniques agronòmiques. Així mateix, la consciència sobre la salut dels consumidors ha comportat un augment de la demanda d'aliments que contenen compostos bioactius com són el cas dels fruits d'os, ja que contenen antioxidants i omega 3.

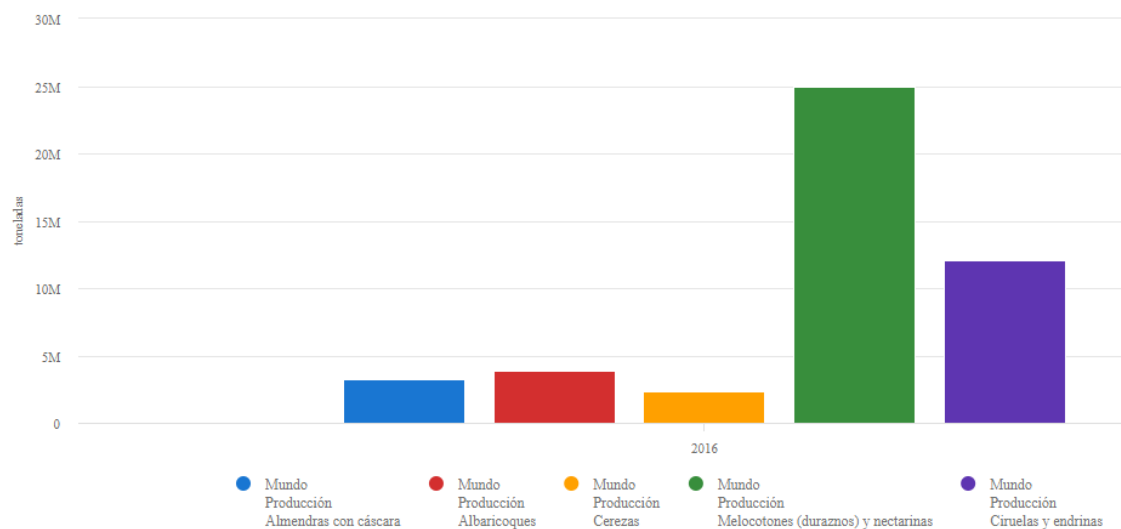
Actualment, la producció d'aquest cultiu es troba estesa arreu del món amb una superfície total de 1.639.925 hectàrees, essent les zones centrals i orientals d'Àsia els principals productors (FAOSTAT, 2016). L'any 2016 es van produir a nivell mundial 24,9 milions de tones (Mt) de préssecs i nectarines dels quals un 6,12% van ser proporcionades per Espanya. A nivell Europeu, les dades manifesten que els principals productors de presseguer són Espanya i Itàlia, essent Espanya el segon productor a nivell mundial de préssecs i Itàlia el tercer (FAOSTAT, 2016) (Gràfic 1), amb un producció de 1.529.919 tones i 1.427.573 tones, respectivament, l'any 2016.

La situació geogràfica del cultiu frutier es centra en zones amb climes mediterranis ja que necessita temperatures altes a l'estiu per a la maduració dels fruits i un requeriments mínims de fred. Així doncs, Espanya i Itàlia es converteixen en potencials productors d'aquesta fruita dolça.



**Gràfic 1:** producció (expressat en milers de tones) de préssecs i nectarines dels països més productors. Font: (FAOSTAT, 2016).

De les espècies del gènere *Prunus*, el préssec i la nectarina destaquen com a major producció mundial (Gràfic 2). Es pot concloure, doncs, que el cultiu de *Prunus persica* té una gran importància a nivell mundial així com a nivell local, tan productiva com econòmica. Per aquest motiu, és d'especial interès l'estudi per a una millora continua en la seva producció.



Gràfic 2: producció mundial (expressat en tones) de préssecs i nectarines. Font: (FAOSTAT, 2016).

## 1.2 LA TACA BACTERIANA CAUSADA PER *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*)

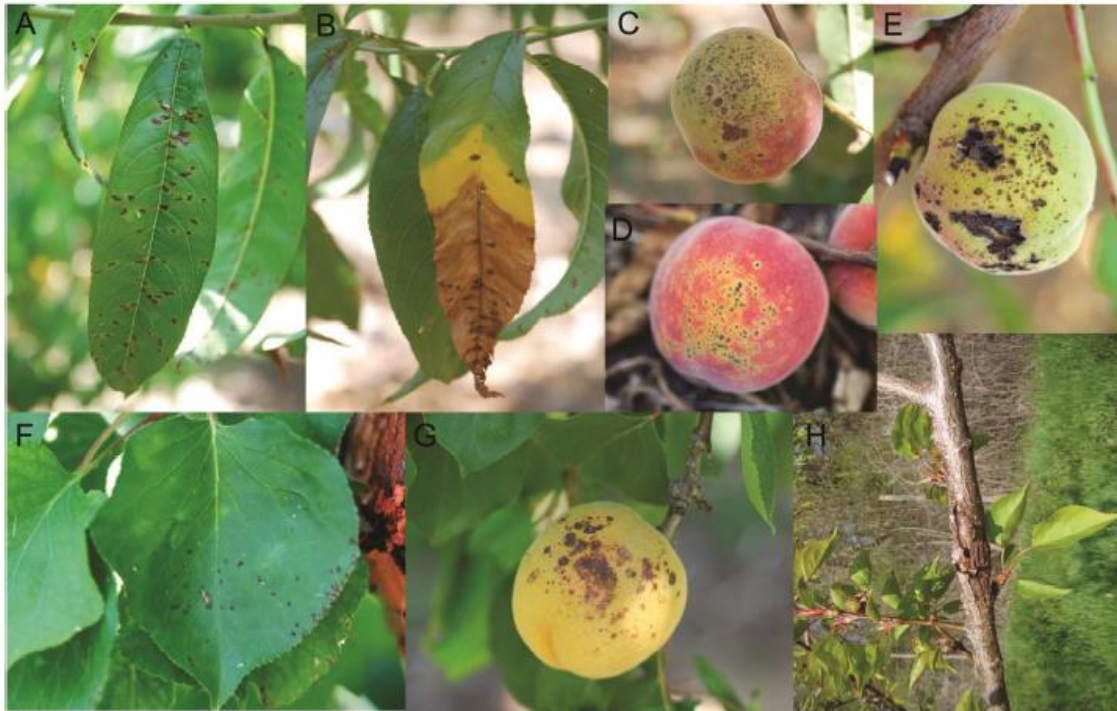
La problemàtica d'aquest cultiu resideix en la infecció de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) causant la taca bacteriana. Està considerat un patògen de quarantena a la Unió Europea per la seva fàcil disseminació i la baixa efectivitat dels mètodes de control químics. Es va identificar per primer cop a Estats Units el 1903 i actualment està present a molts països arreu del món. A Espanya, va ser identificada l'any 2000 a Extremadura.

Les primeres infeccions es produeixen a l'inici de la primavera quan la temperatura és suau i a les fulles es forma una pel·lícula d'aigua degut a les abundants pluges el qual afavoreix la infecció del bacteri a les fulles i, posteriorment, el desenvolupament de la malaltia fins als fruits. En les fulles es manifesta per primer cop a la superfície inferior com unes taques d'1 a 5 mm de diàmetre, de forma irregular o angular, de color verd pàl·lid o groguenc (Figura 1A). Al llarg del temps, els símptomes augmenten i també apareixen a la superfície superior de la fulla, on es veuen taques angulars i fosques. El teixit que les envolta es pot convertir en groc. El més freqüent és que les taques s'originin a la punta de la fulla (Figura 1B), que és

on s'acumulen els bacteris en gotes de pluja. Les fulles infectades es tornen grogues i cauen prematurament de la planta. En els fruits, sorgeixen petites taques a la superfície de color verd que amb el temps es necrosen i s'enfonsen (Figura 1C, D i E). Els símptomes sobre les branques (Figura 1H) es poden presentar de dues maneres (Ram, 2014):

- Durant la primavera poden aparèixer petites ampolles aquoses enfosquides quan surten les fulles i amb un halo verdós, que poden envoltar el branquilló produint-li la mort,
- A final d'estiu, apareixen taques morades més o menys enfonsades a la base de les insercions foliars que s'acaben necrosant.

No obstant, la malaltia també afecta a les funcions dels teixits de les plantes i produeix que l'arbre es debiliti progressivament fins a la seva mort.



**Figura 1:** símptomes típics en fulles, fruits i la branca de presseguer causats per *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Primers símptomes en la fulla (A) seguit per l'enfosquiment a la punta de la fulla i engroguiment al voltant (B). Lesions dels fruits (C, D i E) i esquarterament de la branca (H). Font: (Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragón, 2009).

### **1.3 TRACTAMENTS PER A CONTROLAR Xap**

Actualment, no s'han trobat mètodes prou eficaços per combatre la malaltia. Per aquesta raó, és fonamental que el control de la malaltia estigui basat en la combinació de diferents mesures de control que contempli mesures preventives, minimització de la sensibilitat del patogen, la disseminació del patogen i els seus nivells d'inòcul, així com l'optimització dels tractaments i l'entorn de la plantació (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015).

La utilització de material vegetal sa i lliure d'inòcul, procedent d'una empresa proveïdora de material vegetal autoritzada i acompanyat del Passaport Fitosanitari CE tal i com ho estableix el Reial Decret 58/2005 (MAPAMA, 2005), és de vital importància per evitar la propagació. El material vegetal que mostri símptomes, incloent les fulles infectades que cauen, els fruits que romanen adherits a l'arbre i els xancre d'hivern, primavera o estiu que serveixen de refugi pel bacteri, s'ha d'eliminar (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015).

El potencial hídric del teixit vegetal és un factor crític en el desenvolupament de la infecció. Està influenciat pel tipus de sòl, ja que un sòl humit és més sensible al patogen (Stefani, 2010). Els sòls adequats són els pedregosos i lleugers (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015). A més, una fertilització amb un excés de nitrogen també augmenta la sensibilitat, per tant, és preferible una aportació moderada de fertilitzants durant l'etapa de creixement abans que una aplicació abundant a la primavera (Stefani, 2010).

La utilització de tallavents s'ha mostrat eficaç en el control de la malaltia. No obstant, s'han d'eliminar les branques inferiors per permetre una bona ventilació. S'ha demostrat que pot disminuir la incidència de la malaltia fins a un 70%. Tanmateix, contribueixen en el control de la bacteriosis al minimitzar les microfissures de la làmina foliar i l'apertura estomàtica, disminuint les vies d'entrada del patogen. També, presenten un efecte positiu en el rendiment productiu del fruit degut a la disminució de l'estrès físic i hídric (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015).

Actualment, els mètodes de control i prevenció químics de la malaltia que es realitzen són tractaments fitosanitaris amb compostos cúprics (hidròxid cúpric, oxiclòrid cuprocàlcic, oxiclòrid de coure i sulfat tribàsic de coure) autoritzats pel Registre de Productes Fitosanitaris del Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient. La seva utilització és de la tardor fins a la floració amb l'objectiu de limitar la proliferació bacteriana i reduir la quantitat d'inòcul (MAPAMA, 2015). La dosi autoritzada és d'un màxim de tres aplicacions anuals, dins del període establert, i una quantitat màxima de coure per hectàrea a l'any dependent del compost utilitzat (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015). És l'estratègia més aplicada al camp (Stefani, 2010). És evident, doncs, que la utilització d'aquests productes fitosanitaris



afecta a la sostenibilitat del medi ambient i és per aquest motiu que s'estan estudiant noves estratègies per combatre la malaltia.

### 1.3.1 Noves estratègies

Durant els últims 50 anys, la protecció dels cultius s'ha basat en gran mesura en la utilització de plaguicides químics i sintètics. Aquests plaguicides tenen un impacte negatiu sobre el medi ambient, poden induir al desenvolupament de resistència en patògens i, a més a més, la seva eficàcia és limitada (Chandler, 2011). Per aquest motiu, s'han anat creant noves legislacions per tal de regular el seu ús.

La tendència actual és avançar cap a una agricultura més sostenible per tal de protegir el medi ambient evitant l'ús de productes contaminants. Així doncs, s'han desenvolupat alternatives de gestió de plagues basades en productes capaços d'estimular els mecanismes naturals de defensa de les plantes, com a alternativa total o parcial de productes fitosanitaris dirigits contra fitopatògens. Es tracta dels bioplaguicides, que són derivats d'extractes de matèries naturals de plantes, microorganismes o substàncies produïdes per aquests (Seiber *et al.*, 2014).

Existeixen diferents tipus de bioplaguicides, que es poden classificar segons l'ingredient actiu i la modalitat d'acció. Entre ells, es troben els bioplaguicides basats en substàncies bioactives capaces d'estimular la resposta immunitària dels mecanismes de defensa naturals de la planta. Les substàncies bioactives són proteïnes o altres substàncies que poden ser reconegudes pels receptors de les cèl·lules donant lloc a una cascada de senyals, és a dir, l'inici de la resposta immunitària.

Un exemple de producte basat en aquesta modalitat d'acció i que es pot trobar actualment en el mercat és el MSB, conegut amb la marca registrada ACT-2® (Figura 2). És un elicitador exogen de la resposta de defensa vegetal de tots els cultius agrícoles a determinades malalties i tipus de virus. També actua com a estimulador de determinades reaccions metabòliques de les plantes que són la base pel seu desenvolupament i creixement (Agro Pro Centroamerica S.A., 2011).



**Figura 2:** producte fitosanitari MSB estimulador del sistema de defensa de les plantes (Agro Pro Centroamerica S.A., 2011).

## 1.4 EL SISTEMA DE DEFENSA DE LES PLANTES

Les plantes han desenvolupat un sistema immune, també anomenat resistència basal, amb la finalitat de combatre les malalties causades per factors abiòtics, com xocs tèrmics, la sequera, diverses substàncies químiques, etc., i factors biòtics, com bacteris, fongs, virus i herbívors. La resistència basal consisteix en una sèrie de mecanismes de defensa també anomenats de protecció passiva, que consisteixen en barreres físiques amb la finalitat d'aturar, disminuir o contrarestar la infecció. Poden ser estructurals o químics. Els mecanismes estructurals són, per exemple, la presència de capes gruixudes de cutícula, deposició de ceres, etc. Els químics són l'acumulació a les cèl·lules vegetals de compostos tòxics (Beattie, 2008).

Per altra banda, les plantes poden detectar la invasió patogènica i activar un conjunt de mecanismes de defensa, o bé protecció activa (Beattie, 2008). En resposta al reconeixement d'uns patrons moleculars associats a patògens (*pathogen associated molecular pattern*, PAMPs) s'activen una sèrie de mecanismes coneguts com immunitat PTI (*patern (PAMP)-triggered immunity*) (Bartels and Boller, 2015). Correspon a la primera línia de defensa de les plantes contra els patògens.

Els PAMPs són molècules derivades dels patògens i elicitores de la resposta immune de la planta. Aquestes molècules són reconegudes per a receptors situats en la membrana plasmàtica, desencadenant així la resposta PTI (Tsuda and Somssich, 2015). Per tant, els mecanismes de defensa activats després del reconeixement amb el receptor són els responsables de la resistència contra els patògens, actuant sovint conjuntament per aturar la propagació del patogen (Madriz, 2002). Segons el seu origen, els patrons poden tenir denominacions diferents: patrons moleculars associats a microbis o patògens (MAMPs/PAMPs), patrons moleculars associats a virus (VAMPs) i patrons moleculars associats a herbívors (HAMPs) (Bartels and Boller, 2015).

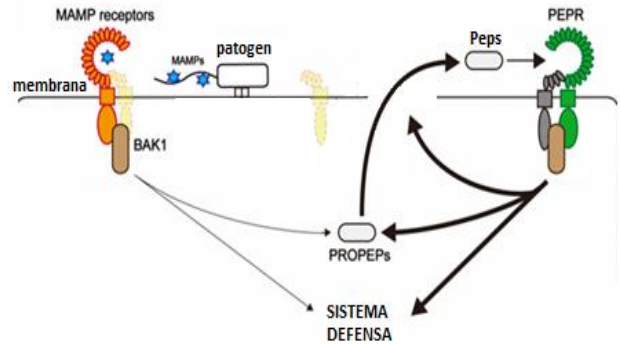
Una vegada el patogen ha estat detectat, es desencadena una reacció hipersensible (HR) que es coneix com la mort cel·lular programada en el lloc d'infecció que limita l'accés del patogen a l'aigua i els nutrients i per tant, el seu confinament (Beattie, 2008). S'inicia pocs minuts (0,5-2 minuts) després del reconeixement. Es produeix un augment del flux de  $H^+$  i  $Ca^{2+}$  cap a l'interior de la cèl·lula i del flux de  $K^+$  cap a l'exterior de la cèl·lula produint espècies reactives d'oxigen (ROS), conegut com explosió oxidativa. Les ROS poden matar el patogen directament o interferir en el seu creixement. També fortifica la paret cel·lular mitjançant l'encreuament oxidatiu de glicoproteïnes, genera barreres químiques com les fitoalexines i metabòlits secundaris, activa la cascada de quinases tipus MAPK, que activen factors de transcripció implicats en la immunitat de la planta, i l'activació de la resistència sistemàtica adquirida (SAR) (Tharkur *et al.*, 2013).

Per tant, es generen un conjunt de molècules que activen una via de transducció de senyal induint la formació d'hormones vegetals que són etilè i àcid jasmònic (JA), àcid salicílic (SA) i monòxid de nitrogen (NO).

Per altra banda, la resposta de defensa de la planta pot ser induïda per elicitors endògens de la planta. Durant la infecció de la planta, el patogen produeix productes de degradació com fragments de membrana cel·lular, monòmers de cutina o pèptids derivats de la degradació de proteïnes i són anomenats patrons moleculars associats a danys (DAMPs). Són reconegudes com senyals d'alarma per la planta (Boller, T. & Felix, G., 2009). Els DAMPS activen el sistema de defensa PTI de la planta. Un tipus d'elicitors endògens són els pèptids elicitors endògens (Peps) que activen i amplifiquen el sistema PTI (Figura 3).

#### 1.4.1 Peps i interacció amb els receptors transmembrana (PEPRs)

Els pèptids elicitors endògens són seqüències de pèptids de 20-23 aminoàcids que deriven de les seves proteïnes precursoras anomenades Propeps (Ruiz *et al.*, 2017). S'han identificat Peps en la majoria d'angiospermes i s'han estudiat en detall en plantes model de monocotiledònies i dicotiledònies (Lee *et al.*, 2018). La producció d'aquestes molècules està regulada per la pròpia planta i la seva activació, induïda per herbívors, patògens, PAMPs, etilè (ET) i JA, desencadena la resposta de defensa PTI similar a la dels PAMPs (Bartels and Boller, 2015) (Figura 3).

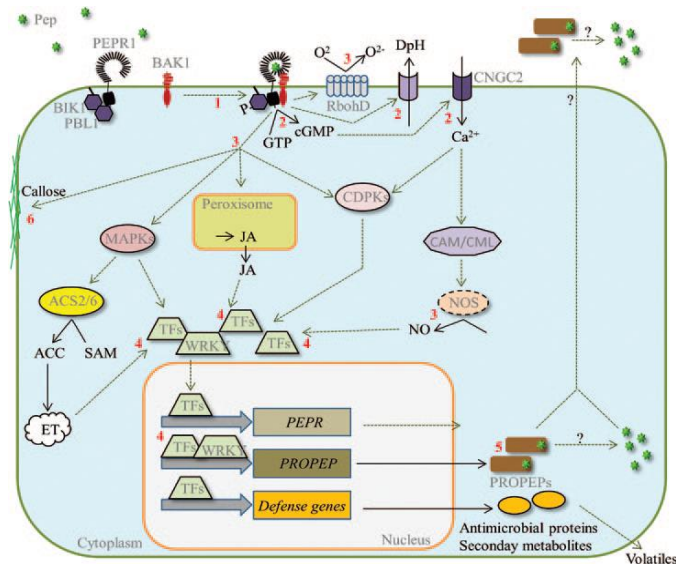


**Figura 3:** sistema MAMP i PEP a nivell molecular, (Yamada *et al.*, 2006).

Els Propeps són proteïnes d'uns 100 aminoàcids, que se sintetitzen durant els primers estadis de resposta de defensa de la planta. Tot i que encara no s'ha descrit el mecanisme, es creu que els Peps, un cop madurats a partir del Propep, surten de la cèl·lula (Figura 4). Seguidament aquests Peps són reconeguts a través dels dominis de repetició rics en leucina (LRR) pels receptors transmembrana anomenats pèptids elicitors endògens (PEPRs) (Lori *et al.*, 2015). El reconeixement PEPR/Pep és específic de família vegetal, és a dir els dominis LRR dels receptors són específics de família. Després del reconeixement, tot el que té lloc a dins la cèl·lula i que s'inicia amb el domini kinasa del receptor, és comú a totes les espècies vegetals (Lori *et al.*, 2015). La interacció entre el Pep i el seu receptor estimula la interacció entre el PEPR i el receptor quinasa associat a BIK1 (BAK1), i s'inicia una cascada de senyals, és a dir, l'inici de la resposta immunitària (Figura 4) (Ruiz *et al.*, 2017):

- Augment del nivell de  $Ca^{2+}$  en el citosol.
- Producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i òxid nítric (NO).
- Inducció de les vies de CDPK i MAPK que incrementen el nivell de ET i JA, el qual modulen/indueixen gens de defensa via factors de transcripció.
- Producció de metabòlits secundaris.

Aquesta via de defensa permetrà l'estimulació dels Propeps i conseqüentment, l'activació dels Peps que interaccionaran amb els PEPRs extracel·lulars produint un bucle de retroalimentació i amplificant la resposta de defensa de la planta contra els patògens (Ruiz *et al.*, 2017) (Figures 3 i 4).



**Figura 4: cascades de senyal després de la percepció del Pep.** La percepció del Pep pel PEPR condueix a l'heteromerització amb BAK1, la fosforilació de la quinasa i l'alliberament de BIK1 (1). A continuació, s'obren els canals iònics que condueixen a l'alcalinització del medi extracel·lular i probablement a l'entrada de  $Ca^{2+}$ . A més, els PEPR poden produir cGMP, que pot activar el CNGC2, donant lloc a una major aflluència de  $Ca^{2+}$  extracel·lular (2). L'augment de  $Ca^{2+}$  té un paper triple: és compatible amb l'activació de RbohD que produeix una explosió oxidativa (formació d' $O_2^-$ ), desencadena NO síntesis, probablement a través de sensors CaM i CML  $Ca^{2+}$ , i activa CDPK (3). En paral·lel, s'activen les cascades MAPK i augmenten els nivells de les hormones de defensa ET i JA (3). Tots aquests conjunts modulen l'activitat d'una multitud de factors de transcripció (TF), incloent WRKY, que al seu torn indueixen l'expressió gènica de defensa, així com la transcripció de PEPRs i Propeps (4). El Propep pot acumular-se o continuar processant-se en Peps alliberats (5). A la llarga, la percepció del Pep també condueix a la formació de cal·losa (6) i la inhibició del creixement de les plàntules (Extret de Bartels and Boller, 2015).

Malgrat l'augment de la caracterització de pèptids de senyalització vegetal, la seva dinàmica intracel·lular no ha estat prou estudiada. No obstant, alguns estudis descriuen que els receptors PEPRs són estructuralment semblants als receptors de membrana *Flagellin sensing 2* (FLS2) (Ortiz-Morea *et al.*, 2016). Es coneix, doncs, que la percepció de flg22, pèptid bacterià elicitor corresponent al domini més conservat del flagel·lin 22 i, per tant és un MAMP, indueix el tancament dels estomes, els llocs d'entrada d'infeccions, actuant com a mesura preventiva (Salomon and Robatzek, 2006). Quan es dona aquesta percepció, el receptor FLS2 internalitza ràpidament en forma de vesícules i es degrada disminuint la sensibilització de la cèl·lula pel patogen. Per tant, la internalització indica el reconeixement del MAMP i alhora, l'inici de la resposta de defensa de la planta.

## 1.5 ANTECEDENTS I PUNT DE PARTIDA DEL TREBALL

El sistema Propep/PEPR ha estat intensament estudiat en *Arabidopsis* i en blat de moro així com, la seva funció en la millora de la resistència contra patògens microbians a través de la inducció i amplificació del sistema immunitari innat. Fins fa poc, malgrat ser de gran importància econòmica, hi havia una escassa informació disponible de les seqüències de Propep i PEPR i la seva funció en la família de les Rosàcies.

El grup de Tecnologia Agroalimentària (TA) de l'INTEA (Institut de Tecnologia Agroalimentària) va iniciar el projecte d'identificació i caracterització del sistema Propep/PEPR en espècies molt més comercialitzades de la família de les Rosàcies.

El grup va identificar seqüències de Propep i PEPR en diferents espècies (i varietats) comestibles de Rosàcies: ametller (Pd), pomer (Md), albercoc (Pm), cirerer (Pa), nectariner (Pn), presseguer (Pp), perer (Pb), pruner (Pdo) i maduixer (Fa i Fv); així com en espècies ornamentals d'interès econòmic (Ruiz *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2018). Per a cada espècies es van identificar 2 Peps i 2 PEPR.

En *Arabidopsis thaliana* i *Zea Mays*, es coneixia que l'aplicació en fulles o plantes dels Peps corresponents, activava el sistema de defensa i conferia resistència a patògens (Yamaguchi *et al.*, 2010; Huffaker *et al.*, 2011). Es va estudiar la funcionalitat dels Peps identificats en rosàcies a través d'assajos planta-patogen, per tal de determinar si els Peps de rosàcies eren capaços de controlar la infecció per Xap. El grup va realitzar un assaig *ex vivo*, on es van inocular Xap a fulles d'un híbrid de *P. persica* X *P. dulcis* prèviament tractades amb PpPep1, PdPep1 i PpPep2 (idèntic que PdPep2). Els resultats van mostrar una diferència estadística entre el fenotip de les fulles pre-tractades amb Xap de les control (tractades amb aigua), demostrant així la capacitat dels Peps per a controlar la malaltia (Ruiz *et al.*, 2017). Posteriorment, els assajos es van repetir *in planta* (plantes hivernacle), i van confirmar el potencial que poden tenir aquests pèptids com a eina de control de la malaltia.

Actualment, el grup està interessat en estudiar a nivell molecular la interacció del Pep amb el PEPR, ja que aquesta interacció és clau per amplificar la resposta de defensa de les plantes. Estudis fets amb plantes d'*Arabidopsis thaliana* modificades genèticament, de manera que expressin el receptor FLS2 (receptor de la flagel·lina 22) fusionat a una proteïna fluorescent (GFP, green fluorescent protein), han demostrat, mitjançant observacions en microscòpia confocal, la endocitosis del receptor 1 hora després de la interacció amb

AtPep1 (pèptid elicitor de *A. thaliana*) (Ortiz-Morea et al., 2016). De la mateixa manera que es produeix la endocitosis del receptor FLS2, podria ser que en presseguer el receptor PEPR també internalitzes després del reconeixement dels propis Peps de *P. persica*. Per poder-ho estudiar cal fusionar al receptor de presseguer una proteïna fluorescent. La modificació genètica de presseguer, a dia d'avui és complicada. Així que el grup ha optat per fer un tabac transgènic que expressi el PEPR de presseguer fusionat a GFP i aplicar sobre tabac els pèptids de presseguer. L'estudi en aquest sentit, contribuirà en un millor coneixement de la interacció del sistema PEPR/Pep en rosàcies i en un futur, la pròpia planta transgènica de tabac podria esdevenir una plataforma de criba de pèptids millorats, ja que se sap que la interacció del Pep amb el PEPR depèn de seqüència. Una modificació en seqüència del Pep pot suposar una pèrdua de funcionalitat del propi Pep, per tant, abans d'utilitzar-lo en assajos és necessari saber si el pèptid té la capacitat, si més no, d'activar la resposta de defensa. Aquesta futura plataforma de criba es basaria en la observació, mitjançant microscòpia confocal de la internalització del receptor.

## 2. OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquest treball és obtenir les construccions gèniques i plasmidis intermediaris (pDONOR) per a produir en un futur plantes transgèniques de *Nicotiana benthamiana* que expressin gens de presseguer fusionats a una proteïna fluorescent. Concretament, els gens d'interès són: els receptors de membrana PEPR1a i PEPR1b, els Propeps 1 i 2 i els Peps 1 i 2.

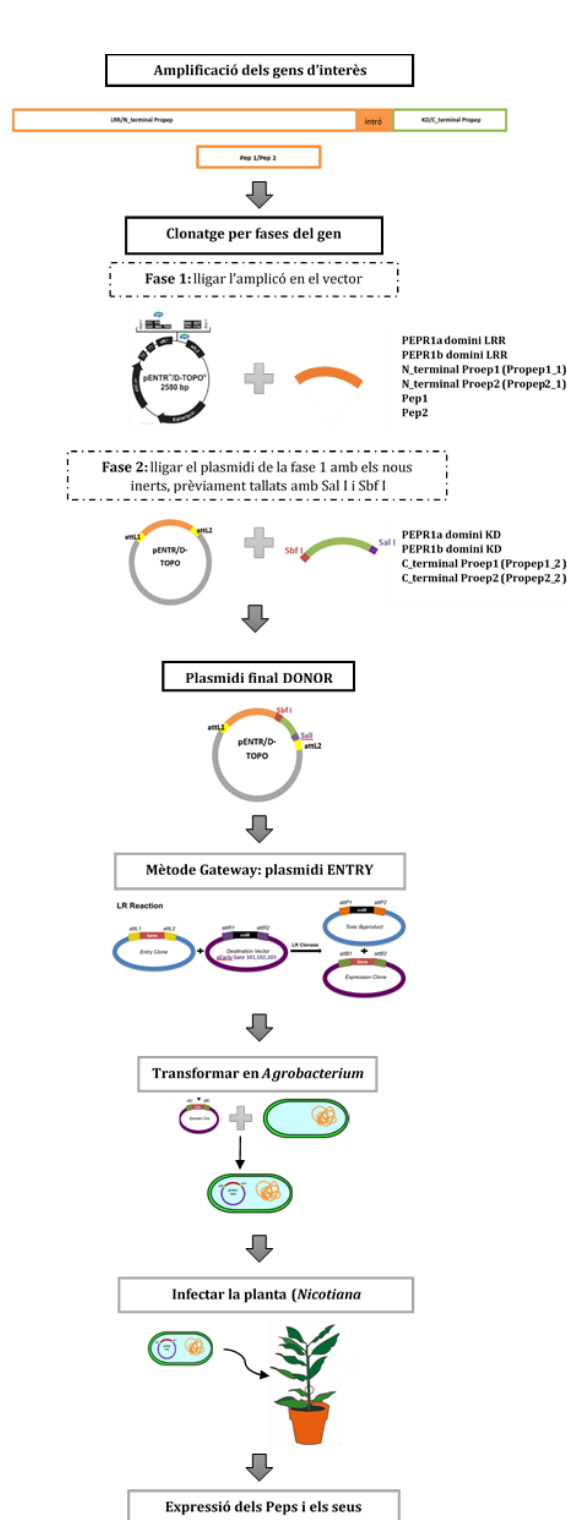
Per assolir aquest objectiu general, s'han definit quatre objectius concrets:

- Dissenyar encebadors específics per a poder amplificar i posteriorment clonar en pDONOR-TOPO® els diferents fragments d'ADN que formaran part de les construccions gèniques.
- Amplificar mitjançant PCR convencional els encebadors prèviament dissenyats i els fragments d'ADN que formaran part de cada construcció gènica.
- Clonar, mitjançant una estratègia per fases, les diferents seqüències que formaran part de cada gen d'interès. Concretament, obtenir els plasmidis pDONOR-PEPR1a, pDONOR-PEPR1b, pDONOR-Propep1, pDONOR-Propep2, pDONOR-Pep1, pDONOR-Pep2.
- Comprovar la seqüència de cada construcció gènica obtinguda mitjançant el mètode de seqüenciació Sanger.

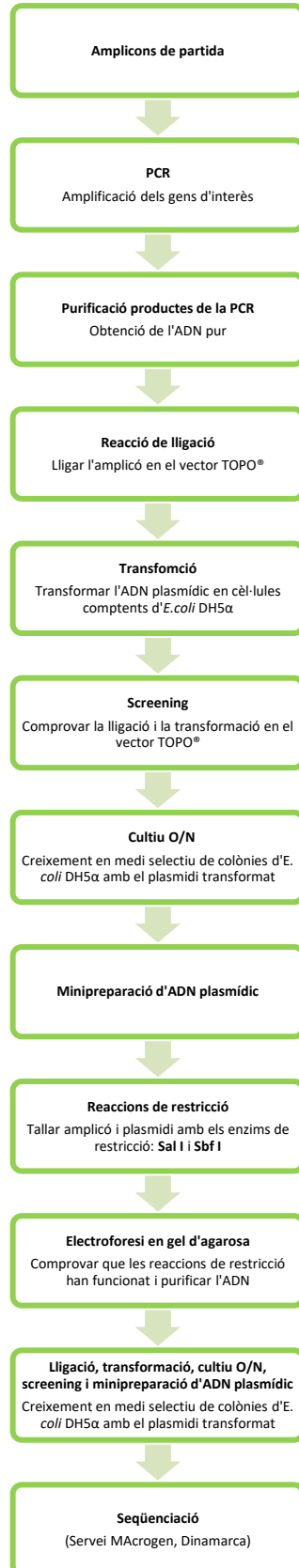


### 3. METODOLOGIA

Per l'estudi global de la interacció entre els Peps de presseguer i els seus receptors, s'ha de fer una planta transgènica de tabac. A continuació, es resumeix en un esquema la metodologia necessària. Remarcar que aquest treball contempla des de l'inici, l'amplificació dels gens d'interès fins a l'obtenció del plasmidi final DONOR.



En aquest segon esquema es detalla, en forma d'esquema, la part metodològica que s'ha portat a terme en aquest treball.



### 3.1 CULTIU DE NICOTIANA BENTHAMIANA

La *Nicotiana Benthamiana* és el material vegetal on finalment es faran les agrotransformacions per tal de tenir tabac transgènic que expressi receptors de membrana de presseguer, Propeps o Peps fusionats a una proteïna fluorescent. Durant aquest treball s'han obtingut part dels plasmidis i construccions que es necessiten per a aquest objectiu, tot i que per raons de temps dins del marc d'aquest treball no es podran realitzar les transformacions amb l'*Agrobacterium*. Tot i així, sí que he participat en la obtenció del material vegetal.

#### MATERIALS

- Llavors de *Nicotiana Benthamiana*
- Safata d'alumini amb petits forats a la base
- Paper de filtre
- Turba
- Tests
- Pincet

#### PROTOCOL

Es prepara una safata d'alumini, amb petits forats a la base per tal que l'aigua pugui drenar, plena de turba i es rega amb abundant aigua. Es tiren les llavors de la planta *Nicotiana Benthamiana* i es tapa amb paper de filtre. El paper ha d'estar moll per tal que les llavors tinguin un ambient humit.

Quan estan ben germinades (1 cm) es fan forats petits al paper. Després de 2-3 dies es pot retirar el paper.

Quan les plantes arriben a l'alçada de 2-3 cm (Figura 5) es poden trasplantar en tests més grans, també plens de turba. Durant la trasplantació s'ha d'anar molt en compte perquè les plantes són molt dèbils i es poden trencar fàcilment, millor utilitzar pincet.



**Figura 5:** plantes de *Nicotiana Benthamiana* amb una alçada de 2-3 cm.

Es trasplanten 12 plantes de 2-3 cm d'alçada en tests més grossos i es reguen per inundació, amb una safata amb abundant aigua a sota (Figura 6). Cada dilluns i divendres s'afegeix aigua a la safata per tal que les plantes tinguin suficient aigua per créixer adequadament. Si falta aigua les plantes es veuen com toves, poc turgents, i si tenen massa reg envelleixen, desenvolupa un color groc.



**Figura 6:** plantes de *Nicotiana Benthamiana* amb una alçada de 10-15 cm.

### 3.2 OBTENCIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS D'*E. Coli* DH5 $\alpha$

Per a introduir un plasmidi en una cèl·lula bacteriana és imprescindible que aquestes estiguin en un estat de competència perquè el plasmidi pugui ser introduït a l'interior de la cèl·lula. S'aconsegueix mitjançant permeabilització de la paret i membrana cel·lular. Un cop, són permeables a l'ADN s'anomenen cèl·lules competents. El sistema utilitzat per a fer les cèl·lules competents és mitjançant un tractament químic amb clorur càlcic.

#### MATERIALS

- Campana de flux laminar (Telstar)
- Criotub
- Tubs d'assaig
- Nansa de kolle
- Erlenmeyer
- Espectrofotòmetre (Shimadzu)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Tubs *eppendorfs* d'1,5 mL

#### REACTUS

- Medi LB
- Cèl·lules d'*E. coli* DH5 $\alpha$

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  50 mM amb un 15% glicerol estèril
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  50 mM estèril

## PROTOCOL

### **Dia anterior**

1. Rascar la superfície congelada del criotub amb *E. coli* corresponent amb una nansa de Kolle i seguidament inocular al tub amb 5 mL amb medi LB (Figura 7). Vortexar.
2. Cultiu de nit a 37 °C / 250 rpm.



**Figura 7:** (1) Tub d'assaig amb *E.coli*, (2) Erlenmeyer amb *E.coli* i 5 mL de medi LB incubats a 37°C i 250 rpm durant tota la nit i (3) medi LB estèril.

### **L'endemà – tot el dia**

1. Fer un reinòcul 1/100 del cultiu de nit:
  - a. DH5 $\alpha$ : 2,0 mL del cultiu de nit en 200 mL LB en un erlenmeyer amb un tap de gassa. (Els altres mL del cultiu de nit es refrigeren per si de cas.)
2. Fer créixer fins a una absorbància entre 0,6-0,8 a 600 nm → mesurar cada hora fins que assoleixi tal valor d'absorbància. Sol tardar 3h (37 °C/250 rpm).
3. Aliquotar en 4 tubs grans de centrífuga (de 50 mL) freds i estèrils. Treballar en gel.
4. Centrifugar a 4000 rpm / 4 °C/ 10 minuts.
5. Eliminar el sobrenedant.
6. Ressuspendre\* amb la ½ del volum inicial →
  - a. DH5 $\alpha$ : 25 mL 2,5 mL  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  50 mM estèril, que ha d'estar fresc i guardat a la nevera.

*\*molt cuidadosament, sense provocar turbulència, dirigint el volum de ressuspendre a la paret del tub.*

7. Deixar 45 min en gel.
8. Centrifugar novament a 4000 rpm / 4 °C/ 10 minuts.
9. Eliminar el sobrenedant.
10. Per a **congelar-les** a -70 °C:
  - a. ressuspendre\* 1/20 del volum inicial (que era 50 mL) amb 2,5 mL CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 50 mM + 15% glicerol estèril a cada tub.

\*molt cuidadosament, sense provocar turbulència, dirigint el volum de ressuspendre a la paret del tub.

11. Deixar 45 min en gel.
12. Aliquotar 100 µL en cada tub de 1,5 mL i congelar ràpidament a -70 °C (transportar amb gel sempre).

### 3.3 AMPLIFICACIÓ DELS RECEPTORS DE *PRUNUS PERSICA* (PpPEPRs), PROPEPs i PEPs

Per a obtenir moltes còpies de la seqüència dels receptors de *Prunus persica* (PpPEPR1a i PpPEPR1b), dels Propeps i del Peps s'utilitza la tècnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Aquesta tècnica permet una amplificació exponencial de seqüències específiques d'ADN. Consisteix en cicles repetits de tres processos successius: desnaturalització ADN, hibridació encebadors i elongació de les cadenes que es copien, on cada procés té lloc a una temperatura diferent (Figura 8).

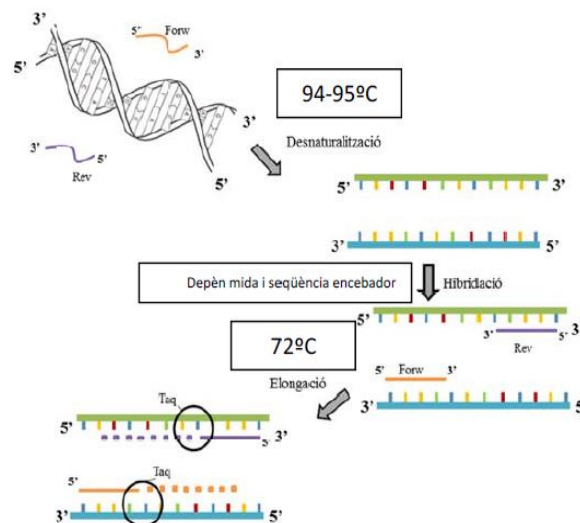


Figura 8: etapes de la PCR.

Les PCRs es realitzen a partir del que s'anomena un ADN motlle, que conté la seqüència que es vol amplificar (fer moltes còpies). A la taula següent, es mostra una relació del nom que rep l'ADN motlle (template), els encebadors utilitzats per a amplificar cada seqüència, la seva temperatura de melting, així com la mida de l'amplicó i la codificació posada al tub de PCR.

Degut que la seqüència d'ADN conté un intró entre el domini LRR i domini Kinasa (KD) del receptor i un intró el Propep i pep, l'amplificació i clonatge es fa per fases.

**Taula 1:** relació d'encebadors, mida d'amplicó

primer for	primer reverse	amplicó	codi	template
RA_LRR_for Tm1 = 57      Tm2= 61	RA_LRR_rev Tm1 = 59      Tm2= 72	2931	PEPRA LRR	1
RA_KD_for Tm1 = 61      Tm2= 70	RA_KD_rev Tm1 = 57      Tm2= 64	351	PEPRA KB	2
RB_LRR_for Tm1 = 57      Tm2= 61	RB_LRR_rev Tm1 = 59      Tm2= 72	2934	PEPRB LRR	3
RA_KD_for Tm1 = 61      Tm2= 70	RA_KD_rev Tm1 = 57      Tm2= 64	387	PEPRB KB	4
Propep1_for1 Tm1 = 56      Tm2= 61	Propep1_rev1 Tm1 = 61      Tm2= 69	339	Propep1_1	5
Propep1_for2 Tm1 = 60      Tm2= 70	Propep1_rev2 Tm1 = 60      Tm2= 66	81	Propep1_2	6
Propep2_for1 Tm1 = 59      Tm2= 64	Propep2_rev1 Tm1 = 60      Tm2= 74	309	Propep2_1	7
Propep2_for2 Tm1 = 57      Tm2= 63	Propep2_rev2 Tm1 = 59      Tm2= 65	87	Propep2_2	8
Pep1_for Tm1 = 60      Tm2= 66	Pep1_rev Tm1 = 60      Tm2= 75	73	Pep1	9
Pep2_for Tm1 = 60      Tm2= 66	Pep2_rev Tm1 = 60      Tm2= 75	76	Pep2	10

## MATERIALS

- Campana de flux laminar (Telstar)
- Tubs *ependorf* d'1,5 mL i de 200 µL (tubs de PCR)
- Puntetes i micropipeta

## REACTIUS

- H<sub>2</sub>O MiliQ
- Buffer *Expand High Fidelity* (Roche Diagnostics)
- Solució de MgCl<sub>2</sub>
- dNTPs
- Encebadors sentit i antisentit
- Enzim: *Taq polymerase Expand High Fidelity*® (Roche Diagnostics)

## PROTOCOL

La PCR es durà a terme amb l'ADN polimerasa *Expand High Fidelity*, que té activitat correctora 3'→5', per tal d'obtenir amplicons lliure de mutacions.

### ➤ Dilució dels encebadors sentit i antisentit

Els encebadors demanats i servits per la casa comercial SIGMA®, arriben liofilitzats en un tub.

1. S'afegeix la quantitat exacte d'aigua a cada encebador per tal d'obtenir-los a una concentració de 100µM. Barrejar bé amb el vòrtex i deixar reposar.
2. Després d'afegir l'aigua a cada encebador es fan alíquotes 1/10, afegint 5µL d'encebador i 45µL d'aigua. Barrejar bé amb la micropipeta.
3. Es guarden els tubs al congelador a -20°C.

### ➤ Preparació del MIX per a la PCR

1. Retolar 10 tubs de PCR amb codi de 1 a 10.
2. Preparar un MIX de PCR per a les 10 mostres, on no s'hi afegixen els encebadors ni l'ADN motlle. En la següent taula es mostren els volums que s'han d'afegir de cada reactiu (a concentració stock) per a obtenir en el tub final la concentració de treball.
3. Afegir els reactius com estan ordenats a la taula 2. Abans d'afegir cada reactiu s'ha de vortexar i centrifugar per homogeneïtzar bé, excepte l'H<sub>2</sub>O i l'ADN polimerasa, que només s'ha de centrifugar breument. Un cop afegit l'enzim ja es pot vortexar (suau) i centrifugar tota la barreja. **L'enzim sempre s'ha de mantenir en fred.**

**Taula 2:** preparació del MIX de PCR. Concentració inicial i final de cada reactiu.

Taq: Expand High Fidelity				MIX
reactiu	conc. stock	conc. final	ul/reacció	10,50
H2O (mínim)			31,25	328,13
buffer Expand High	10 x	1 x	5,00	52,50
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5 mM	8,00	84,00
dNTPs (TTP) Roche	10 mM de cada	200 uM de cada	1,00	10,50
Taq Expand High	3,5 U/ul	2,5 U/ul	0,75	7,88
<b>Total:</b>			<b>46,00</b>	<b>483,00</b>
primer_for	10.000nM	300 nM	1,50	-
primer_rev	10.000nM	300 nM	1,50	-
<b>Template</b>		10 ng/uL	1,00	
<b>TOTAL</b>			<b>50,00</b>	



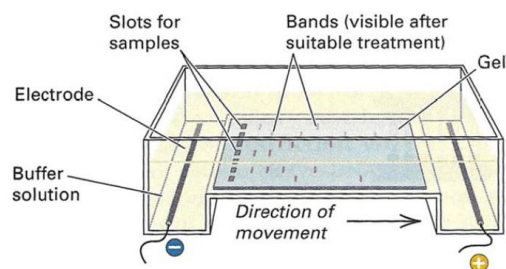
4. Afegir 46  $\mu\text{L}$  de MIX a cada tub de PCR.
5. Afegir 1,5  $\mu\text{L}$  de cada encebador (sentit i antisentit) (Taula 2).
6. Afegir 1  $\mu\text{L}$  de mostra d'ADN.
7. Inserir els tubs en el termociclador amb les següents condicions:

**Taula 3:** condicions per a la PCR amb l'enzim *Taq polymerase Expand High Fidelity*.

Condicions PCR: High Fidelity		
	2 minuts	94 °C
10	15 seg	94°C
	30 seg	<b>61 °C</b>
	<b>2 min</b>	<b>72 °C</b>
20 cicles	15 seg	94 °C
	30 seg	<b>61 °C</b>
	2 min + 5 seg	<b>72 °C</b>
	7 minuts	<b>72 °C</b>
	hold	10 °C

### 3.4 ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

Quan finalitza la PCR cal analitzar els productes obtinguts mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa. Aquest mètode permet la separació de fragments d'ADN en funció de la mida, és a dir, del nombre de parells de bases que continguin. L'ADN està carregat negativament, per tant sota l'aplicació d'un camp elèctric les molècules es mouen des del càtode (-) fins l'ànode (+) a través d'una matriu d'agarosa (Figura 9). Les molècules més curtes o petites són més ràpides i migren més lluny que les més llargues ja que les molècules més petites migren més fàcilment a través dels porus de gel.



**Figura 9:** electroforesi en gel d'agarosa. Sistema horitzontal per analitzar ADN.

Finalment, la visualització dels amplicons es realitza amb una tinció SYBR-SAFE®, producte específic per a la tinció d'ADN de doble cadena.

### MATERIALS

- Cubeta per a electroforesis horitzontal (BioRad)
- Font d'alimentació per a electroforesis (BioRad)
- Motlle per la preparació del gel
- Safata pel gel
- Pinta de 15 i de 20 per marcar els pous
- Capsa per la tinció del gel amb SYBR-SAFE®
- Agitador horitzontal (Nahita)
- Equip de fotodocumentació (Uvipro, Durviz)

### REACTIUS

- 80 mL de TAE 1X
- 1,6 g. d'agarosa (1,5%)
- 1 KB plus ladder (ThermoFisher)
- SYBR-SAFE® (ThermoFisher)

### PROTOCOL

1. Preparació del gel:
  - a. Pesar 1,6 grams d'agarosa i dissoldre-la en 80 mL de TAE 1X (Tampó concentrat: TAE 50x: TRIS, 484 g/L; àcid acètic glacial, 57,1 mL/L; EDTA, 0,5 M; pH 8.0).
  - b. Escalfar la solució en el microones, fins que l'agarosa estigui completament dissolta.
  - c. Deixar refredar la solució.
  - d. Preparar el motlle, mirar que estigui a nivell i tenir a punt la pinta.
  - e. Omplir el motlle amb l'agarosa líquida, col·locar la pinta i deixar polimeritzar.
  - f. Preparar les mostres amb el tampó de càrrega. (*xylene cyanol*, 0,25% p/v; glicerol, 30% p/v). Realitzar 11 microgotes sobre un tros de parafilm [10 mostres + pes molecular (*1Kb ADN Plus ladder, Invitrogen*)].
2. Carregar en el primer pou el marcador de pes molecular, i en la resta les mostres.
3. Fer córrer el gel a 90 volts durant 40 minuts. Procurar que l'elèctrode vermell estigui connectat amb el vermell i, el negre amb el negre.

4. Tenyir amb SYBR-SAFE® per a visualitzar les bandes de PCR en el gel durant 40 minuts.
  - a. Abocar el gel en la capsula específica per a realitzar la tinció amb SYBR-SAFE®. Si el gel és molt gran, retallar els costats amb un bisturí.
  - b. Afegir el SYBR-SAFE® fins a cobrir el gel.
  - c. Engregar l'aparell d'agitació continu.
  - d. Esperar 40 minuts.
5. Fotografiar el gel amb un equip de fotodocumentació.

### 3.5 PURIFICACIÓ PRODUCTES DE PCR

Després d'utilitzar la tècnica PCR per a obtenir moltes còpies de la seqüència d'interès, es purifiquen els productes de PCR obtinguts per eliminar les impureses i reactius de les reaccions i obtenir ADN pur. El procés de purificació es realitza amb el kit comercial QIAquick de QIAGEN.

Es recomana que la reacció de PCR tingui un volum mínim de 100 µL. Si no és el cas, afegir aigua MiliQ per aconseguir aquest volum final.

#### MATERIALS

- Tubs *ependorf* d'1,5 mL normals i siliconitzats
- Gradeta
- Puntetes i micropipeta
- Centrífuga sobretaula (Eppendorf)
- Columna
- NanoDrop (Nanotechnologies)
- Vortex

#### REACTIUS

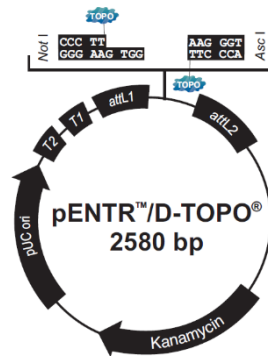
- Buffer PB o PBI,
- tampó PE i
- buffer EB (Elution Buffer), tots del QIAquick.

## PROTOCOL

1. Ajuntar els volums de cada mostra en un tub de 1,5 mL.
2. Afegir 5 volums del tampó PB o PBI per a cada volum de reacció de PCR (500 µL de buffer en 100 µL de producte de PCR) i vortexar per tal d'homogeneïtzar bé.
3. Aplicar la barreja dins la columneta (volum màxim 650 µL). Si es vol afegir un volum superior 650 µL:
  - 1r: Afegir 650 µL i centrifugar a 4000 rpm durant 3 minuts. Descartar l'eluit en un paper.
  - 2n: Acabar d'afegir el volum que queda en el tub i seguir amb el protocol.
4. Centrifugar a 4.000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir la centrifugació.
5. Descartar l'eluit en un paper.
6. Centrifugar a 13.000 rpm durant 30 segons i descartar l'eluit.
7. Rentar la mostra afegint 750 µL de tampó PE. Aquest tampó conté etanol el qual permet eliminar les impureses del producte de PCR (sals, encebadors, etc.) ja que l'ADN no és soluble amb aquesta solució.
8. Centrifugar a 4.000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir la centrifugació.
9. Descartar l'eluit.
10. Centrifugar a 13.000 rpm durant 1 minut per tal d'eliminar completament les restes d'etanol presents en la columna.
11. Posar la columneta en un tub de 1,5 mL siliconitzat (baixa retenció d'ADN).
12. Afegir 30 µL del tampó d'elució EB (*Elution Buffer*) al centre de la columna.
13. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.
14. Eluir l'ADN centrifugant a 4.000 rpm durant 3 minuts i 1 minut a 13.000 rpm. Posar les mostres en gel.
15. Finalment, quantificar 2 µL de mostra a l'espectrofotòmetre NanoDrop, per tal de saber la concentració d'ADN total i estimar la seva puresa (respecte a proteïna i compostos orgànics).

### 3.6 LLIGACIÓ DE L'AMPLICÓ AMB EL PLASMIDI I TRANSFORMACIÓ EN *E. Coli* DH5 $\alpha$

Una vegada obtinguts els amplicons de totes les seqüències es realitza la reacció de lligació en el vector TOPO® (ThermoFisher, Figura 10), per tal de tenir les seqüències clonades en un plasmidi (en aquest cas el plasmidi comercial TOPO®) i a continuació, es transformen els plasmidis en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$ .



**Figura 10:** mapa del vector pENTR™/D-TOPO® de 2580 parells de bases (ThermoFisher, 2012).

#### 3.6.1 Reacció de lligació

En aquestes reaccions de lligació, només es lligaran els fragments d'ADN corresponents a les seqüències LRR dels receptors (PEPR1a LRR i PEPR1b LRR) i les seqüències Propeps (Propep 1\_1 i Propep 2\_1). Les seqüències que fan referència als dominis Kinasa del receptor i a les pròpies seqüències Pep (PpPep1 i PpPep2), s'introduiran als plasmidis en passos posteriors.

Per a la reacció de lligació és molt important definir la ràtio molar en la qual s'efectua la lligació, és a dir la relació de parells de bases del vector respecte l'insert (pb vector:pb insert), per obtenir la quantitat d'insert que s'afegirà en la reacció. És recomana que la ràtio molar no sigui superior a 1:10 ja que pot generar un creixement de colònies pobre (New England Biolabs, 2018).

La fórmula que s'utilitza per calcular el mols finals del vector és:

$$(2 \times Xg) / (Ypb \times 649 Da/pb) = X \text{ mols}$$

A partir dels mols finals del vector es poden calcular els de l'insert:

$$\text{Mols finals vector} * 10 = \text{mols finals insert}$$

Finalment, es troba la quantitat d'insert que cal agafar per a la reacció de lligació.

$$\frac{2 \times X_{pb} \times 649 \frac{Da}{pb} \times 10^9}{mols \text{ final insert}} = Y \text{ ng insert}$$

### MATERIALS

- Puntetes i micropipeta
- Gradeta
- Tubs *eppendorf* d'1'5 mL
- Incubador (Eppendorf)
- Campana de flux laminar (Telstar)

### REACTIUS

- H<sub>2</sub>O estèril
- Solució salina
- Vector TOPO® (ThermoFisher)

### PROTOCOL

Després de realitzar la purificació dels producte de PCR, es va obtenir la concentració de les mostres mitjançant un espectrofotòmetre, el NanoDrop. La concentració de les mostres va ser molt elevada i per aquest motiu es va realitzar una dilució. Els càlculs de la dilució per a obtenir, a partir de la concentració desitjada, el volum de mostra (µL) a agafar són els següents:

$$\frac{\text{Concentració desitjada} \times \text{Volum final } (\mu\text{L})}{\text{Concentració purificació } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)} = \text{Volum mostra } (\mu\text{L})$$

El volum final és de criteri propi considerant que el volum de la mostra sigui superior a 1 µL.

$$\text{Volum H}_2\text{O} = \text{Volum final } (\mu\text{L}) - \text{Volum mostra } (\mu\text{L})$$

Un cop calculat el volum que s'ha d'agafar per a cada mostra, es procedeix a fer la dilució. Es retolen els tubs amb el codi de la mostra (Taula 4). S'afegeix el volum d'aigua i el volum de mostra en el tub corresponent.

Després es preparen 7 tubs més; 6 per a la lligació del producte de PCR i el vector TOPO® i 1 com a control negatiu (cèl·lules transformades només amb el vector). En cada tub s'afegeix:

**Taula 4:** reactius per a preparar el MIX de la PCR en l'etapa de lligació de vector-insert amb el respectiu volum.

Reactius	volum (uL)
aigua estèril	3
Salt solution	1
producte PCR diluït	1
Topo vector	1

La reacció de lligació s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient i finalment es guarda a 4°C.

### 3.6.2 Transformació a cèl·lules d'*E. coli* DH5α competents

Les reaccions de lligació es transformen en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5α. Les cèl·lules transformades es sembraran en plaques de petri amb medi LB i antibiòtic de selecció Kanamicina. Les colònies que siguin capaces de créixer són les que han incorporat el plasmidi amb el gen d'interès correctament lligat.

#### MATERIALS

- Incubador (Labnet)
- Plaques de petri
- Nansa de kolle
- Parafilm
- Centrífuga (Eppendorf)
- Campana de flux laminar (Telstar)

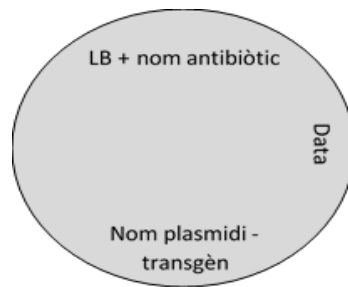
#### REACTIUS

- Cèl·lules competents d'*E. coli* DH5α
- Medi LB
- Medi LB amb Kanamicina (50 mg/mL; stock, 50 mg/L amb medi LB)

#### PROTOCOL

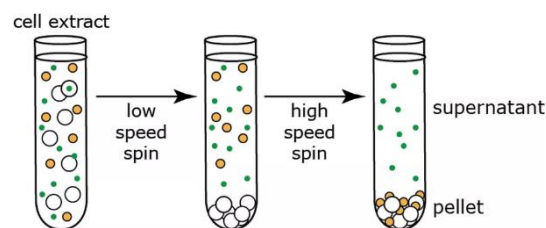
1. Un cop transcorreguts els 30 minuts, es descongelen en gel les cèl·lules competents *E. coli* DH5α. No vortexar i mantenir sempre en gel perquè són molt delicades.
2. Afegir l'ADN (plasmidi+insert) a transformar. Afegir tot el volum de la reacció de lligació (6 µL).
3. Barrejar suaument, sense vòrtex.

4. Incubar durant 30 minuts en gel.
5. Provocar un xoc tèrmic de 1 minut i 30 segons a 42°C per tal que el plasmidi entri dins la cèl·lula.
6. Posar els tubs en gel 10 minuts aproximadament.
7. Afegir 400 µL de medi LB a cada tub (sense antibiòtic; kanamicina) → 400 µL LB + 100 µL *E. coli* DH5α = 500 µL
8. Incubar durant 2 hores a 37°C amb agitació lenta (300 rpm). Mentrestant retolar les plaques amb medi LB i antibiòtic (Figura 11).



**Figura 11:** representació de com i quina informació s'ha de retolar a la placa de petri.

9. Sembrar directament (sense cap dilució) 150 µL en plaques que continguin LB i antibiòtic de selecció (kanamicina).
10. Centrifugar la resta de cultiu durant 5 minuts a 4.000 rpm i eliminar el sobrenedant.



**Figura 12:** separació del pellet i el sobrenedant mitjançant centrifugació.

11. Afegir 150 µL de medi LB sense antibiòtic. Barrejar-ho bé amb el dit fins que quedi homogeni.
12. Sembrar en plaques que continguin LB amb antibiòtic de selecció (sembrada centrifugada). En cas de que el nombre de cèl·lules transformades sigui baix, amb la sembra directe hi ha una probabilitat elevada de no observar colònies a la placa. És per aquesta raó que es centrifuga tota la resta de cultiu per a concentrar.



13. Parafilmar les plaques i incubar-les a 37°C durant tota la nit (*overnight*, O/N). Les colònies apareixen en 12-16 hores.
14. Comptar tan les colònies obtingudes a partir de sembra directa com concentrada.

### 3.7 SCREENIG DE COLÒNIES PER A VERIFICAR LA LLIGACIÓ

Per a comprovar que el vector TOPO®+insert s'ha introduït correctament en l'*E. coli* DH5α es realitza una PCR a partir de colònies repicades de la placa de petri. Posteriorment, els productes de PCR s'analitzaran mitjançant electroforesi en gel d'agarosa seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de la Metodologia.

#### 3.7.1 Preparació de les colònies a analitzar per PCR

##### MATERIALS

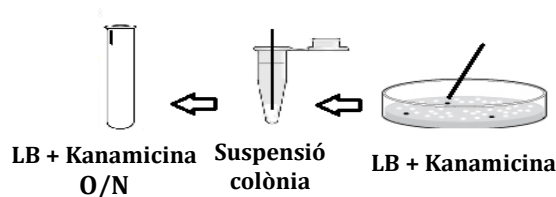
- Tubs *ependorf* d'1,5 mL
- Puntetes
- Campana de flux laminar (Telstar)

##### REACTIUS

- H<sub>2</sub>O MiliQ

##### PROTOCOL

1. Retolar 5 tubs per mostra per exemple, de la mostra TOPO® 1 doncs, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 i 1.5.
2. Afegir 20 µL d'aigua estèril a cada tub.
3. Agafar les colònies marcades a la placa amb una punta (sense clavar-la perquè com menys concentració hi hagi millor ja que després la PCR es podria inhibir) i introduir la punta en el tub
4. Deixar la punta en contacte amb l'aigua estèril durant una estona. Els bacteris de les colònies contenen ADN, que serà el motlle de la PCR.
5. Suspendre bé la punta per assegurar que el bacteri es dissol en l'aigua.



**Figura 13:** procés de suspensió de les colònies en un tub amb 20 µL d'aigua estèril.

### 3.7.2 PCR

A diferència de l'apartat 3.4, en aquesta PCR es treballarà amb l'enzim GoTaq Flexi DNA polymerase de PROMEGA®.

Els encebadors utilitzats en aquesta PCR es llisten a la taula 5. A més a més, a la taula s'indica la temperatura de melting de cada encebador, així com la mida de l'amplicó esperat i la codificació del tub.

**Taula 5:** encebadors utilitzats en la fase de *screening* de colònies.

primer for	primer reverse	amplicó	codi	
RA_LRR_for Tm1 = 57 Tm2= 61	RA_LRR_rev Tm1 = 59 Tm2= 72	2931	PEPRA LRR	1
RB_LRR_for Tm1 = 57 Tm2= 61	RB_LRR_rev Tm1 = 59 Tm2= 72	2934	PEPRB LRR	3
Propep1_for1 Tm1 = 56 Tm2= 61	Propep1_rev1 Tm1 = 61 Tm2= 69	339	Propep1_1	5
Propep2_for1 Tm1 = 59 Tm2= 64	Propep2_rev1 Tm1 = 60 Tm2= 74	309	Propep2_1	7
Pep1_for Tm1 = 60 Tm2= 66	Pep1_rev Tm1 = 60 Tm2= 75	73	Pep1	9
Pep2_for Tm1 = 60 Tm2= 66	Pep2_rev Tm1 = 60 Tm2= 75	76	Pep2	10

#### MATERIALS

- Campana de flux laminar (Telstar)
- Tubs *ependorf* d'1,5 mL i de 200 µl (tub PCR)

#### REACTIUS

- H<sub>2</sub>O MilliQ
- Buffer *5X Green color* (Promega)
- Solució de MgCl<sub>2</sub>
- dNTPs
- Encebadors sentit i antisentit
- Enzim: *GoTaq Flexi DNA polymerase de PROMEGA®*

#### PROTOCOL

1. Preparar el MIX segons la taula següent:

**Taula 6:** preparació del MIX de PCR. Concentració inicial i final de cada

reactiu	conc. stock	conc. final	ul/reacció	15,0
H2O (mínim)			29,75	446,25
5X Green or Coloress Buffer	5 x	1 x	10,00	150,00
MgCl2 Solution, 25mM	25mM	1,5mM	3,00	45,00
dNTPs (TTP)	2,5 mM de cada	200 uM de cada	4,00	60,00
primer_rev	10,000nM	200 nM	1,00	15,00
primer_for	10,000nM	200 nM	1,00	15,00
GoTaq DNA Polymerase (5u/ul)		1,25u	0,25	3,75
MIX/TUB			49,00	735,00
Template	colonies		1,00	
<b>TOTAL</b>			<b>50,00</b>	

2. Agafar 49 µL de MIX i afegir-los a un tub net de PCR degudament retolat.
3. Agafar 1 µL de colònia re-suspesa i, afegir-lo als 49 µL de MIX. Barrejat bé.
4. Posar les mostres en el termociclador. Seguint les condicions següents.

**Taula 7:** condicions per a la PCR amb l'enzim *Go Taq DNA polymerase*.

CONDICIONS PCR:		
	2 min	95°C
25 cicles	1 min	95°C
	1 min	<b>61 °C</b>
	3 min	72°C
	5 min	72°C
	Hold	4°C

5. Preparar el gel d'agarosa, fer córrer electroforesi i visualitzar segons el protocol detallat en l'apartat 3.4.

### 3.8 OBTENCIÓ DELS PLASMIDIS TRANSFORMATS EN *E. COLI* DH5α

Els plasmidis identificats com a correctes després de la PCR s'han de purificar a partir de les cèl·lules bacterianes.

#### 3.8.1 Preparació d'un cultiu O/N (*overnight*)

Preparar un cultiu líquid a partir de les colònies seleccionades com a positives amb medi LB i antibiòtic (Kanamicina).

### MATERIALS

- Tubs d'assaig
- Gradeta
- Puntetes i micropipeta
- Vortex
- Campana de flux laminar (Telstar)

### REACTIUS

- Medi LB
- Antibiòtic de selecció (Kanamicina, 50 mg/mL concentració stock)

### PROTOCOL

1. Afegir 5 mL de medi LB en el tub d'assaig.
2. Afegir 5 µL d'antibiòtic (Kanamicina)
3. Afegir 10 µL de mostra (colònia en aigua que per PCR ha donat positiva).
4. Vortexar per homogeneïtzar els productes.
5. Incubar a 37°C durant 14-16 hores perquè els bacteris creixin fins a la màxima densitat òptica.

### 3.8.2 Glicerinat

Els glicerinat es realitzen amb la finalitat de conservar, a -70°C les cèl·lules d'*E. coli* DH5α que contenen el plasmidi correcte. D'aquesta manera es pot tenir una mostra de reserva i poder tornar a activar, en el moment desitjat, el creixement del bacteri transformat.

### MATERIAL

- Puntetes i pipetes estèrils
- Criotubs
- Campana de flux laminar (Telstar)

### REACTIUS

- Glicerina (40%) a T<sup>a</sup> ambient i estèril

### PROTOCOL

1. Retolar els criotubs: *Nom bacteri-nom sencer vector-n<sup>o</sup> colònia-data*
2. Repartir 500 µL de glicerol al 40% a cada criotub .
3. Repartir 500 µL del cultiu O/N als criotubs. Per a la congelació, el cultiu ha d'estar sempre a una concentració final del 20 % de glicerol.
4. Guardar-ho a -70°C.

### 3.8.3 Minipreparació d'ADN plasmídic

La finalitat d'aquesta etapa és purificar el plasmidi a partir de l'*E. coli* DH5 $\alpha$  mitjançant el kit *NucleoSpin Plasmid* de QIAGEN®.

#### MATERIAL

- Falcons 15 mL
- Pipetes i puntes
- Gradeta
- Tubs *ependorf* d'1,5 mL i siliconitzats
- Vas de precipitats per a llençar les puntes
- Centrífuga (Eppendorf)
- Vòrtex
- Campana de flux laminar (Telstar)

#### REACTIUS

- Buffers A1, A2, A3, A4 i AE (*Elution buffer*) del kit *NucleoSpin Plasmid* de QIAGEN®

#### PROTOCOL

1. Retolar degudament els falcons.
2. Dipositar d'1 a 5 mL del cultiu O/N (en funció de la terbolesa) en un falcon sota la campana de flux laminar.
3. Si es treballa amb falcons-15, centrifugar a 4.000 rpm durant 5 minuts. Si es treballa amb tubs de 1,5 mL, centrifugar 30 segons a 11.000 g=rcf.
4. Descartar el sobrenedant.
5. Afegir 250  $\mu$ L de Buffer A1 (guardat en refrigeració), i resuspendre el pèl·let, i es resuspèn el pèl·let vortexant. Ha de quedar en solució.
6. Afegir 250  $\mu$ L de Buffer A2, que serveix per alliberar el plasmidi de DNA mitjançant una lisi de la membrana cel·lular del bacteri. Barrejar 6-8 vegades amb la mà i amb molta cura.
7. Incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. Retolar els tubs.

*Codi-vector - nom insert - número de colònia - data*

8. Afegir 300  $\mu$ L de Buffer A3, que té la funció de neutralitzar el lisat resultant. Barrejar 6-8 vegades amb la mà i amb molta cura.
9. Passar el contingut dels falcons tubs de 1,5 mL normals mitjançant pipetes amb puntes tallades i així obtenir una obertura més gran per no col·lapsar la punta amb el pèl·let.

10. Centrifugar 5 minuts a 11.000 g=rcf. Preparar la columneta amb el tub col·lector.
11. Centrifugar durant 3 minuts a 4.000 rpm. Buidar el contingut de tub col·lector.
12. Centrifugar 30 segons a 13.000 rpm.
13. Afegir 600 µL de Buffer A4, que serveix per eliminar metabòlits, sals i macromolècules, i centrifugar 3 minuts a 4.000 rpm. Buidar el contingut dels tubs.
14. Centrifugar 2 minuts a 13.000 rpm.
15. Canviar la columneta a un tub siliconitzat. Afegir 50 µL de Buffer AE, per eluir el DNA, i incubar 15 minuts a temperatura ambient. Preparar les etiquetes del tubs:

*Nom sencer del vector - n<sup>o</sup> colònia-data - concentració (nanodrop)*

16. Centrifugar 5 minuts a 5.000 rpm i sense buidar centrifugar 15 segons a 13.000 rpm.
17. Posar les etiquetes als tubs i quantificar 2 µL al nanodrop per saber la concentració d'ADN.
18. Guardar-ho a -20°C.

### 3.9 REACCIONS DE RESTRICCIÓ

Després de realitzar la purificació dels plasmidis, es procedeix a la segona fase del clonatge de les seqüències d'interès. En aquest cas es volen unir les seqüències que codifiquen pel domini LRR (ja estan al plasmidi) amb la seqüència del domini Kinasa (seqüència nova que s'ha d'entrar al plasmidi). El mateix passa amb el fragment de Propep (ja inserit) i Pep (seqüència nova que s'entra). Per a poder-ho fer, els productes de PCR obtinguts a l'apartat 3.3 amb els encebadors PEPR1bKD\_for/PEPR1bKD\_rev, Pep1\_for/Pep1\_rev i Pep2\_for/Pep2\_rev es tallen amb els enzims de restricció *Sal I* i *Sbf I*. Els mateixos enzims també s'utilitzen per a obrir el plasmidi i per tant crear complementarietat entre les dues cadenes. Sempre és recomanable fer-ho per separat i no amb els dos enzims perquè sinó el rendiment és inferior.

#### 3.9.1 Reacció de restricció amb l'enzim **Sal I**

Per calcular el volum que hem d'agafar de DNA per a tenir 1µg a cada reacció de restricció fem (ex. PEPRB\_LRR):

$$\frac{1000 \text{ ng}}{395,4 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 2,5 \mu\text{L de DNA}$$

### MATERIAL

- Tubs *eppendorf* d'1,5 mL
- Puntetes i micropipeta
- Gradeta
- Centrífuga (Eppendorf)
- Incubador (Sanyo)

### REACTIUS

- Buffer AE (Elution Buffer), del kit de NucleoSpin Plasmid de QIAGEN
- Buffer O (de l'enzim **Sal I**) (New England Biolabs)
- Enzim de restricció: **Sal I** (New England Biolabs)

### PROTOCOL

- Retolar els tubs de cada mostra.
- Realitzar un toc de centrifuga (1-2 segons) en el reactiu.
- Afegir el Buffer AE a cada tub. Els  $\mu\text{L}$  restants per completar un volum de 50  $\mu\text{L}$ .
- Afegir 5  $\mu\text{L}$  del Buffer O.
- Afegir els  $\mu\text{L}$  d'ADN segons el càlcul mostrat anteriorment.
- Afegir 0,5  $\mu\text{L}$  de l'enzim **Sal I**.
- Incubar durant 3 hores a 37°C.

#### 3.9.2 Visualització en gel d'agarosa de la reacció de restricció amb **Sal I**

Només en el del plasmidi, prèviament a la digestió amb *Sbf I*, s'analitza en gel d'agarosa la reacció de restricció *Sal I* per tal de comprovar que hagi funcionat correctament. La mida esperada de la banda en el gel és de 2580 (pb vector) + mida de l'insert. Es realitzen diferents controls, entre ells un control positiu de l'enzim **Sal I** per comprovar que realment funciona. En el gel també es carrega una mostra de plasmidi sense tallar. Es segueix el protocol descrit a l'apartat 3.4.

#### 3.9.3 Purificació del producte la reacció de restricció amb **Sal I**

Després de visualitzar el gel, i comprovar que l'enzim ha funcionat correctament, es purifiquen totes les reaccions de restricció (tant les que partien de producte de PCR com de plasmidi) per tal d'eliminar els reactius i alguna resta d'ADN no tallat que hagi pogut quedar. S'utilitza el *kit Nucleotide Removal* de QIAGEN.

## MATERIALS

- Puntetes i micropipeta
- Gradeta
- Centrífuga (Eppendorf)
- NanoDrop (Nanotechnology)
- Tubs *ependorf* d'1,5 mL i siliconitzats
- Columnetes *kit Nucleotide Removal*.

## REACTIUS

- Buffer PNI, PB, PE i EB (*Elution Buffer*) del *kit Nucleotide Removal*.

## PROTOCOL

1. Afegir 5 volums del tampó PNI per a cada volum de reacció de PCR (500 µL de buffer en 100 µL de producte de PCR) i vortexar per tal d'homogeneïtzar bé
2. Aplicar la barreja dins la columneta (volum màxim 650 µL). Si es vol afegir un volum superior a 650 µL:
  - 1r: Afegir 650 µL i centrifugar a 4000 rpm durant 3 minuts. Descartar l'eluit en un paper.
  - 2n: Acabar d'afegir el volum que queda en el tub i seguir amb el protocol.
3. Centrifugar a 4.000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir la centrifugació.
4. Descartar l'eluit en un paper.
5. Centrifugar a 13.000 rpm durant 30 segons i descartar l'eluit.
6. Rentar la mostra afegint 750 µL de tampó PE. Aquest tampó conté etanol el qual permet eliminar les impureses del producte de PCR (sals, encebadors, etc.) ja que l'ADN no és soluble en aquesta solució.
7. Centrifugar a 4.000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir la centrifugació.
8. Descartar l'eluit.
9. Centrifugar a 13.000 rpm durant 1 minut per tal d'eliminar completament les restes d'etanol presents en la columna.
10. Posar la columneta en un tub siliconitzat.
11. Afegir 30 µL del tampó d'elució EB (*Elution Buffer*) al centre de la columna).
12. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient. Mentrestant, anar a buscar gel.
13. Eluir l'ADN centrifugant a 4.000 rpm durant 3 minuts i 1 minut a 13.000 rpm.
14. Posar les mostres en gel.



15. Finalment, quantificar 2 µL de mostra a l'espectrofotòmetre NanoDrop, per tal de saber la concentració d'ADN total i la seva puresa.

#### 3.9.4 Reacció de restricció amb l'enzim **Sbf I**

Després de realitzar la purificació dels productes de la reacció de restricció amb *Sal I*, es fa la segona reacció de restricció amb l'enzim ***Sbf I***. Aquesta reacció de restricció es realitzarà amb les mostres purificades de la reacció de restricció amb l'enzim *Sal I*. Finalment, s'obtidran els fragments d'ADN tallats amb els dos enzims per a posteriorment, lligar-los. La funcionalitat de l'enzim també s'analitza per electroforesi en gel d'agarosa.

Les reaccions es realitzen igual que les de *Sal I* (3.9.1), però amb els reactius específics per a aquest enzim (buffer 4 i enzim *Sbf I*, New England Biolabs). Per a cada reacció s'afegeixen 26 µl d'ADN tallat i purificat (apartat 3.9.3).

#### 3.9.5 Purificació final de l'ADN tallat amb els dos enzims de restricció

Després de realitzar la reacció de restricció amb l'enzim *Sbf I*, s'han de purificar els fragments d'ADN. Els plasmidis tallats amb els dos enzims de restricció, es purifiquen de gel per tal d'eliminar qualsevol traça de vector original no tallat ja que podria interferir en fases de transformació posteriors. Els productes de PCR tallats, (seqüències amplificades de PpPEPR1b domini Kinasa, PpPep1 i PpPep2) es purifiquen directament mitjançant el *kit Nucleotide Removal de QIAGEN* seguint el protocol descrit a l'apartat 3.9.3.

### 3.10 LLIGACIÓ DELS DOMINIS DELS RECEPTORS I DELS PROPEPS

A partir de l'ADN pur obtingut després de la purificació dels productes de les reaccions de restricció, es realitza la reacció de lligació de les seqüències del domini Kinasa en el vector TOPO® (ThermoFisher) amb les seqüències que codifiquen pel domini LRR (ja inserit) per tal de tenir les seqüències d'ADN sense l'intró clonades en un plasmidi. El mateix procediment es fa amb les seqüències de Propeps (ja inserit) i de Peps (seqüència nova que s'entra).

#### 3.10.1 Desfosforilació dels vectors

Per tenir un rendiment més elevat en la reacció de lligació es desfosforila el vector TOPO® per evitar que recirculitzi i, per tant afavorir la lligació entre les seqüències ja inserides i les

noves seqüència per entrar. Es desfosforilen mitjançant l'enzim fosfatasa alcalina del kit *Rapid DNA Dephos & Ligation*.

Per saber la quantitat d'enzim necessària per a cada reacció, abans s'han de calcular els pmol finals de cada seqüència d'ADN. Es calculen mitjançant la següent fórmula (Promega, 2018):

$$\mu\text{g ADN} \times \frac{\text{pmol}}{660\text{pg}} \times \frac{10^6\text{pg}}{1\mu\text{g}} \times \frac{1}{N} \times 2 \times \frac{\text{kb}}{1000\text{pb}} = \text{pmol ADN finals}$$

A partir dels pmol finals de les seqüències d'ADN, es pot trobar el volum d'enzim per a desfosforilar els vectors. Es recomana (Roche, 2008) 0,05 unitats de buffer *dephos*.

$$0,05 \text{ unitats buffer dephos} = \frac{\text{Quantitat d'enzim}}{\text{pmol ADN finals}}$$

L'enzim fosfatasa alcalina es dilueix degut que la concentració obtinguda en la purificació final de l'ADN tallat amb els dos enzims de restricció (apartat 3.9.5) és molt baixa i per tant, el volum d'enzim necessari per la reacció és molt baix.

**Taula 8:** càlculs per a la desfosforilació dels vectors.

Càlculs Desfosforilació Vectors			
Mostra	pmol finals	Unitats <i>dephos</i>	µL a agafar d'enzim 1/100
Topo+RB_LRR col5 (miniprep)	0,18	0,009	0,90
Topo+Propep1_1 (miniprep)	0,38	0,019	1,90
Topo+Propep2_1 (miniprep)	0,26	0,013	1,30

#### MATERIALS

- Puntetes i micropipeta
- Gradeta
- Incubador (Eppendorf)

#### REACTIUS

- Buffer *dephos* 10X del kit *Rapid DNA Dephos & Ligation*
- Enzim fosfatasa alcalina del kit *Rapid DNA Dephos & Ligation*

## PROTOCOL

**Taula 9:** volums de cada reactiu per a la desfosforilació dels vectors.

Desfosforilació vectors			
reactiu	Topo+RB_LRR col5	Topo+Propep1_1	Topo+Propep2_1
vector	26,00	26,00	26,00
buffer (10X)	3,00	3,00	3,00
fosfatasa alcalina (1/30)	0,90	1,90	1,30

1. Diluir l'enzim fosfatasa alcalina 1/100: 99 µL d'H<sub>2</sub>O i 1 µL d'enzim.
2. Afegir, en el tub *ependorf* del corresponent vector, el buffer *dephos* 10X.
3. Afegir l'enzim fosfatasa alcalina.
4. Incubar a 37°C durant 30 minuts.
5. Deixar refredar fins a temperatura ambient.
6. En el cas que no es realitzi la reacció de lligació directament, guardar les mostres al congelador a -20°C.

El temps d'incubació és de 30 minuts degut als extrems creats després de realitzar les dues reaccions de restricció. L'enzim *Sbf I* talla les seqüències d'ADN deixant extrems complementaris amb l'extrem 3' recessiu (Figura 14). En el cas de l'enzim *Sal I*, després de la reacció de restricció, l'enzim genera extrems complementaris amb l'extrem 3' (Figura 15), al revés que l'enzim *Sbf I*.



**Figura 14:** extrems del vector generats per l'enzim **Sbf I** en la reacció de restricció. Font: (New England BioLabs, 2018)



**Figura 15:** extrems del vector generats per l'enzim **Sal I** en la reacció de restricció. Font: New England BioLabs, 2018).

### 3.10.2 Reacció de lligació

Després de realitzar la desfosforilació, es lligaran les seqüències noves en els vectors TOPO® amb les seqüències ja inserides en l'apartat 3.6.

## MATERIALS

- Gradeta
- Puntetes i micropipeta
- Tubs *ependorf*
- Vortex
- Centrífuga (Eppendorf)

## REACTIUS

- DNA Dilution Buffer 5X del kit Rapid Dephos Ligation
- H<sub>2</sub>O
- tDNA ligation buffer 2X del kit Rapid Dephos Ligation
- t4 DNA ligase del kit Rapid Dephos Ligation

## PROTOCOL

En les taules 10, 11 i 12, es mostren els volums finals (µL) de cadascun dels reactius per a cada reacció de lligació.

**Taula 10:** volum (µL) necessari de cada reactiu per a la reacció de lligació del vector TOPO® i l'insert PEPRB\_LRR amb l'insert PEPRB\_KD.

RATIO 1:10	TOPO + RB_LRR (3) : RB_KD (4)		
	Quantitat final	Concentració inicial (ng)	Volum (µL)
Reactiu			
Vector	50 ng	10,6	4,72
Insert	34 ng	12,7	2,68
DNA dilution buffer 5x	1x		2,00
H2O	fins a 10 µL		0,61
Vortexar			
tDNA Ligation Buffer 2x	1x		10,00
t4 DNA Ligase	5U		1,00
Vortexar i incubar O/N a 18-20 °C			

**Taula 11:** volum (µL) necessari de cada reactiu per a la reacció de lligació del vector TOPO® i l'insert Propep1\_1 amb l'insert Propep1\_2.

RATIO 1:10	TOPO + Propep1_1 (5) : Propep1_2 (6)		
	Quantitat final	Concentració inicial (ng)	Volum (µL)
Reactiu			
Vector	50 ng	11,9	4,20
Insert	25 ng	21,8	1,15
DNA dilution buffer 5x	1x		2,00
H2O	fins a 10 µL		2,65
Vortexar			
tDNA Ligation Buffer 2x	1x		10,00
t4 DNA Ligase	5U		1,00
Vortexar i incubar O/N a 18-20 °C			

**Taula 12:** volum (µL) necessari de cada reactiu per a la reacció de lligació del vector TOPO® i l'insert Propep2\_1 amb l'insert Propep2\_2.

RATIO 1:10	TOPO + Propep2_1 (7) : Propep2_2 (8)		
	Quantitat final	Concentració inicial (ng)	Volum (µL)
Reactiu			
Vector	50 ng	8,3	6,02
Insert	26 ng	24,6	1,06
DNA dilution buffer 5x	1x		2,00
H2O	fins a 10 µL		0,92
Vortexar			
tDNA Ligation Buffer 2x	1x		10,00
t4 DNA Ligase	5U		1,00
Vortexar i incubar O/N a 18-20 °C			

1. Retolar 3 tubs *ependorf*, un per cada reacció.
2. Afegir el vector barrejant amb la pipeta per homogeneïtzar bé.
3. Afegir l'insert barrejant amb la pipeta per homogeneïtzar bé.
4. Vortexar i centrifugar el buffer DNA dilution 5X i addicionar el volum corresponent al tub *ependorf*.
5. Addicionar l'H<sub>2</sub>O.
6. Vortexar el tub *ependorf*.
7. Incorporar el buffer tDNA ligation 2X, prèviament vortexat i centrifugat.
8. Finalment, afegir l'enzim. Abans fer un toc de centrifuga per fer baixar tot el volum.
9. Incubar O/N a 18-20°C.

### **3.11 TRANSFORMACIÓ EN CÈL·LULES *E. coli* DH5α COMPETENTS**

#### **3.11.1 Obtenció de cèl·lules competents d'*E. coli* DH5**

Per obtenir un millor rendiment en la transformació, es preparen noves cèl·lules competents d'*E. coli* DH5α. El protocol d'obtenció de cèl·lules competents és el mateix de l'apartat 3.2.

#### **3.11.2 Transformació en cèl·lules competents**

Les reaccions de lligació es transformen en les cèl·lules competents d'*E. coli* DH5α preparades novament. Les cèl·lules transformades es sembraran en plaques de petri amb medi LB i antibiòtic de selecció Kanamicina. Les colònies que siguin capaces de créixer són les que han incorporat el plasmidi amb el gen d'interès correctament lligat. El protocol es troba en l'apartat 3.6.2. Només es realitzarà la sembra concentrada ja que en l'anterior transformació es va obtenir, en sembra directa, un creixement pobre de colònies.

### 3.12 SCREENING DE COLÒNIES PER A VERIFICAR LA LLIGACIÓ

Per a comprovar que l'insert s'ha lligat correctament en el vector TOPO® amb la seqüència que codifica pel domini LRR i el fragment PROPEP es realitza una PCR a partir de colònies repicades de la placa de petri. Posteriorment, els productes de PCR s'analitzaran mitjançant electroforesi en gel d'agarosa seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de la Metodologia. Seguir el protocol de l'apartat 3.7 per realitzar l'*screening* de colònies utilitzant l'enzim GoTaq Flexi DNA polymerase de PROMEGA® i l'encebador sentit M13, que hibrida amb una seqüència del plasmidi.

**Taula 14:** condicions per a la PCR amb l'enzim *Go Taq DNA polymerase*.

CONDICIONS PCR:		
	2 min	95°C
25 cicles	1 min	95°C
	1 min	<b>61 °C</b>
	3 min	72°C
	5 min	72°C
	Hold	4°C

**Taula 13:** preparació del MIX de PCR. Concentració inicial i final de cada

reactiu	conc. stock	conc. final	ul/reacció	13,0
H2O (mínim)			29,75	386,75
5X Green or Coloress Buffer	5 x	1 x	10,00	130,00
MgCl2 Solution, 25mM	25mM	1,5mM	3,00	39,00
dNTPs (TTP)	2,5 mM de cada	200 uM de cada	4,00	52,00
<i>primer_for</i>	800nM	200 nM	1,00	13,00
<i>primer_rev</i>	10,000nM	200 nM	1,00	13,00
GoTaq DNA Polymerase (5u/ul)		1,25u	0,25	3,25
MIX/TUB			<b>49,00</b>	637,00
Template	colonies		1,00	
<b>TOTAL</b>			<b>50,00</b>	

Les colònies que han donat positives, es fan créixer en un cultiu O/N per tal de fer una minipreparació d'ADN plasmídic seguint el protocol de l'apartat 3.8.3. Els plasmidis obtinguts s'envien a seqüenciar per tal de verificar la seqüència del clonatge

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les construccions gèniques o plasmidis intermediaris que s'han obtingut en aquest treball, són necessaris com a pas previ per a l'obtenció d'un plasmidi final (pEarleyGate ENTRY, Gateway®) que serà el que s'utilitzarà més endavant per agrotransformar cèl·lules de tabac. Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'objectiu final del projecte és d'obtenir plantes de *Nicotiana benthamiana* modificades genèticament. Aquestes plantes transgèniques han d'expressar PEPRs, Propeps o Peps de presseguer fusionats a una proteïna fluorescent. El marcatge fluorescent permetrà estudiar, mitjançant microscòpia confocal la interacció dels Propeps o Peps de presseguer amb el PEPR de presseguer. S'estudiarà en plantes de tabac perquè, a diferència del presseguer, són fàcils de transformar i per tant obtenir-ne plantes transgèniques que expressin les proteïnes d'interès fusionades a proteïnes fluorescentes.

### 4.1 DISSENY DELS ENCEBADORS

El primer pas per poder fer les construccions gèniques és obtenir amplicons mitjançant PCR. El disseny dels encebadors és fonamental per amplificar de manera efectiva i específica el gen d'interès. La seqüència dels encebadors dissenyats es divideix en dues parts: (i) una regió que serveix per introduir l'amplicó al plasmidi pENTR™/SD/D-TOPO® (plasmidi previ a l'obtenció del pEarleyGate); i (ii) una regió que serveix per hibridar amb el gen d'interès i per tant amplificar-lo.

Igual que amb totes les PCRs, per a l'amplificació del gen d'interès s'utilitzen dos tipus d'encebadors: encebador sentit i encebador antisentit.

Pel disseny de l'**encebador sentit (forward primer)** s'han de considerar una sèrie de punts:

- Per a la clonació direccional en TOPO®, el nostre gen d'interès ha de contenir la seqüència CACC, que és la diana per la topoisomerasa, a l'extrem 5'.
- Per assegurar una traducció correcta de la proteïna, l'encebador s'ha de dissenyar de tal manera que el codó d'inici de la traducció (ATG) del gen d'interès segueixi la seqüència CACC amb una pauta de lectura de triplets. Si és necessari, entre CACC i ATG s'afegeix algun nucleòtid.

En el cas de l'**encebador antisentit (reverse primer)**:

- Evitar el codó GTGG a l'extrem 5', complementari al codó CACC, per assegurar així la clonació direccional en TOPO® amb una elevada eficiència.

- Eliminar el codó terminador de la traducció, codó “stop” TAG, en el gen d’interès quan es vol fusionar la proteïna d’interès amb una proteïna fluorescent a l’extrem C-terminal.
- Com que el clonatge és per fases, aquest encebador ha de contenir les dianes de restricció de l’enzim *Sbf I* (CCTGCAGG) i *Sal I* (GTCGAC). Entre les dianes, hi ha d’haver un codó d’enllaç per tal que l’enzim es pugui anclar bé. Com que el nombre de nucleòtids de la diana de restricció de l’enzim *Sbf I* no és múltiple de 9 (concretament conté 8 nucleòtids), s’ha d’afegir un nucleòtid després de la diana de restricció. Es va afegir una adenina.

La temperatura d’anellament (T<sub>m</sub>) i el % GC de l’encebador també són característiques importants a tenir en compte a l’hora del disseny. En tots els casos, la T<sub>m</sub> s’ha estimat a partir dels càlculs realitzats per *NEB Tm Calculator*. La T<sub>m</sub> ha d’estar entre 65-75°C.

El % GC indica la quantitat de nucleòtids GC presents en la seqüència. La guanina (G) i la citosina (C) es troben unides per tres enllaços d’hidrogen a diferència de l’adenina (A) i la timina (T), que estan unides per dos enllaços. L’enllaç entre G i C és més fort i per tant, interessa obtenir un percentatge més elevat de GC en la seqüència. L’òptim es troba entre el 40% i 60%.

A la taula que es mostra a continuació es resumeixen els encebadors dissenyats en aquest treball. Tal i com s’observa, complien amb els requisits comentats anteriorment.

**Taula 15:** seqüències dels encebadors amb les respectives T<sub>m</sub> teòriques, la mida i el % de GC., i la finalitat

Encebador	Seqüència (5'→3')	T <sub>m</sub> 1	Mida	% GC	Finalitat
PEPR1a (LRR) sentit	CACCATGCAGCTTTATCTGTTCAATTTCTTCT	57	32	38	Amplificar el domini LRR del PEPR
PEPR1a (LRR) antisentit	GTCTGACAAAGCCTGCAGGTGGTGAATATATCCAGTTGT TCCC	59	42	52	
PEPR1b (LRR) sentit	CACCATGCAGCTTTATCTGTTC	60	22	45	
PEPR1b (LRR) antisentit	GTCTGACAAAGCCTGCAGGTGGTGAATATATCCAGTTGT ACCC	60	42	52	
PEPR1a (KD) sentit	CCTGCAGGAGAAAATGCATTTAGACCAGCAAAGAGCG	61	37	50	Amplificar el domini KD del PEPR
PEPR1a (KD) antisentit	GTCTGACGCCTTTTATGCTTCTCACTTGG	57	28	56	
PEPR1b (KD) sentit	CCTGCAGGAGAAAATGCATCTAGACCATCAACGA	57	34	47	
PEPR1b (KD) antisentit	GTCTGACGGACAAACCATTACGAGGATTCA	57	29	48	
Propep1 sentit	CACCATGGAGTACTCACAAGTATCAACTG	56	29	45	Amplificar l’extrem N_terminal del Propep
Propep1 antisentit	GTCTGACAAAGCCTGCAGGAGAGGTTTTGTTTAGTAGTTGA AGAT	61	42	45	
Propep2 sentit	CACCATGGAGAAGGCATCATCAGGAAAG	59	28	50	

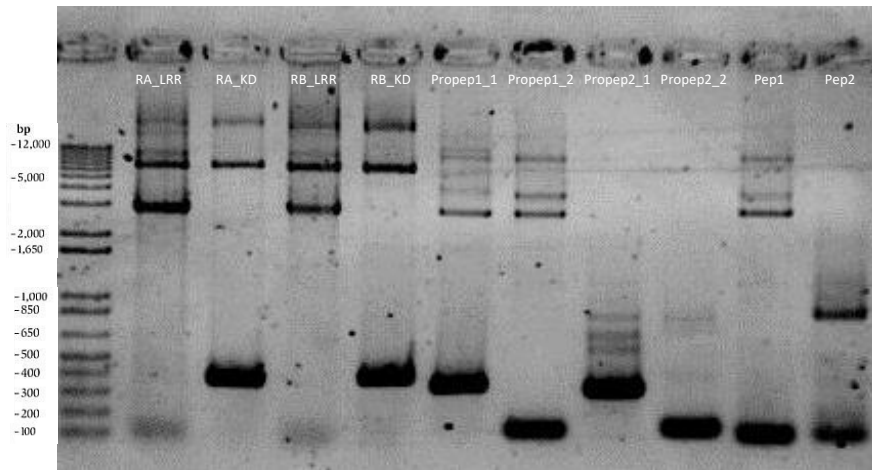


Propep2 antisentit	GTTCGACAAGCCTGCAGGCGGTCTTTTAGGGGCGTTAGA A	60	39	56	
Pep1 (Propep1) sentit	CCTGCAGGAGAAGTTGCTGCAAGCTCAAGG	60	30	57	Amplificar l'extrem C_terminal del Propep
Pep1 (Propep1) antisentit	GTTCGACTTAATTGATCTGCCACCTCCC	60	28	54	
Pep2 (Propep2) sentit	CCTGCAGGATATGTACAGAGAATTACTCTTCGTG	57	34	44	
Pep2 (Propep2) antisentit	GTTCGACTCAATTAGTCTGAGCACCCTCC	59	29	52	
Pep1 sentit	CACCGAAGTTGCTGCAAGCTCAAGG	60	25	56	Amplificar el Pep1
Pep1 antisentit	TTAATTGATCTGCCACCTCCC	60	22	50	Amplificar el Pep2
Pep2 sentit	CACCTATGTACAGAGAATTACTCTTCGTGCGG	60	32	43	
Pep2 antisentit	TCAATTAGTCTGAGCACCCTCC	59	23	48	

## 4.2 AMPLIFICACIÓ DELS RECEPTORS DE *PRUNUS PERSICA* (PpPEPRs), PROPEPs i PEPs

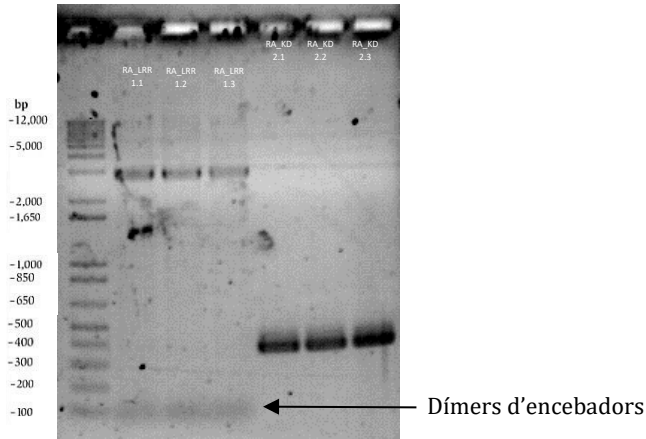
Els encebadors dissenyats es van utilitzar per obtenir els diferents amplicons mitjançant la tècnica de la PCR convencional. Tot i que es volien obtenir 6 construccions gèniques, el nombre d'amplicons va ser superior. Això és degut a que tant el receptors PEPR com els Propeps s'han de clonar per fases ja que a l'ADN hi ha un intró entre el domini LRR i el domini Kinasa (PEPR = LRR + KD) dels receptors i un intró entre la part N\_terminal del Propep i la C\_terminal (Propep = NtPropep + CtPropep). A partir d'aquí, i per facilitar la lectura del document s'anomenaran de la següent manera: domini LRR (LRR), domini Kinasa (KD), N\_terminal del Propep (Propep\_1), C\_terminal del Propep (Propep\_2).

Els productes de la PCR es van analitzar en una electroforesi en gel d'agarosa per tal de visualitzar les bandes esperades. Per a totes les amplificacions de PCR, es va obtenir una banda molt intensa, corresponent al producte de PCR de mida esperada (Figura X). Tot i així, en la majoria de carrils s'hi va observar més d'una banda d'amplificació, indicant així que les condicions de la PCR inicialment assajades no van resultar prou específiques. En un cas ideal, els encebadors reconeixen únicament la seqüència en la qual són complementaris, i per tant només s'hauria d'observar una sola banda a cada carril, amb el pes molecular esperat. Segurament, aquestes bandes inespecífiques, tot i que d'intensitat clarament inferior a les bandes esperades, són degudes a l'afinitat dels encebadors per una altra seqüència del genoma de presseguer.

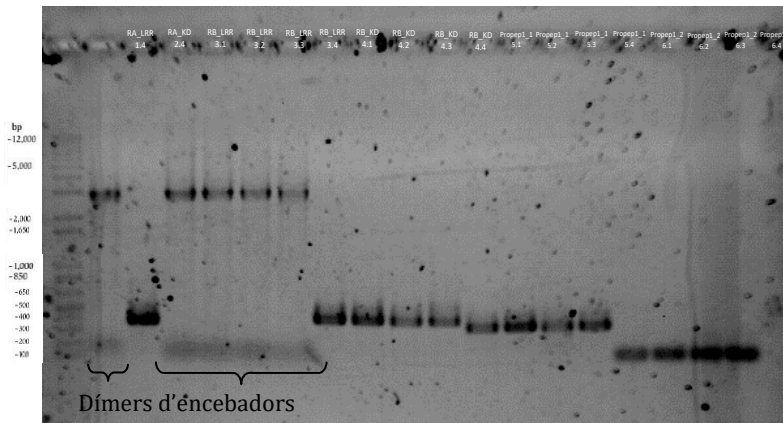


**Figura 14:** gel d'electroforesi dels productes d'amplificació del PpPEPR1a, PpPEPR1b, Propep1, Propep2, Pep1 i Pep2 de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels amplicons i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR – 2931 pb, PEPR1a domini kinasa – 351 pb, PEPR1b domini LRR – 2934 pb, PEPR1b domini kinasa – 387 pb, Propep1\_1 – 339 pb, Propep1\_2 – 81 pb, Propep2\_1 – 309 pb, Propep2\_2 – 87 pb, Pep1 – 73 pb i Pep2 – 76 pb).

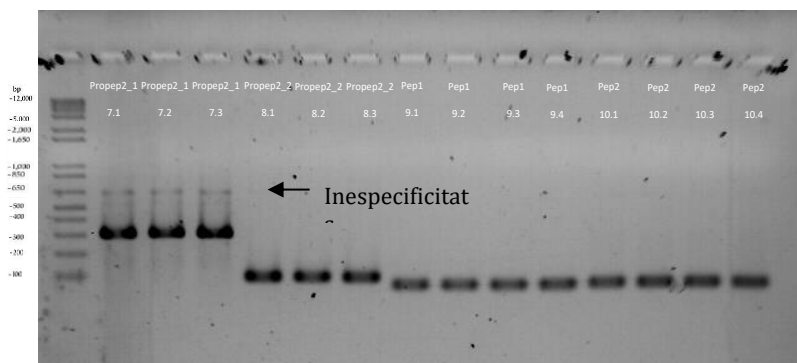
Per tal de solucionar el problema, es van modificar les condicions de la PCR. Es va augmentar la temperatura d'anellament per d'afavorir les hibridacions específiques i disminuir les amplificacions inespecífiques. Concretament, la modificació va consistir en augmentar en 4 °C la temperatura d'anellament de la reacció de PCR, treballant així a una temperatura d'anellament de 61°C, en comptes de 57°C. L'anàlisi en gel d'agarosa va mostrar que, en aquestes condicions de PCR, només es va observar la banda específica i de pes molecular esperat a cada carril (Figura 15, 16 i 17), a excepció de Propep2, on es van observar bandes inespecífiques en els replicats realitzats. Tot i així, en el cas de Propep2\_1 es va decidir continuar ja que la intensitat de la banda inespecífica era molt inferior a la de la banda esperada. Finalment comentar que les bandes de pes molecular molt baix que estan indicades al gel com a dímers d'encebadors és habitual que apareguin quan la intensitat de la banda esperada no és elevada i és deguda a la hibridació entre encebadors (dímers).



**Figura 15:** gel d'electroforesi dels productes de PCR d'amplificació del PpPEPR1a domini LRR i domini kinasa de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels amplicons i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR – 2931 pb, PEPR1a domini kinasa – 351 pb).



**Figura 16:** gel d'electroforesi dels productes de PCR d'amplificació del PpPEPR1a, PpPEPR1b i Propep1 de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels amplicons i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR – 2931 pb, PEPR1a domini kinasa – 351 pb, PEPR1b domini LRR – 2934 pb, PEPR1b domini kinasa – 387 pb, Propep1\_1 – 339 pb i Propep1\_2).



**Figura 17:** gel d'electroforesi dels productes de PCR d'amplificació del Propep1, Propep2, Pep1 i Pep2 de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels amplicons i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (Propep2\_1 – 309 pb, Propep2\_2 – 87 pb, Pep1 – 73 pb i Pep2 – 76 pb).

Per a cada seqüència amplificada, es van realitzar entre 3 i 4 replicats que es van unir abans de la purificació del producte de PCR. La purificació conjunta de les rèpliques va permetre obtenir una concentració suficientment elevada (>40 ng/μL) per procedir a la lligació de la seqüència d'ADN amb el vector TOPO® (Taula 16).

Remarcar però que en el cas de les mostres Propep1\_2 i Propep2\_2 el procés de purificació va ser lleugerament diferent. Es van purificar primer dues rèpliques de les quatre realitzades.

Seguidament es van purificar les altres dues restants i l'elució final es va fer amb la mostra purificada de les dues primeres rèpliques (en comptes d'afegir el tampó EB), per tal d'augmentar-ne la concentració.

**Taula 16:** anàlisi de la quantitat (ng/μL) i qualitat dels amplicons purificats. S'indiquen a la taula els índex de qualitat referents a les relacions de 260/280 i 260/230. La relació 260/280 indica contaminació per proteïnes i la de 260/230 reactius orgànics procedents del procés d'extracció. Els ratis òptims es troben al voltant de 1,8 i entre 2,0 i 2,2, respectivament. \*Segona purificació mitjançant l'elució amb les mostres ja purificades en comptes del tampó EB (*Elution buffer*).

Mostra	Codi	Concentració ( ng/μL)		260/280		260/230	
PEPRA LRR	1	190,80		1,88		2,26	
PEPRA KD	2	189,90		1,86		2,24	
PEPRB LRR	3	192,90		1,89		2,38	
PEPRB KD	4	180,70		1,91		2,39	
Propep1_1	5	154,40		1,88		2,34	
Propep2_1	7	119,70		1,89		2,20	
Propep1_2	6	40,00	84,40*	1,83	1,89*	2,15	2,20*
Propep2_2	8	33,60	85,50*	1,85	1,89*	2,23	2,13
Pep1	9	43,10		1,85		2,19	
Pep 2	10	66,50		1,86		1,67	

### 4.3 FASE 1 CLONATGE: L·LIGACIÓ DE L'AMPLICÓ EN EL PLASMIDI I TRANSFORMACIÓ EN *E. COLI* DH5 $\alpha$

En la primera fase de clonatge, els productes de PCR corresponents a les seqüències LRR dels receptors 1a i 1b, i les seqüències N-terminal dels Propeps (Propep 1\_1 i Propep 2\_1), es van clonar al plasmidi TOPO® i es van transformar en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Les cèl·lules bacterianes es van fer créixer en medi LB i antibiòtic de selecció (Kanamicina) per tal de seleccionar només els bacteris transformats. Es van fer dos tipus de sembra, sembra directa i sembra concentrada; amb aquesta última es va obtenir un nombre de colònies més elevat. A la Taula 17 es mostren els recomptes en placa de cada reacció de lligació. Tal com era d'esperar, no es van comptar colònies al control negatiu.

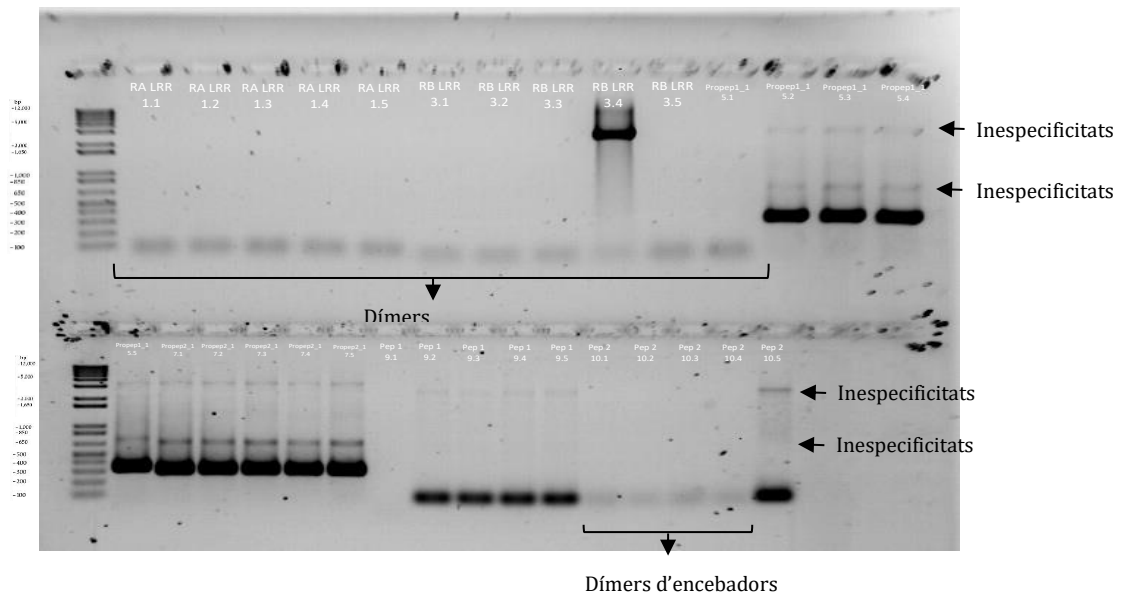
**Taula 17:** recomptes en placa de les reaccions de lligació i un control negatiu amb cèl·lules d'*E. coli* DH5 $\alpha$ .

MOSTRA	SEMBRA DIRECTA	SEMBRA CONCENTRADA
PEPR1a (LRR)	4	15
PEPR1b (LRR)	7	8
PROPEP1	10	32
PROPEP2	10	16
Pep1	3	13
Pep2	2	27
C-	0	0

### 4.4 SCREENING CLONATGE FASE 1

Per tal de comprovar si les cèl·lules havien incorporat l'insert dins el plasmidi de manera correcta, es va realitzar una PCR utilitzant una petita quantitat de colònia com a material de partida. Els encebadors utilitzats van ser els mateixos que es van usar inicialment per a l'obtenció de cada amplicó. Tot i que no es van obtenir resultats positius per a totes les colònies analitzades, en el cas del receptor 1b, Propep1 i Propep2, Pep1 i Pep2, es va observar una banda de PCR de mida esperada. Només en el cas de PEPR1a no es va observar amplificació de l'insert en cap carril (Figura 18). Això indicava que en aquest cas totes les colònies contenien bacteris transformats amb un vector re-circularitzat, és a dir, sense insert. El plasmidi recircularitzat conté el gen de selecció amb resistència a l'antibiòtic

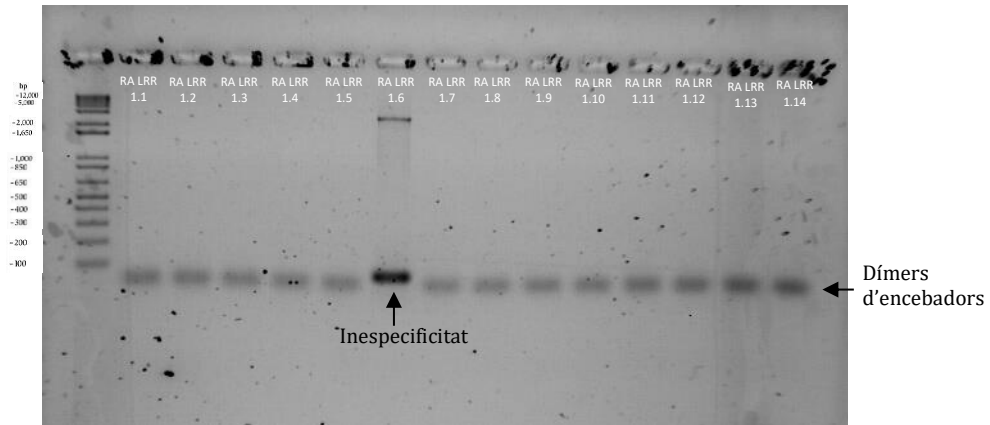
Kanamicina i, per tant el bacteri és capaç de créixer en medi selectiu. Es va tornar a repetir la comprovació per PCR amb més colònies obtingudes en sembra directa i concentrada.



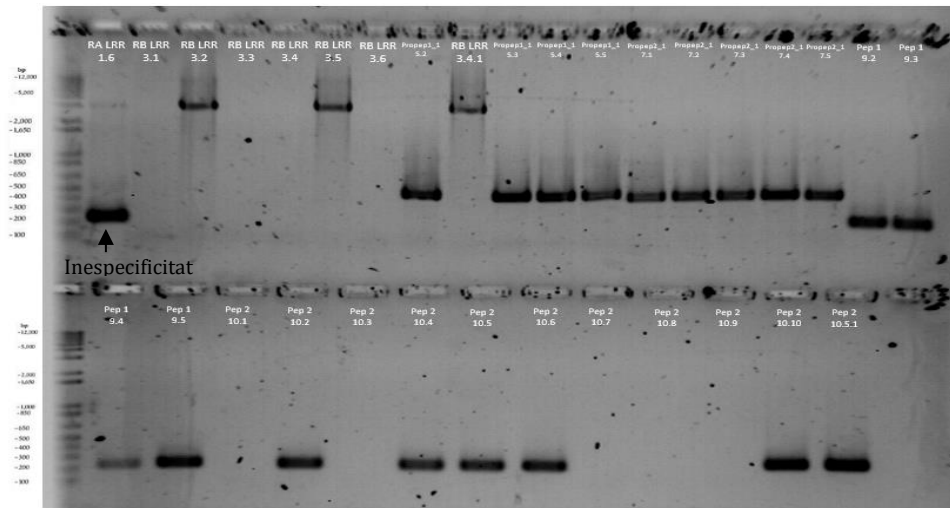
**Figura 18:** gel d'electroforesi dels productes de la PCR per a la detecció de PpPEPR1a domini LRR, PpPEPR1B domini LRR, Propep1, Propep2, Pep1 i Pep2 de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels inserts i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR - 2931 pb, PEPR1b domini LRR - 2934 pb, Propep1 - 339 pb, Propep2 - 309 pb, - 87 pb, Pep1 - 73 pb i Pep2 - 76 pb).

A la repetició del *screening* per PEPR1a només es va obtenir amplificació en una de les colònies. En el gel però, es van observar dues bandes d'intensitat molt diferents. La banda esperada, de 2931 pb, amb una intensitat molt baixa, i una banda inespecífica amb una intensitat molt elevada (Figura 19). La banda inespecífica, tenia un pes molecular entorn de 100 pb i no corresponia a dímers d'encebadors. Aquesta inespecificitat indica que l'encebador reconeixia una seqüència d'ADN del vector que li era més fàcil d'amplificar. Així doncs, es va tornar a repetir el *screening* utilitzant l'encebador M13 (Figura 20). Aquest encebador hibrida en una seqüència del vector, concretament a 153 pb de l'extrem 3' de l'insert. Aquest encebador és comercial i àmpliament utilitzat en reaccions de *screening*, ja que és específic (per a la seqüència M13) i no hibrida a cap més punt del plasmidi.

Els resultats van ser satisfactoris per a totes les seqüències d'ADN ja que es van obtenir les bandes esperades, excepte el receptor PEPR1a en què la banda esperada era molt baixa i la banda inespecífica tenia una intensitat molt elevada.



**Figura 19:** gel d'electroforesi dels productes de PCR per a la detecció de PpPEPR1a domini LRR de *Prunus persica* (Pp) utilitzant l'encebador M13. Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels inserts i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR – 2931 pb).



**Figura 20:** gel d'electroforesi dels productes de la PCR utilitzant l'encebador M13 (20 pb) per a la detecció de PpPEPR1a domini LRR de *Prunus persica* (Pp). Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels inserts i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1a domini LRR – 2931 pb, PEPR1b domini LRR – 2934 pb, NtPropep1 – 339 pb, NtPropep2 – 309 pb, – 87 pb, Pep1 – 73 pb i Pep2 – 76 pb).

A més a més del receptor PEPR1a, també es van repetir les reaccions d'*screening* utilitzant l'encebador M13 (Figura 20) per a totes les altres construccions. Es van obtenir més clons positius per a totes les seqüències d'ADN, amb la mida de banda esperada. En el cas del receptor PEPR1a, tot i analitzar més clons, no es va detectar cap banda en cap carrils analitzats. De moment, per raons de temps, el clonatge d'aquest receptor no va continuar endavant.

Els clons positius són els que contenen el plasmidi amb l'insert d'interès. Per tant, es van identificar a la placa de petri i es van fer créixer en un cultiu O/N per tal de purificar el plasmidi. A continuació, es mostra el resultat en relació a la quantitat i qualitat de les minipreparacions d'ADN plasmídic (Taula 18). Per a totes les mostres, es va obtenir una quantitat i qualitat adequades (concentració superior a 40 ng/ $\mu$ L, índex 260/280 > 1,8; índex 260/230 > 1,6) el qual va permetre continuar amb les reaccions de restricció per després i iniciar la fase 2 del clonatge.

**Taula 18:** anàlisi de la quantitat (ng/ $\mu$ L) i qualitat dels plasmidis purificats. S'indiquen a la taula els índex de qualitat referents a les relacions de 260/280 i 260/230. La relació 260/280 indica contaminació per proteïnes i la de 260/230 reactius orgànics procedents del procés d'extracció. Els ratis òptims es troben al voltant de 1,8 i entre 2,0 i 2,2, respectivament.

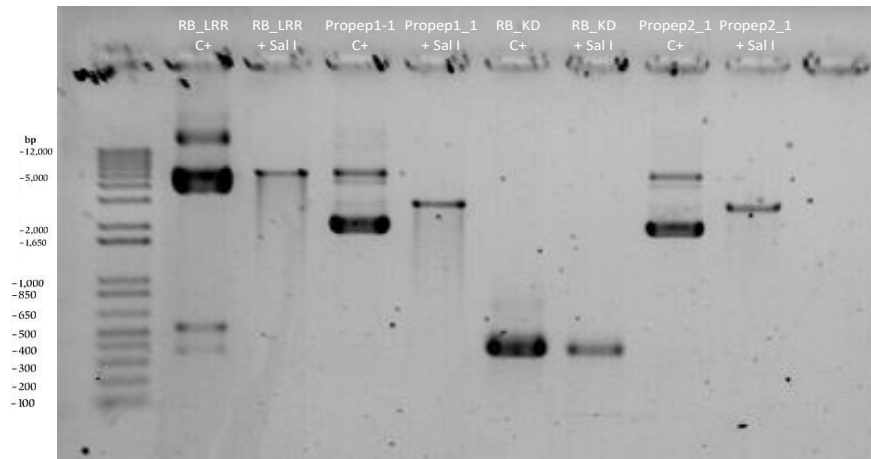
Mostra	Codi	Concentració (ng/ $\mu$ L)	260/280	260/230
PEPR1b (LRR)	3.5	395,40	1,89	2,02
Propep1_1	5.4	273,40	1,90	1,89
Propep2_1	7.3	165,00	1,89	1,69
Pep1	9.2	131,60	1,89	1,62
Pep1	9.3	138,60	1,93	2,03
Pep2	10.2	148,80	1,90	1,85
Pep2	10.4	143,30	1,88	1,74

Després de la purificació, els Peps 1 i 2, que no tenen la regió intró, ja estaven preparats pel procés de seqüenciació (apartat 4.8).

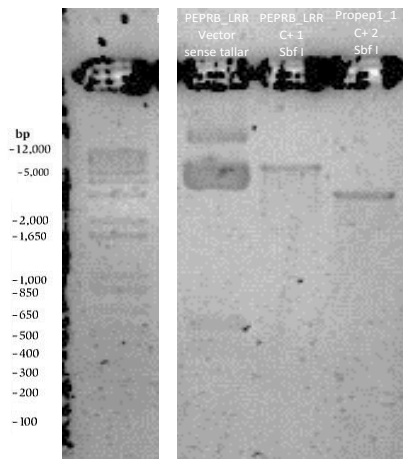
## 4.5 REACCIONS DE RESTRICCIÓ AMB SBF I SALI

En la segona fase del clonatge, els plasmidis amb l'insert (obtinguts a la fase 1) es van unir amb les seqüències que codifiquen pel domini Kinasa i els extrems C\_terminal dels Propeps1 i 2. Mitjançant reaccions de restricció, es van tallar tant els plasmidis com els amplicons obtinguts prèviament, amb els enzims *Sal I* i *Sbf I*. Les dues reaccions de restricció es van fer per separat per tal d'obtenir un millor rendiment per a cadascun dels enzims. Tal i com s'observa a les Figures 21 i 22, es van obtenir les bandes esperades en totes les reaccions. A més a més, els controls positius, realitzats amb els plasmidis comercials tallats i sense tallar, van confirmar la funcionalitat dels enzims .





**Figura 21:** gel d'electroforesi dels productes de la reacció de restricció amb l'enzim Sal I amb els respectius controls positius. Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels productes de restricció i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1b domini LRR – 5664 pb, N terminal del Propep1 (Propep1\_1) – 3072 pb, PEPR1b domini KD – 3120 pb, N terminal del Propep2 (Propep2\_1) - 3042).



**Figura 22:** gel d'electroforesi de la reacció de restricció amb l'enzim Sbf I del plasmidi amb el domini LRR del receptor PEPR1b amb el control positiu del corresponent plasmidi sense tallar i, el plasmidi amb l'extrem N\_terminal del Propep1. Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la mida dels productes de restricció i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1b domini LRR – 5664 pb, N

Els diferents ADN digerits (plasmidis o inserts) es van purificar i quantificar per a obtenir la concentració d'ADN total i la seva puresa (Taula 19). L'anàlisi per espectrofotometria va evidenciar que la concentració d'ADN final era baixa i en tots els casos la relació 260/230 es situava fora de rang. Tot i així, com que es disposava de la quantitat d'ADN, es va procedir amb la lligació i transformació en cèl·lules bacterianes d'*E. coli* DH5 $\alpha$ .

**Taula 19:** anàlisi de la quantitat (ng/μL) i qualitat dels amplicons purificats. S'indiquen a la taula els índex de qualitat referents a les relacions de 260/280 i 260/230. La relació 260/280 indica contaminació per proteïnes i la de 260/230 reactius orgànics procedents del procés d'extracció. Els ratis òptims es troben al voltant de 1,8 i entre 2,0 i 2,2, respectivament.

Tipus mostra	Mostra	Concentració (ng/μL)	260/280	260/230
Vectors	TOPO®+RB_LRR	11,40	1,72	-5,06
	TOPO®+Propep1_1	12,80	1,78	-10,19
	TOPO®+Propep2_1	8,90	1,80	-2,51
Inserts	RB_KD	12,70	1,73	-4,54
	Propep1_2	21,80	1,71	13,78
	Propep2_2	24,60	1,84	8,80

#### 4.6 FASE 2 CLONATGE: OBTENCIÓ DEL PLASMIDI FINAL DONOR

Prèviament a la reacció de lligació es van desfosforilar els plasmidis tallats amb *Sbf I* i *Sal I* per tal d'evitar la seva recircularització i, així obtenir un millor rendiment en la lligació. Seguidament, es van lligar el domini Kinasa del PEPR1b amb el domini LRR (que ja estava clonat) i els extrems CtPropep1 i CtPropep2 amb els plasmidis corresponents. La reacció de lligació es va transformar en cèl·lules d'*E.coli* DH5α. Tal i com s'observa als recomptes mostrats a la Taula 20, es van obtenir moltes després de realitzar una sembra concentrada en medi LB amb l'antibiòtic de selecció Kanamicina.

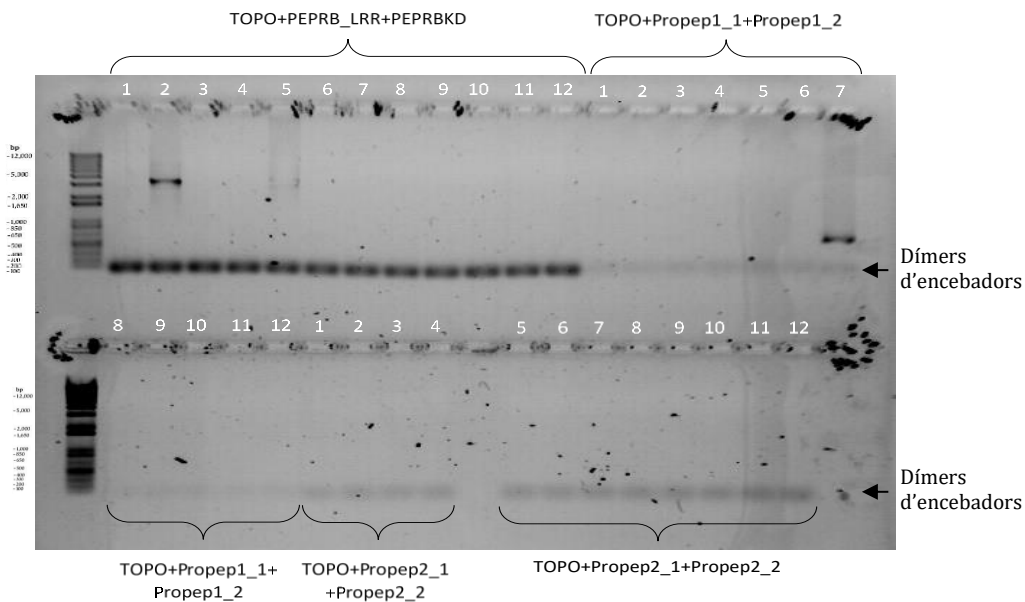
**Taula 20:** recomptes en placa de les reaccions de lligació i un control negatiu amb només cèl·lules bacterianes d'*E. coli* DH5α.

Recompte colònies (sembra concentrada)	
Topo® + PEPR1b (LRR+KD)	496
Topo® + Propep1+Pep1	596
Topo® + Propep2+Pep2)	1360
C- (només cèl·lules)	0

## 4.7 SCREENING CLONATGE FASE 2

La PCR d'*screening* per comprovar si l'insert s'havia lligat correctament dins el plasmidi va donar positiva només per a dues colònies, una del receptor PEPR1b i l'altra del Propep1 (Figura 23). Així doncs, es van anar analitzant colònies fins a obtenir 2 colònies positives, per tal d'enviar les construccions gèniques a seqüenciar. No es van obtenir bandes del gen d'interès del Propep2 en cap de les repeticions.

Cal comentar si bé es van obtenir moltes colònies en el recomptes, el percentatge de lligació del plasmidi amb l'insert és molt baix. Això pot ésser degut a que el pas de desfosforilació dels extrems tallats amb els enzims de restricció no funcionés correctament i per tant la major part de plasmidi recircularitzés. Aquesta és l'opció més probable ja que la reacció de lligació sí que va funcionar, els controls positius de digestió van sortir correctes.

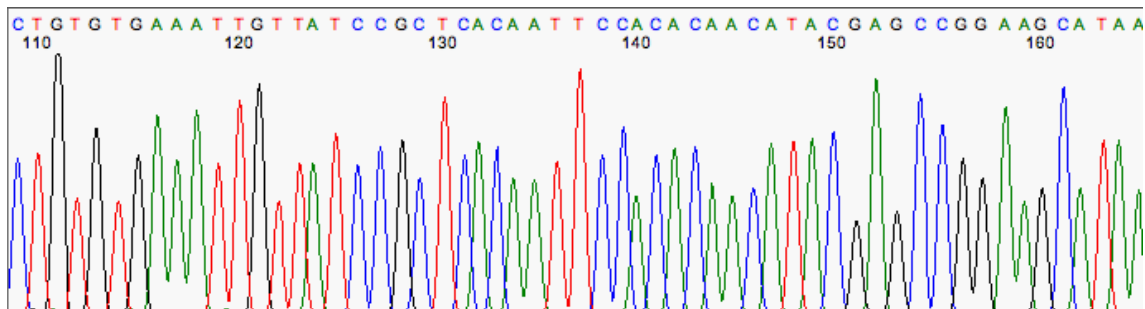


**Figura 23:** gel d'electroforesi per a comprovar la lligació del domini Kinasa amb el domini LRR del PEPR1b i els extrems N\_terminal i C\_terminal dels Propeps 1 i 2. Gràcies al pes molecular (PM) es pot estimar la llargada dels productes de restricció i relacionar les bandes observades al gel amb les bandes esperades (PEPR1b (LRR+KD) – 3321 pb, Propep1 (Propep1\_1 i Propep1\_2) – 420 pb).

## 4.8 ESTUDI DE LES SEQÜÈNCIES DE PEPR1b, PROPEP1, PEP1 I PEP2

L'objectiu de seqüenciar l'ADN és, en aquest cas, comprovar que la construcció gènica, és a dir que els inserts introduïts al plasmidi tinguin exactament la seqüència que esperem i alhora, comprovar el punt de lligació dels inserts amb el plasmidi, i el punt d'unió entre inserts (punt d'unió entre els dominis dels diferents gens). El mètode utilitzat s'anomena seqüenciació de Sanger per electroforesis capil·lar. Les seqüències d'ADN es tallen i s'amplifiquen i els fragments que s'obtenen, s'injecten en el capil·lar d'electroforesis per tal d'arribar a un detector que genera uns pics de fluorescència, els corresponents a cada nucleòtid. Cada fragment d'ADN acabat en didesoxinucleòtid està marcat fluorescentment de tal manera que, cada didesoxinucleòtid (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) implica un color de fluorescència diferent. Les dades generades es transformen informàticament, a partir del software CLC workbench, en un cromatograma per obtenir les dades de la seqüència de la mostra.

En principi, un cromatograma sempre hauria de ser perfecte, però no sempre és així. Es considera, doncs, que un bon cromatograma només ha de tenir un pic per nucleòtid i un correcte espaiat entre pics. En la Figura 24, es pot observar un exemple d'un cromatograma amb resultats òptims.



**Figura 24:** exemple d'un òptim cromatograma en el qual es mostra només un pic per nucleòtid i amb un correcte espaiat entre ells.

Les mostres que es van enviar a seqüenciar, al servei de seqüenciació de Macrogen (Dinamarca), van ser les construccions gèniques en el vector final pDONOR dels gens PEPR1b, Propep1, Pep 1 i Pep2. Es van analitzar dos plasmidis per construcció gènica (a excepció de la construcció referent a PEPR1b que només es va poder enviar 1 colònia). Per a cada plasmidi, es van realitzar dues seqüenciacions, una amb l'encebador M13 sentit i l'altra amb el M13 antisentit, per tal de verificar les seqüències i per obtenir la lectura de les

dues cadenes . En la taula 21 es resumeixen els resultats de la seqüenciació, considerant si la seqüència inserida al plasmidi és segons l'esperada.

**Taula 21:** resultats de la seqüenciació per comprovar la lligació del receptor PEPR1b (LRR i KD), el Propep1 (Nt i Ct), el Pep1 i el Pep2 amb el plasmidi.

Construcció	Colònia	M13 sentit	M13 antisentit
<b>pDONOR + PEPR1b (LRR+KD)</b>	5	+	+
<b>pDONOR + Propep1(Nt i Ct)</b>	7	+	+
	53	-	+
<b>pDONOR + Pep1</b>	2	+	+
	3	+	+
<b>pDONOR + Pep2</b>	2	+	+
	4	-	+

Tot i que la seqüenciació no ha donat positiva sempre per a tots dos encebadors, per a totes les construccions gèniques analitzades s'ha pogut llegir la seqüència, i s'ha confirmat que és segons l'esperada. Per tant, pels gens PEPR1b, Propep1, Pep1 i Pep2 ja es disposa dels plasmidis pDONOR. A partir d'aquí es procedirà a obtenir els plasmidis pENTRY de cada construcció mitjançant el mètode Gateway. Aquest plasmidi pENTRY és el que s'utilitzarà per agrotransformar les plantes de *Nicotiana benthamiana*, que s'han obtingut paral·lelament durant la realització d'aquest treball.

## **5. APLICABILITAT**

Els pèptids elicitors de les defenses de les plantes, els Peps, són candidats reals a una futura aplicació en camp com a producte fitosanitari per el control de malalties provocades per fitopatògens rellevants. En el cas del presseguer, aquesta aplicació pot ser a mig termini, ja que els coneixements adquirits fins al moment encara estan en fase d'assaig i desenvolupament. Des d'aquest punt de vista, el coneixement més bàsic, a nivell molecular i cel·lular, del procés d'estimulació de defenses, a través de la interacció PEPR/Pep, després de l'aplicació exògena de Pep és molt interessant. L'estudi d'aquesta interacció serà molt important per conèixer els mecanismes d'acció dels pèptids en la resposta de defensa del presseguer contra les malalties produïdes per patògens.

Aquest treball vol contribuir en aquest estudi bàsic, a nivell molecular i cel·lular just en el punt d'inici quan s'aplica un Pep com a tractament d'estimulació de defenses, la interacció entre el PEPR i el Pep. Aquest treball representa una fase molt inicial d'aquest estudi més global, però alhora imprescindible. Per tant, tot i que d'entrada no sembla tenir una aplicació directe en la millora de l'estimulació de les defenses, sí que es preveu que els resultats positius tinguin una aplicabilitat a llarg termini i que permetran avançar en la recerca de noves estratègies suficientment eficaces per combatre la taca bacteriana, com per exemple la millora del pèptids elicitors naturals.

Més focalitzat als resultats obtinguts al treball, la obtenció de les construccions gèniques té aplicabilitat a molt curt termini per obtenir els plasmidis pENTRY, que seran els que es faran servir per agrotransformar plantes de tabac, i que si funciona correctament expressaran els gens de presseguer d'interès. A curt termini també, aquestes plantes de tabac transgèniques es poden convertir en una plataforma de criba per a assajar la funcionalitat de pèptids millorats, en base a la internalització en forma de vesícules.

## 6. CONCLUSIONS

En aquest projecte s'han obtingut construccions gèniques que, en un futur molt pròxim, permetran obtenir els plasmidis pENTRY finals per agrotransformar *Nicotiana benthamiana*, i obtenir així plantes transgèniques que expressin els receptors de membrana PEPR, Propeps i Peps de presseguer fusionats a una proteïna fluorescent com la YFP.

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball es pot concloure que:

- Els encebadors dissenyats per a l'amplificació de la seqüència que codifica pels dominis LRR i Kinasa dels receptors PEPR1a i PEPR1b, els dominis N\_terminals i C-terminal dels Propep1 i Propep2 i Pep1 i Pep2, tots gens de presseguer, van resultar ser específics en la reacció de PCR. Es van obtenir amplicons de mida esperada per a totes les seqüències.
- En la primera fase de clonatge, totes les reaccions de lligació van resultar positives, excepte la lligació del domini LRR del receptor PEPR1a amb el plasmidi comercial pDONOR-TOPO®. Tot i que l'amplificació d'aquesta seqüència va ser correcte, cal estudiar de nou el disseny dels encebadors, sobretot per l'extrem 5' dels encebadors que és la part que està relacionada amb la lligació al vector.
- En la segona fase del clonatge, es van obtenir moltes colònies per a cada plasmidi transformat (PEPR1b, Propep1 i el Propep2), però el percentatge de lligació del plasmidi amb l'insert va ser molt baix. Segurament la desfosforilació prèvia dels extrems del plasmidi tallat abans de la lligació amb la seqüència corresponent, no va funcionar adequadament i per tant la major part de plasmidis van recircularitzar. L'eficiència de tall elevada dels enzims de restricció en els plasmidis de control positiu descarta l'opció d'un mal funcionament de la reacció de digestió amb *Sbf I* i *Sal I*.

Les construccions gèniques finalment obtingudes dins dels plasmidis intermediaris pDONOR: pDONOR-PEPR1b, pDONOR-Propep1, pDONOR-Pep1, pDONOR-Pep2, han estat validades per seqüenciació i es corresponen amb la seqüència esperada. Això indica que el punt de lligació dels inserts amb el plasmidi, i el punt d'unió entre les seqüències que formen part de la construcció gènica (punt d'unió entre els dominis dels diferents gens) són correctes.

## 7. REFERÈNCIES

Albert, M. 2013. Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany*, 64(17), 5269–5279.

Battilani, P., Rossi, V. and Saccardi, A., 1999. Development of *Xanthomonas Arboricola* pv. *pruni* epidemics on peaches. *Journal of Plant Pathology*. 81(3), pp.161-171.

Beattie, B.C.F. and G.A., 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*.

Boller, T. & Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, pp.379–406.

Chandler, D. *et al.*, 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1573), pp.1987–98.

Lori, M. *et al.*, 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), pp.5315–5325.

Ortiz-Morea, F *et al.*, 2016. Danger-associated peptide signaling in Arabidopsis requires clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), pp.11028-11033.

Palacio-Bielsa, A. *et al.*, 2014. La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), España y Sudamérica. *Phytoma-España*, 279, pp.36-40.

Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*. 63, pp.22-32.

Magnani, E., Bartling, L. and Hake, S. 2006. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Molecular Biology*. 7(46), pp.1-7.



Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient. (2015). Guía de gestión integrada de plagas: Frutales de hueso. Recuperat de [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiafrutalesdehuesoweb\\_tcm30-57949.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiafrutalesdehuesoweb_tcm30-57949.pdf) (pàgina visitada el 1 de maig de 2018)

Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient. (2018). Registre de Productes Fitosanitaris. Recuperat de <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp> (pàgina visitada el 1 de maig de 2018)

Ram, J. 2014. Xanthomonas arboricola Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *The American phytopathological Society*. 98(12), pp.1600-1610.

Ross, A. *et al.*, 2014. The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *EMBO Journal*, 33(1), pp.62-75.

Ruiz, *et al.*, 2017. Novel Rosaceae plant elicitor peptides as sustainable tool to control *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* spp. *Molecular Plant Pathology*.

Ruiz, C. *et al.*, 2018. Diversity of plant elicitor peptide within the Rosaceae. *BMC Genetics*. 19(11), pp.1-12.

Salomon, S. and Robatzek, S. 2006. Induced Endocytosis of the Receptor Kinase FLS2. *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), pp.293-295.

Seiber, J.N. *et al.*, 2014. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48), pp.11613-11619.

Stefani, E., 2010. Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1 SUPPL.).

Thakur, M., i Singh, B., 2013. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry*.

Tsuda, K. & Somssich, I.E., 2015. Transcriptional networks in plant immunity. *The New phytologist*, 206(3), pp.932-47.

Van Loon, L. C., Rep, M., i Pieterse, C. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, pp.135–62.

Woo, M., *et al.*, 2018. Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean. *Molecular Plant Pathology.* 19(4), pp.858-869.

Yamada, K. *et al.*, 2016. Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *The EMBO journal*, 35(1), pp.46-61.

Yamaguchi, Y. & Huffaker, A., 2011. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), pp.351–357.