

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE)

Facultad de Biología



From plant glucosinolates to fungal nitrilases:

Nitric oxide function during the *Botrytis cinerea*-host plant
interaction

Tesis Doctoral

Isabel Torres Quezada

Salamanca, 2022

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE)
Facultad de Biología

From plant glucosinolates to fungal nitrilases:
Nitric oxide function during the *Botrytis cinerea*-host plant interaction

Memoria que presenta Dña. Isabel Torres Quezada para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 19 de octubre de 2022

Dr. D. CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ, PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN AGROBIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “From plant glucosinolates to fungal nitrilases: Nitric oxide function during the *Botrytis cinerea*-host plant interaction” ha sido realizada por la ingeniera Dña. Isabel Torres Quezada en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez y el Dr. D. Ernesto Pérez Benito, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca, a 19 de octubre de 2022.



Fdo: Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez

El Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez, Catedrático de Universidad del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal y el Dr. D. Ernesto Pérez Benito, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca certifican:

Que la presente Memoria titulada “From plant glucosinolates to fungal nitrilases: Nitric oxide function during the *Botrytis cinerea*-host plant interaction” ha sido realizada por la ingeniera Dña. Isabel Torres Quezada en el Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 19 de octubre de 2022.

Fdo: Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez

Fdo: Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo: Dña. Isabel Torres Quezada

FINANCIACIÓN Y ORGANISMOS IMPLICADOS

Durante el desarrollo de la Tesis la doctoranda Isabel Torres Quezada ha disfrutado de un contrato predoctoral otorgado por la Universidad de Salamanca cofinanciado por el Banco Santander.

Los proyectos de investigación que han permitido financiar este trabajo se exponen a continuación:

“Descifrado de la señalización molecular del óxido nítrico (NO) en el desarrollo y la biotecnología de plantas”. MINECO (BIO2017-85758-R). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2018-2020.

“Percepción y señalización molecular del óxido nítrico (NO) durante el balance entre desarrollo y estrés en plantas”. MICINN PID2020-119731RB-I00. IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2021-2024.

“Impacto biotecnológico del gasotransmisor óxido nítrico (NO) en el desarrollo y las respuestas a estrés de las plantas”. Junta de Castilla y León UIC 152 (SA313P18). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2019-2021.

“Aplicación de la biología translacional y el microbioma en la protección frente a estrés hídrico e hipoxia en plantas”. Junta de Castilla y León. (SA137P20). IP: Dr. Oscar Lorenzo Sánchez. 2020-2023.

Unidad de Excelencia “Producción Agrícola y Medioambiente” CLU-2018-04 cofinanciado por los P.O. FEDER de Castilla y León (2014-2020). Director Dr. Oscar Lorenzo Sánchez. 2019-2023.

“Compensación entre defensa y desarrollo. Papel del óxido nítrico (NO) en la familia génica "NPR" en la organización radicular” Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/12-2017). IP: Dra. Capilla Mata Pérez

“Elucidating the role of IBM1 in epigenetic regulation of meiosis in *Arabidopsis thaliana*.”. Fundación Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/7-2021). IP: Dra. Cecilia Oliver Velasco. 2021.

“Identificación de dianas moleculares para el control de precisión de la fusariosis vascular y de la podredumbre gris”. Ministerio de Ciencia e Innovación. PID2019-110605RB-I00. (2020-2023). IP: Dr. Ernesto Pérez Benito.



Para Amable, Jacqueline y Emmanuel

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral estuvo llena de historias (supongo que como cualquier otra tesis). Algunas de esas historias más reconfortantes que otras, unas más interesantes que otras; pero, al final lo importante y lo que realmente me queda son esas personas que estuvieron allí y fueron parte de ellas. Ahora que puedo por fin sentarme, con un café y en calma a escribir estos agradecimientos, parece mentira que ya han pasado casi cinco años y que he podido vivir tantos momentos especiales con personas igual de especiales. Faltaría más decir que espero sigan allí conmigo más adelante y que todos esos momentos, especialmente esos días un poco más difíciles, podamos recordarlos con una sonrisa. Ahora sólo hace falta mostrar mi gratitud como es debido, ya que, sin ustedes, poco sentido hubiera tenido esta etapa de mi vida y esta humilde memoria de investigación.

En primer lugar, a mi familia, a quienes ya dedico todas y cada una de estas páginas, ya que es imposible no pensar en ellos primero, porque les debo todo y más. A mis padres Jacqueline y Amable, que, aunque no entienden mucho lo que hago siempre estuvieron allí para escucharme a su manera y aunque lejos, estar muy cerca. A mi hermano Emmanuel que ha sido en mejor hermano que una doctoranda en crisis puede necesitar. Los quiero.

A mis directores de tesis, Óscar y Ernesto, que aunque a veces tenía que correr entre laboratorios y experimentos no podré dejar de agradecer la oportunidad tan bonita de poder colaborar entre ambos grupos, porque como en la vida misma hay que escuchar las diferentes versiones de la historia antes de sacar una conclusión y creo que en el sentido de las interacciones planta patógeno hemos podido entresacar narrativas interesantísimas... Ambos son científicos y personas admirables y he podido aprender mucho de ustedes. Mil gracias también a Mayte y Nacho, directores de tesis honorarios, por el esfuerzo, por la paciencia y toda la resiliencia que ameritan los equipos de HPLC no colaboradores.

A Virginia, por las charlas y la ayuda, por las recomendaciones experimentales y los chistes, los postres, por siempre abogar por el ahorro de etanol y avisarme cuando

Fusarium hacía cosas bonitas, tendré que admitir que (a veces) *Fusarium* si es más bonito que *Botrytis*.

A mis compañeros del L7, a Isa Manrique por los memes, las fotos de gatos, las charlas existenciales y por supuesto, la ayuda en asuntos científicos. A Inma por siempre estar dispuesta a ayudar y siempre tener esa actitud tan bonita. A Susana, esta chica, que sin exageración lleva el laboratorio en los hombros, gracias por todo, que es mucho. A Lola, gracias por preocuparte y apoyarnos siempre, aun no estando en el laboratorio, las conversaciones contigo siempre me hacían tener un día mejor.

A Fátima, Andrea Sara, Esperanza, Cylia... tengo mucho que decir sobre ustedes y no puedo ponerlo todo en estas pocas líneas, así que mejor quedamos en El Salado y lo hablamos, las quiero mucho, como el frailejón quiere el agua.

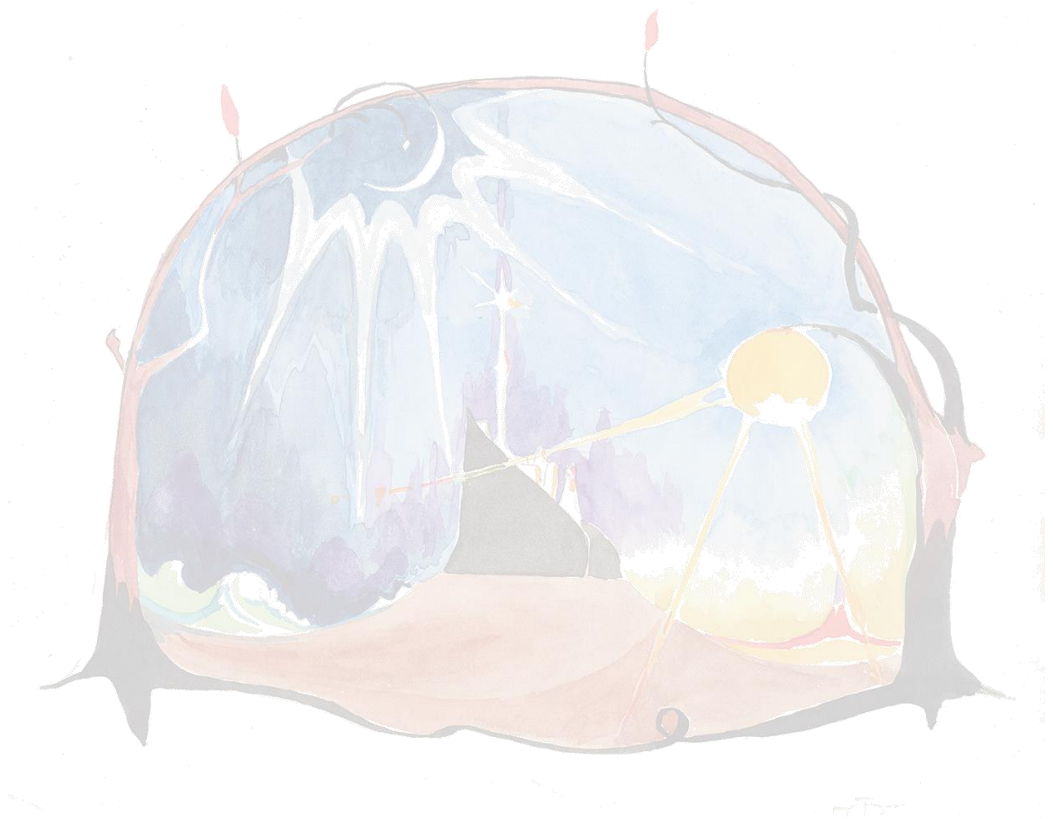
A los postdocs del L7, Noelia, Álvaro, Capilla y Pablo, por las risas y los cafés, por el intercambio de experiencias, y por las fotos embarazosas en bodas.

Al equipo de técnicos: Luis, Santi e Inés por toda la ayuda, los torneos de siembra de Arabidopsis, y los campamentos de verano en el CIALE.

A Bea, siempre dispuesta a escuchar mis quejas, a subirme el ánimo en los momentos difíciles, ya fuera un mal día del laboratorio o una muñeca rota, qué bonito poder contar con gente como tú. Y a Carmen, por aprender a pronunciar *Botrytis* y por indignarse conmigo por esas cosas de la Universidad que nadie entiende. Y, por último, pero no por eso menos importante, a Edison, greñudo, gracias por esa portada tan hermosa y por tenerme la paciencia para hacerla.

A todos, gracias mil,

Isa.



“No hay nada como mirar, si queréis encontrar algo (al menos eso decía Thorin a los enanos jóvenes).

Cierto que casi siempre, se encuentra algo, si se mira, pero no siempre es lo que uno busca.”

— J.R.R. Tolkien, *The Hobbit*.

"I am very poorly today and very stupid and hate everybody and everything. One lives only to make blunders. I am going to write a little book for Murray on orchids and today I hate them worse than everything, so farewell and in a sweet frame of mind, I am

ever yours"

—Charles Darwin, carta a Charles Lyell
1ro de octubre, 1861.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)	3
1.1 Generalidades del NO	5
1.2 Química del NO	6
1.3 El NO en plantas.....	8
1.3.1 Homeostasis del NO en plantas.....	9
1.3.2 Funciones fisiológicas del NO en plantas.....	15
1.4 El NO en hongos.....	19
1.4.1 Producción de NO en hongos.....	19
1.4.2 Funciones fisiológicas del NO en hongos.....	21
1. BOTRYTIS CINEREA	24
2.1 Generalidades e importancia económica	24
2.2 Sistemática y descripción morfológica.....	25
2.3 Ciclo de vida y epidemiología.....	26
2.4 El NO en <i>B. cinerea</i>	29
2. SEÑALIZACIÓN HORMONAL EN LA INTERACCIÓN <i>A. THALIANA</i> Y <i>B. CINEREA</i>	32
3.1 Ácido salicílico (SA).....	32
3.2 Ácido jasmónico (JA)	33
3.3 Etileno (ET)	35
3.4 Ácido abscísico (ABA)	36
3.5 Crosstalk hormonal durante los procesos de defensa de la planta.....	37
3. EL METABOLISMO SECUNDARIO EN EL CONTEXTO DEL ESTRÉS BIÓTICO	39
4.1 Glucosinolatos.....	40
4.1.1 Descripción general	40
4.1.2 Biosíntesis y clasificación	41
4.1.3 Efectos de los GLSs	43
4.1.4 Sistema Glucosinolato-Mirosinasa	46
4.1.5 Relación de las mirosinas con los factores de transcripción bHLH del tipo MYC. .	47
4.2 Nitrilasas	48
4.2.1 Generalidades.....	48
4.2.2 Química de las nitrilasas y nitrilo hidratadas.....	50
4.2.3 Funciones fisiológicas en plantas.....	50
4.2.4 Funciones fisiológicas en hongos.....	52
4.3 Cianuro hidratadas	53
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. ORGANISMOS	63
1.1 Plantas	63
1.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
1.1.2 <i>Vitis vinifera</i>	64
1.1.3 <i>Phaseolus vulgaris</i>	64
1.2 Hongos.....	65
1.2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	65
1.3 Bacterias	65

1.3.1 Escherichia coli DH5 α	65
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	65
2.1 <i>Condiciones de siembra</i>	65
2.1.1 Esterilización y estratificación de semillas.....	65
2.1.2 Siembra y germinación en medio sólido	66
2.1.3 Crecimiento de plántulas en invernadero	67
2.1.4 Cultivo en medio sólido de <i>B. cinerea</i>	67
2.1.5 Cultivo en medio líquido de <i>B. cinerea</i>	68
2.1.6 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	69
3. EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE <i>B. CINEREA</i>	69
4. ENSAYOS DE INFECCIÓN	69
5. ENSAYOS DE GERMINACIÓN	70
5.1 <i>Ensayos de germinación en A. thaliana</i>	70
5.2 <i>Ensayos de germinación en B. cinerea</i>	71
6. ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO	72
6.1 <i>Ensayos de sensibilidad a estrés nitrosativo y oxidativo en B. cinerea</i>	72
6.2 <i>Actividad nitrilasa durante el crecimiento saprofito</i>	72
7. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y GLUCOSINOLATOS..	73
7.1 <i>Preparación de muestras:</i>	74
7.2 <i>Análisis HPLC-DAD</i>	74
7.3 <i>Análisis por espectrometría de masas</i>	74
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	75
8.1 <i>Cuantificación de proteínas (método Bradford)</i>	76
9. ANÁLISIS Y SEPARACIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS	76
10. WESTERN BLOT	77
11. ACTIVIDAD MIROSINASA.....	78
12. ACTIVIDAD NITRILASA/CIANURO HIDRATASA	79
12.1 <i>Detección de amonio</i>	79
12.2 <i>Detección de la actividad cianuro hidratasa a través de la cuantificación de formamida</i>	80
13. ACTIVIDAD B-GLUCURONIDASA	80
14. TINCIÓN TRYPAN BLUE.....	81
15. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	81
15.1 <i>ADN genómico</i>	81
15.2 <i>Extracción de ADN plasmídico</i>	83
15.2.1 <i>Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid</i>	83
15.2.2 <i>Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina</i>	84
15.3 <i>Extracción de ARN</i>	85
15.3.1 <i>Extracción de ARN de A. thaliana</i>	85
15.3.2 <i>Extracción de ARN de B. cinerea</i>	86
15.3 <i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i>	86
16. VECTORES DE CLONACIÓN.....	87
16.1 <i>pGEM®-T Easy</i>	87
16.2 <i>pDONR™221</i>	88
17. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN	89
17.1 <i>Enzimas de restricción</i>	89
17.2 <i>Ligaciones</i>	89

18. ELECTROFORESIS	89
18.1 <i>Electroforesis de ADN</i>	89
18.2 <i>Electroforesis de ARN</i>	90
19. RECUPERACION DE FRAGMENTOS DE ADN	91
20. TRANSFORMACIONES	91
20.1 <i>Transformaciones de Escherichia coli</i>	91
20.2 <i>Transformacion de B. cinerea</i>	92
21. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	94
21.1 PCR ESTÁNDAR.....	94
21.2 <i>RT-PCR (síntesis de ADNc)</i>	96
21.3 <i>PCR cuantitativa (RT-qPCR)</i>	97
22. HIBRIDACIONES DE ADN	98
22.1 <i>Marcaje de sondas</i>	98
22.2 <i>Southern Blot</i>	99
23. SECUENCIACIÓN	101
24. ANÁLISIS DE DATOS Y RECURSOS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	101

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ABA: Ácido abscísico/Absciscic acid
- ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico/Deoxyribonucleic acid
- ADNc/cDNA: ADN complementario/Complementary DNA
- ARNm/RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero/Messenger ribonucleic acid
- AUX: Auxinas/Auxins
- *Bcfhg1*: Flavohemoglobin 1 of *Botrytis cinerea*
- bp: Pares de bases/base pairs
- °C: Grados Celsius
- CDP-Star: Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1.3.7]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate
- cm: Centímetro/centimeter
- CN: Cianuro/Cyanide
- cPTIO: 2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-óxido-3 óxido/
- Ct: Threshold cycle
- C-terminal: Carboxyterminal
- Cys: Residuo de cisteína/Cysteine residue
- DEPC: Diethylpyrocarbonate
- DETA: Diethylenetriamine
- DIG: Digoxigenin-11-dUTP
- dNTP: Deoxynucleotide 5'-triphosphate
- dpi: Días post inoculación/Days post inoculation
- EDTA: Ácido etilen-diamino tetra acético/Ethylenediaminetetraacetic acid
- ET: Etileno/Ethylene
- FT/TF: Factor transcripcional/Transcriptional factor
- GAs: Giberelinas/Gibberelins
- GLS: Glucosinolato/Glucosinolate
- GO: Gene Ontology
- GSH: Glutación reducido/Reduced glutathione
- GSNO: S-nitrosoglutación/S-nitrosoglutathione
- GUS: β-glucuronidasa/β-glucuronidase
- h: Horas/Hours

- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno/Hydrogen peroxide
- Hyg: Higromicina/Hygromycin
- IAA: Ácido indolacético/Indolacetic acid
- IAN: 3-Indolacetonitrilo/Indole-3-acetonitrile
- JA: Ácido jasmónico/Jasmonic acid
- Kb: Kilobases
- KDa: KiloDalton
- L: Litro/Liter
- L-NNA: N ω -nitro-L-arginine
- M: Molar
- MEA: Malt Extract Agar
- min: Minutos/Minutes
- mM: Milimolar
- MOPS: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
- MS: Medio Murashige y Skoog/Murashige and Skoog medium
- NIT: Nitrilase
- N: Nitrógeno/Nitrogen
- NAD(H): Nicotinamida adenina dinucleotido oxidado (reducido)/
- NADH: Nicotinamide-adenine-dinucleotide
- NADP(H): NAD fosfato oxidado (reducido)/ Oxidized (reduced) NAD phosphate
- NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- Ng: Nanogram
- NIA1: Nitrate reductase 1
- NIA2: Nitrate reductase 2
- NO: Óxido nítrico/Nitric oxide
- NO₂⁻: Nitrito/Nitrite
- NO₃⁻: Nitrato/Nitrate
- NOA1: NO-associated 1
- NOS: Óxido nítrico sintasa/Nitric oxide synthase
- NR: Nitrato reductasa/Nitrate reductase
- nt: Nucleotide
- N-terminal: Aminoterminal
- O₂⁻: Radical superóxido/Superoxide radical

- O₂: Oxígeno molecular/Molecular oxygen
- ONOO⁻: Peroxinitrito/Peroxinitrite
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa/Polymerase chain reaction
- PDB: Potato Dextrose Broth
- pH: Potential of hydrogen
- qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real/Quantitative real time-PCR
- r.p.m: Revoluciones por minuto/Revolutions per minute
- RNAseq: RNA sequencing
- RNS: Especies reactivas de nitrógeno/Reactive nitrogen species
- ROS: Especies reactivas de oxígeno/Reactive oxygen species
- s: Segundos/Seconds
- SA: Ácido salicílico/Salicylic acid
- SD: Desviación estándar/Standard deviation
- SDS: Sodium dodecyl sulfate
- SH: Schaedler
- SNO: S-nitrosotiol/S-nitrosothiol
- SSC: Saline-sodium citrate
- TAE: Tris-Acetate + Na₂-EDTA
- TCA: Tricarboxylic acid
- TE: Tris-Cl + Na₂-EDTA
- T_m: Melting temperature
- Tris: Trishydroxymethyl aminomethane
- U: Unit (Enzyme activity)
- v/v: Relación volumen-volumen/Volume-volume ratio
- w/v: Relación peso-volumen/Weight-volume ratio
- WT: Genotipo silvestre/Wild-type
- x g: Gravitational acceleration
- X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside
- Δ: Deletion/Delta
- μg: Microgramo/Microgram
- μL: Microlitro/Microliter
- μM: Micromolar

RESUMEN

El óxido nítrico es una molécula señalizadora con funciones importantes y variadas tanto en plantas como en hongos. En plantas, ha sido estudiado ampliamente en sus funciones de desarrollo, metabolismo y respuesta a enfermedades. Influye en los procesos de germinación, crecimiento radicular, respiración, cierre estomático y respuestas adaptativas a estreses bióticos y abióticos. En el caso de los hongos la biosíntesis y las funciones fisiológicas de esta molécula han sido estudiadas de forma muy limitada, aunque estudios recientes indican que el NO participa en numerosos procesos fisiológicos también en este grupo de organismos. En nuestro grupo de investigación trabajos anteriores han elucidado un rol del NO durante la germinación y desarrollo temprano. Además, también se ha detectado la presencia de NO en el nicho y se ha observado como las alteraciones en la homeostasis del NO afectan el desarrollo de la raíz primaria y proliferación de células meristemáticas. A su vez, se han detectado alteraciones en la biosíntesis, el transporte y señalización de auxinas en los mutantes de la homeostasis de NO. El NO también posee un amplio papel señalizador en hongos, participando en procesos que van desde la infección y colonización hasta la modulación del metabolismo secundario y desarrollo tanto sexual como asexual. Estudios previos han permitido caracterizar el sistema de detoxificación de NO en *B. cinerea* basado en la flavohemoglobina BCFHG1. Esta constituye el principal, y probablemente único, mecanismo detoxificador de NO en *B. cinerea*. *Bcfhg1* se induce con la aplicación de NO exógeno y muestra un patrón de expresión *in planta* que podría conferir ventajas adaptativas a un patógeno necrótrofo durante el proceso de infección. Tomando en cuenta los trabajos antecedentes de esta tesis doctoral, cabe destacar que la sensibilidad de *B. cinerea* a NO exógeno parece depender estado de desarrollo, por lo que podría sugerirse que durante el establecimiento de una interacción entre *B. cinerea* y su huésped existe un flujo de NO al que pueden responder tanto la planta como el patógeno siendo, a su vez una estrategia de defensa de la planta y un medio del hongo para facilitar la infección.

Esta tesis doctoral esta dividida en tres capítulos cuyo eje central es la implicación del NO en la interacción de *B. cinerea* con la planta huésped. En la misma se analizarán diferentes

mutantes afectados en la homeostasis de NO en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se trabajará, además, con otras especies de interés agronómico como son *Vitis vinifera* y *Phaseolus vulgaris*.

En el capítulo uno se presentan resultados relativos a la acción del NO respecto al metabolismo secundario con especial interés en los glucosinolatos. Los glucosinolatos son un grupo de metabolitos secundarios encontrados en 16 familias botánicas de plantas dicotiledóneas angiospermas y particularmente abundantes en la familia Brassicaceae, especialmente importantes en la defensa frente a insectos y patógenos. A pesar de la importancia del NO como molécula señalizadora, la cantidad de estudios sobre la presencia y función en las interacciones planta-patógeno es limitada y esta limitación en la literatura se hace más evidente si nos adentramos en la influencia del NO en la producción de metabolitos secundarios. En este trabajo, nuestro objetivo ha sido estudiar el papel del NO durante la interacción *B. cinerea*-*A. thaliana* con especial énfasis en el metabolismo secundario. Los resultados relativos a la producción de compuestos fenólicos y glucosinolatos, utilizando tanto mutantes de *Arabidopsis* como cepas de *B. cinerea* afectadas en la homeostasis del NO, serán presentados y discutidos con más detalle en este capítulo.

El capítulo dos está enfocado en el análisis de la función de la/s nitrilasa/s en el hongo *B. cinerea*. Los nitrilos son compuestos orgánicos que contienen un grupo funcional (-CN) y suelen ser producidos como metabolitos de defensa de las plantas. Las nitrilasas catalizan la hidrólisis de estos compuestos a sus ácidos carboxílicos correspondientes. Puede que las nitrilasas formen parte de mecanismos que faciliten la colonización de las plantas y que tengan un rol en la síntesis hormonal, la utilización de nitrógeno y el catabolismo de glucosinolatos. *B. cinerea* posee 4 genes codificadores de nitrilasas (*Bcin02g03010*, *Bcin14g00790*, *Bcin05g04960* and *Bcin12g06180*). De estos cuatro genes, previamente se ha comprobado que dos son altamente inducidos con la aplicación de NO exógeno. Esta inducción es mayor en los mutantes del gen *BCFHG1*, codificador de una flavohemoglobina, la cual constituye el método principal de detoxificación de NO que posee el hongo y le confiere protección frente a estrés nitrosativo. El capítulo estará centrado en el análisis funcional de la nitrilasa codificada por el gen *Bcin12g06180*, la cual presentaba la mayor inducción en dicho mutante con la aplicación de NO exógeno.

Por último, tomando en cuenta la importancia de las enzimas nitrilasas en la degradación de los glucosinolatos y la influencia del NO sobre esta en el sistema de *B. cinerea*, decidimos analizar la actividad nitrilasa en Arabidopsis. Arabidopsis posee cuatro genes codificadores de nitrilasas (*NIT1–NIT4*), nombrados consecutivamente en el orden de su descubrimiento. Los mutantes de la homeostasis del NO de Arabidopsis podrían estar afectados en la degradación de glucosinolatos y/o sus productos de hidrólisis por lo que el objetivo de este capítulo es la evaluación de estas enzimas en un sistema afectado en la homeostasis de NO.

Introducción



1.1 El óxido nítrico (NO)

En el año 1901, el explorador británico Sir Aurel Stein descubrió escondidos en un templo budista de China “Los manuscritos de Dunhuang” de los que formaba parte el libro impreso más antiguo del mundo: el “Sutra del Diamante”. Este libro describe prácticas médicas chinas que rondan el año 800 E.C. Uno de los tratamientos para la angina de pecho mencionados en este libro era la colocación de nitrato de potasio (KNO_3) bajo la lengua, “garantizando” la cura. Aunque este tratamiento médico milenario ya matizaba los efectos del óxido nítrico (NO), no fue hasta 1990 cuando se elucidó el mecanismo de este efecto y la formación de esta molécula (Ignarro, 2019).

Jean-Baptiste van Helmont, uno de los alquimistas más importantes de sus tiempos, es generalmente considerado el descubridor del NO en el siglo XVIII. Van Helmont describió la formación de un gas rojo a partir de la reacción de la plata con ácido nítrico, este gas no era NO, si no dióxido de nitrógeno (NO_2), pero abrió las puertas para que Joseph Priestly, reportara el NO como una entidad química única en 1772. Más adelante, John Dalton, padre de la química moderna, con sus experimentos con NO, bosquejaba los principios de su teoría atómica (Figura 1) (Priestley, 1772; Usselman, 2007; Ignarro, 2019; Lancaster, 2020).

Aunque en sus principios se consideraba únicamente como un gas tóxico y contaminante, debido a sus características químicas altamente reactivas, se ha ganado su lugar como una molécula señalizadora ampliamente estudiada. Aun siendo una molécula pequeña, simple y altamente tóxica, el NO posee características únicas y una gran cantidad de efectos fisiológicos importantes tanto en animales como plantas y hongos (Ignarro, 2019).

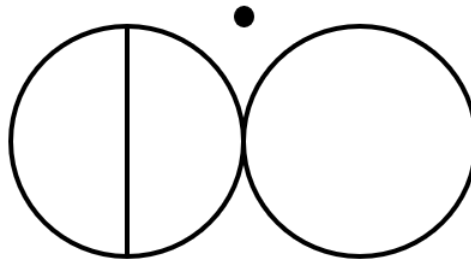


Figura 1. Representación química del NO. Símbolo utilizado por John Dalton para la molécula de NO, padre de la química moderna; versión con la representación del electrón impar (adaptada de Lancaster, 2020).

Uno de los mayores descubrimientos relacionados con el NO es el trabajo de Palmer, Ferrige y Moncada, publicado en junio de 1987 por la revista *Nature*. En este artículo titulado “Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor” se identificaba que las células endoteliales liberaban NO y que este compuesto tenía exactamente las mismas propiedades farmacológicas de lo que se conocía en aquel momento como “Endothelium Derived Relaxing Factor” (EDRF). Describiendo así la primera sustancia química gaseosa producida por células vivas para enviar señales intercelulares (Palmer *et al.* 1987; Berrazueta, 1999).

Pero la historia del NO como molécula señalizadora solo estaba empezando. En 1992 el NO era proclamado como “molécula” del año por la revista *Science* (Koshland, 1992) (Figura 2) y en 1998 Robert Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad obtenían el Premio Nobel en Fisiología o Medicina debido a sus “descubrimientos sobre el papel del NO como molécula mensajera en el aparato cardiovascular”, a finales de la década de los 80. Furchgott, a su vez, agradeció y pidió que fueran tomados en cuenta los trabajos de Moncada: “I feel that the Nobel Prize Committee could have made an exception this year and chosen a fourth person, Salvador Moncada (to share the prize)” (The Nobel Prize, 1998; Berrazueta, 1999).



Figura 2. Portada y editorial de la revista *Science* del año 1992. Volumen 258, número 5090 p. 1861.

Tal es el impacto que ha tenido esta molécula en la comunidad científica que hasta la fecha más de 293.000 artículos que incluyen NO en el título han sido publicados y más de 2.680.000 se refieren a él de alguna forma, además de la creación de una revista científica dedicada solamente a su estudio y la fundación por parte de Louis Ignarro de la “*Nitric Oxide Society*” en el año de 1996.

1.1 Generalidades del NO

El NO puede tener efectos beneficiosos o perjudiciales dentro de la célula dependiendo de su concentración. A bajas concentraciones puede actuar como un segundo mensajero controlando numerosos procesos fisiológicos y a altas concentraciones el NO es una molécula citotóxica utilizada por el huésped como parte de la respuesta defensiva ante los patógenos (Nathan and Shiloh, 2000).

En sistemas animales, el NO tiene un papel importante como neurotransmisor y está relacionado con respuestas inmunológicas, relajación muscular, señalización del oxígeno (O₂) y producción de energía por la vía respiratoria. En bacterias, el NO induce genes relacionados con la protección a estrés oxidativo y actúa como una señal en patogénesis y resistencia. En 1998 se descubrió que el NO también tenía un papel en plantas y ha sido estudiado ampliamente en su función en procesos del desarrollo, metabolismo y respuesta a enfermedades. Algunos de los procesos en los que la regulación por NO se ha demostrado incluyen la germinación, crecimiento radicular, respiración, cierre estomático y respuestas adaptativas a estreses bióticos y abióticos (revisado en Gupta *et al.*, 2011; revisado en Sanz *et al.*, 2015).

En el caso de los hongos, a pesar de que en el año 1996 se demostró que las células fúngicas producen NO, la biosíntesis y las funciones fisiológicas de esta molécula han sido estudiadas de forma limitada en este reino (Ninnemann and Maier, 1996; Schinko *et al.*, 2020; Canovas *et al.*, 2016). Estudios recientes indican que también en este grupo de organismos el NO participa en numerosos procesos fisiológicos (Filippovich and Bachurina, 2021).

1.2 Química del NO

El NO es un gas incoloro e inodoro con muy baja solubilidad en agua (4.6 ml / 100 ml H₂O a 20 °C). Su peso molecular es de 30 g/mol, con un punto de evaporación de -151,7 °C y una densidad en gas de 1,34 kg/m³. Es uno de los pocos compuestos estables que contienen un número impar de electrones, característica que lo convierte en una molécula altamente reactiva.

En un sentido amplio, la química del NO implica una matriz redox de especies como el nitrosonio (NO⁺), el radical NO y el anión nitroxilo (NO⁻), los cuales exhiben propiedades y reactividades distintas (Gisone *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista biológico, podemos considerar como reacciones de gran importancia las que involucran O₂ y sus diferentes estados redox, como también las

reacciones con metales de transición, siendo de especial interés las reacciones con los centros hierro-azufre de las proteínas, incluyendo varias proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y también enzimas (Henry *et al.* 1991).

Al reaccionar con O₂, el NO también genera peroxinitrito (ONOO⁻), y éste a su vez actúa como un agente nitrante y un poderoso oxidante modificando proteínas (formación de nitrotirosina). Este proceso es selectivo, reversible y se ha demostrado que existen rutas dependientes e independientes de ONOO⁻ para la nitración *in vivo* (Davis *et al.* 2001); también es capaz de modificar lípidos (oxidación de lípidos, nitración de lípidos), y ácidos nucleicos (oxidación y nitración del ADN).

Entre los efectos indirectos del NO, podemos mencionar la nitrosación (proceso por el cual el NO⁺ se une a una amina, tiol, o grupo hidróxido), oxidación y nitración (Wink *et al.* 1993). Sin embargo, el método de acción más estudiado del NO es la S-nitrosilación de proteínas, que se refiere al enlace covalente de un nitrosilo al grupo tiol de una cisteína. Esta modificación post traduccional afecta la actividad proteica ya sea por activación, inhibición o translocación (Kovacs and Lyndermayr, 2013).

Cabe destacar que cuando se discute la química y fisiología del NO, se debe tener en cuenta que el NO es un segundo mensajero con una alta capacidad de difusión por lo que puede elicitar efectos relativamente alejados de su lugar de producción. Por ende, la concentración y la fuente del NO son las causas mayoritarias que determinan sus efectos biológicos (Wink and Mitchell 1998; Khan *et al.* 2014). En concentraciones bajas, predominan los efectos directos del NO. A mayores concentraciones predominan los efectos indirectos de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Khan *et al.*, 2014) (Figura 3).

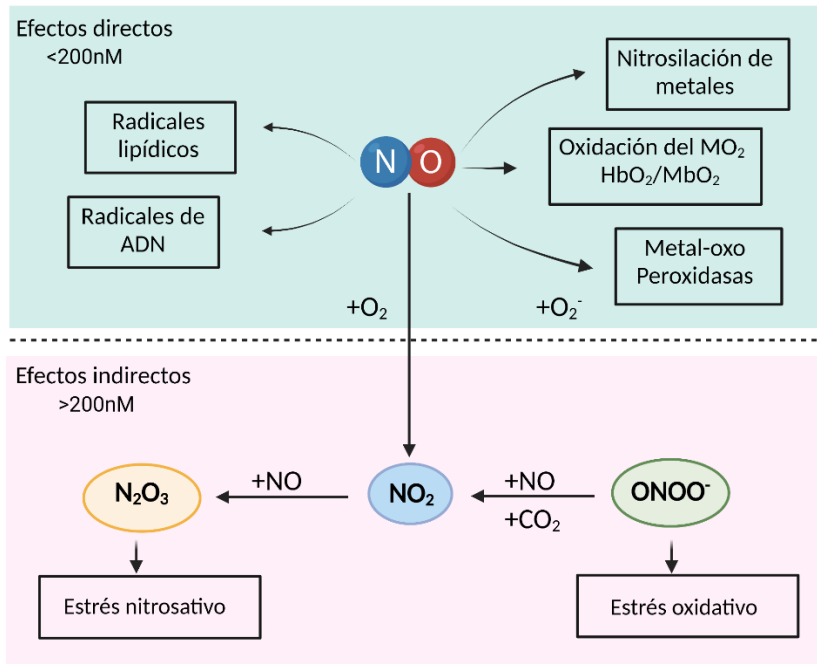


Figura 3. Bioquímica del NO: efectos directos e indirectos. (Adaptado de Thomas *et al.* 2009).

1.3 El NO en plantas

El primer publicación de que las plantas superiores utilizaban NO se realizó mucho antes que en animales por Fewson y Nicholas en el año 1960, mientras que la emisión de NO en plantas no fue observada hasta 1975, en soya (*Glycine max*) tratada con herbicida (Klepper, 1979). Más recientemente se ha demostrado que el NO tiene funciones importantes en el crecimiento y desarrollo vegetal, incluyendo la germinación, el crecimiento radicular, nodulación, floración, regulación del crecimiento del tubo polínico, maduración y senescencia de los frutos y respuestas a estreses bióticos y abióticos (revisado en Corpas *et al.*, 2013; revisado en Manrique-Gil *et al.*, 2020). En la mayoría de estos procesos fisiológicos, el NO participa como una molécula clave a niveles intracelulares e intercelulares (Revisado en Corpas *et al.* 2013).

1.3.1 Homeostasis del NO en plantas

A la hora de considerar la homeostasis del NO en plantas hay que tener en cuenta por una parte los distintos mecanismos o rutas de producción, y por otra, los distintos mecanismos de secuestro y detoxificación.

1.3.1.1 Producción de NO en plantas

En mamíferos, la síntesis de NO es atribuida a la acción de las NO sintasas (NOS), las cuales utilizan L-arginina, O₂, y NADPH, para producir NO (Stuehr, 1999). Con respecto a las plantas, la producción de NO es atribuida a diferentes fuentes enzimáticas y no enzimáticas (Moreau *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Mur *et al.*, 2013). Dependiendo del criterio utilizado para definirlos se han descrito al menos siete rutas diferentes para la producción de NO en plantas, estas rutas de producción, a su vez, pueden ser clasificadas como oxidativas o reductoras (Gupta *et al.*, 2011) (Figura 4).

La producción de NO a partir de la L-arginina, poliaminas y la recién descubierta ruta que utiliza hidroxilamina como sustrato, son rutas oxidativas, mientras que las vías dependientes de la nitrato reductasa (NR), o la producción de NO asociada con la mitocondria y membrana plasmática son reacciones reductoras (Gupta *et al.*, 2011).

La vía reductora no enzimática

En ciertas condiciones particulares, como un pH bajo, ambientes altamente reductores o altas concentraciones de nitrato, la reducción de nitrito a NO puede ocurrir de manera no enzimática. Aunque este tipo de situaciones son raras, pueden significar una producción rápida y eficiente de NO a partir de nitrito (Bethke *et al.*, 2004).

La vía reductora enzimática

La nitrato reductasa (NR) es una enzima citoplasmática multifuncional relacionada en la asimilación y metabolismo del nitrógeno. Es la enzima responsable del primer paso que

limita la velocidad de la asimilación de nitrato, catalizando su reducción y utilizando NADH como donador de electrones (Campbell, 2001).

La importancia de la producción de NO vía actividad NR en fisiología vegetal ha sido claramente demostrada utilizando aproximaciones genéticas y farmacológicas (Wilson *et al.*, 2008; Mur *et al.*, 2013). Por ejemplo, la utilización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la actividad NR (*nia1*, *nia2*, o el doble mutante *nia1nia2*) revelaron el importante papel de la producción de NO vía NR en varios procesos como los movimientos estomáticos, las respuestas hormonales, estreses abióticos, el desarrollo radicular y floral (Hao *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2013; Lombardo and Lamattina, 2012).

Además de la participación de la NR citoplasmática, se ha descrito la intervención de una NR de membrana (Ni:NOR) en la producción de NO en plantas. Esta proteína solo se encuentra en raíces y produce NO desde nitrito en el apoplasto de las células utilizando NAD(P)H (Stöhr *et al.*, 2001).

Por otro lado, el NO puede ser producido desde nitrito como resultado de la acción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La producción de NO dependiente de este mecanismo se ha demostrado en varias especies, incluyendo tabaco, guisante y cebada (Gupta *et al.*, 2005; Gupta and Kaiser, 2010). Esta reacción se localiza en la membrana mitocondrial, es dependiente de la disponibilidad de nitrato y requiere condiciones de anaerobiosis, ya que el O₂ inhibe la reacción. Por este motivo, esta reacción se encuentra restringida a tejidos sujetos a condiciones hipóxicas, como las raíces, y su ocurrencia puede explicarse por la necesidad de un aceptor de electrones para preservar la respiración cuando el O₂ es un factor limitante (Gupta and Igamberdiev, 2011).

La vía oxidativa

Con la identificación del NO como un mediador crucial en los procesos fisiológicos vegetales, innumerables estudios trataron de determinar las fuentes de producción de NO en el reino vegetal, buscando en primer lugar homólogos a la NO sintasa (NOS) de mamíferos. Hasta ahora, se han descrito dos candidatos principales. Por una parte, una variante P del complejo glicina-decarboxilasa en tabaco, pero estudios posteriores demostraron que esta proteína no producía NO, por lo que los artículos referentes a esta

proteína fueron retractados. Por otra parte, se identificó un candidato en *Arabidopsis thaliana* que presentaba homología con una enzima implicada en la síntesis de NO en *Helix pomatia* (Guo *et al.*, 2003). Las investigaciones demostraron que el mutante correspondiente estaba afectado en sus contenidos de NO, pero esta enzima, a la cual se nombró inicialmente AtNOS1 (*nitric oxide synthase 1*), fue caracterizada más adelante como una proteína G pequeña (o pequeña GTPasa) y renombrada en consecuencia como AtNOA1 (*nitric oxide associated 1*) (Moreau *et al.*, 2008).

Por otro lado, a principios de 2010, se caracterizó la primera NOS en el reino vegetal en el alga *Ostreococcus tauri*. Esta enzima produce NO a partir de L-arginina de manera similar a la NOS animal. La importancia de esta enzima en estrés por exceso de radiación también fue demostrada en este modelo (Foresi *et al.*, 2010). Estos resultados demostraron la posibilidad de la presencia de una NOS funcional y endógena en plantas, con un verdadero papel en su fisiología. Pero, aunque se confirmó la presencia de NOS en organismos fotosintéticos, también se demostró que ningún homólogo de NOS ha sido encontrado en los más de 1000 transcriptomas de plantas terrestres analizados (Jeandroz *et al.*, 2016). Estos resultados, en consonancia con los intentos infructuosos de purificar candidatos indican que en las plantas superiores probablemente no existe una NOS canónica. Es probable que el gen NOS fuera transmitido por un ancestro común antes de la formación del grupo eucariota y más adelante fuera perdido en plantas terrestres, siendo la NOS de las algas el único testimonio de estos eventos evolutivos (Jeandroz *et al.*, 2016; Santolini *et al.*, 2017).

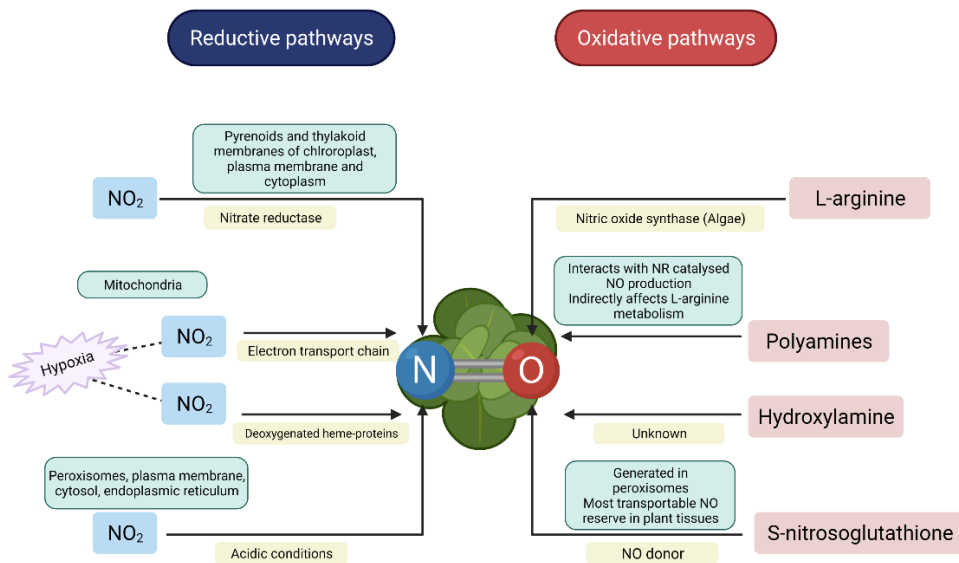


Figura 4. Rutas conocidas de producción y homeostasis del NO en plantas.

1.3.1.2 Mecanismos de secuestro y detoxificación

Ciclo de las hemoglobinas

Las fitoglobinas (PGBs), anteriormente llamadas hemoglobinas no simbióticas (Hill *et al.*, 2016), son proteínas globulares con capacidad de unirse a pequeñas moléculas gaseosas como son el O_2 , NO, CO, y el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Las fitoglobinas utilizan el motivo hemo como cofactor (revisado en Gupta *et al.*, 2011), el cual puede unirse a los sustratos anteriormente mencionados, controlando su acumulación, transporte, secuestro y detoxificación (Arredondo-Peter *et al.*, 1998). En plantas, existen tres clases de PGBs que incluyen las simbióticas (SymPGB y Lb), no-simbióticas (PGB0 1, y 2), y truncadas (PGB3) (Hoy and Hargrove, 2008).

Las PGBs de clase 1 y 2 tienen un papel protagonista en la regulación de O_2 y NO, ya que la primera regula el NO y la segunda controla la difusión controlada de O_2 en los tejidos.

Estas proteínas también están involucradas en el ciclo NO-fitoglobina bajo condiciones hipóxicas, el cual se ha propuesto que atenúa la inhibición de la cadena de transporte mitocondrial causada por la deficiencia de O₂. Este ciclo aumenta los niveles de energía gracias a la oxidación del NAD(P)H, mejorando el transporte de protones, lo cual resulta en la producción de ATP (revisado en Manrique Gil *et al.*, 2020).

Por otro lado, también se ha propuesto que las PGBs 1 y 2 pueden funcionar como NRs bajo ciertas condiciones de hipoxia extrema (Tiso *et al.*, 2012). El NO a su vez, controla las PGBs post-traduccionalmente indicando la existencia de un balance redox y niveles de energía considerablemente afinados.

Sistema de la S-nitrosoglutatión reductasa

El S-nitrosoglutatión (GSNO) es una molécula derivada del NO, la cual es generada por la interacción del NO con el glutatión reducido (GSH) durante el proceso de S-nitrosilación. El GSNO se considera una reserva intracelular de NO, como también un medio de transporte del NO en la célula, lo que permite al NO expandir su actividad biológica. El GSNO es el S-nitrosotiol (SNO) de baja masa molecular (LMM) más abundante. El nivel de GSNO, y por ende la cantidad de proteínas S-nitrosiladas, es regulado por la enzima GSNO-reductasa (GSNOR) (Lindermayr, 2018).

En plantas superiores, la primera descripción de la actividad GSNO reductasa fue conseguido en *Arabidopsis*. Gracias a la expresión heteróloga del ADNc correspondiente (At5g43940) que codificaba una formaldehído deshidrogenasa glutatión dependiente se observó que la proteína recombinante reducía GSNO (Leterrier *et al.*, 2011).

Reacciones no enzimáticas

Como se ha mencionado en secciones anteriores, el NO es una molécula altamente reactiva. Tanto en plantas como animales, el NO se produce en los mismos lugares y al mismo tiempo que las ROS. El NO puede reaccionar con los aniones superóxido y da lugar a ONOO⁻, el cual es un fuerte agente oxidante relacionado con situaciones de estrés oxidativo y, aunque, al contrario que animales, las células vegetales son resistentes al

ONOO^- , la presencia de aniones superóxido influye en la concentración de NO disponible interviniendo en los procesos de señalización (Delledone *et al.*, 2011).

Por otro lado, en sistemas acuosos el NO reacciona con el O_2 , dando lugar al dióxido de nitrógeno (NO_2), que posteriormente se degrada para dar lugar a NO_2^- y NO_3^- (Neill *et al.*, 2003).

En la Figura 5 se presentan las rutas conocidas de secuestro y detoxificación del NO en plantas.

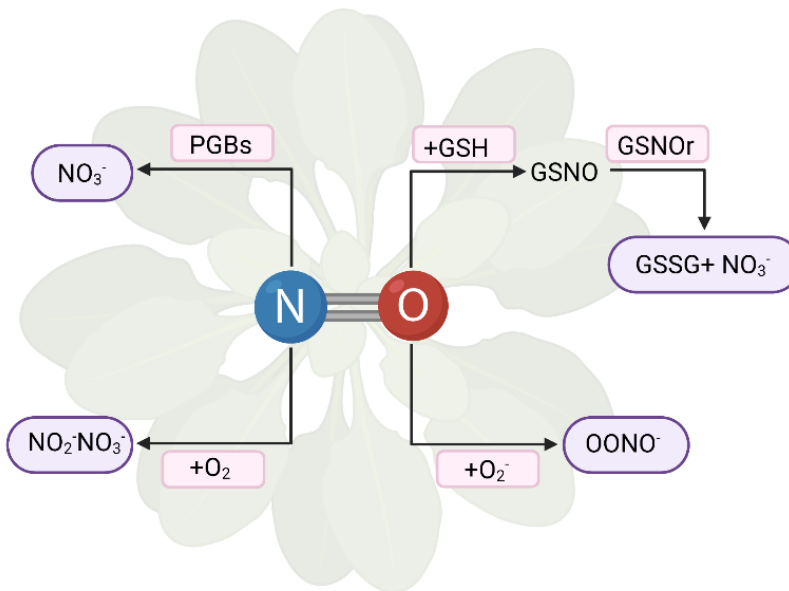


Figura 5. Rutas conocidas de secuestro y detoxificación del NO en plantas.

1.3.2 Funciones fisiológicas del NO en plantas

El NO desempeña numerosas funciones fisiológicas. Destaca en primer lugar su papel en el proceso de germinación de semillas. El NO libre es necesario para que la germinación se lleve a cabo, interaccionando con el factor de transcripción del tipo bZIP ABI5 (revisado en Sánchez-Vicente *et al.*, 2019). El NO se une directamente a ABI5, a través de la S-nitrosilación de la Cys¹⁵³, promoviendo su degradación por el proteasoma (Albertos *et al.*, 2015).

El NO también está implicado de forma importante en el desarrollo radicular, de hecho, se ha descrito que el NO regula el crecimiento radicular mediado por auxinas (Aux) y está implicado en la división y diferenciación de las células localizadas en el meristemo de la raíz primaria (Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Sanz *et al.*, 2014).

Otra etapa del desarrollo en la que el NO está involucrado es la maduración de los frutos. El contenido de NO declina progresivamente durante la maduración y la aplicación de NO exógeno retrasa este proceso. El NO previene el daño por frío, promueve la resistencia a enfermedades post cosecha y preserva el contenido nutricional (Palma *et al.*, 2019). A su vez, el NO está involucrado en la senescencia. Curiosamente, dependiendo del órgano su efecto puede ser positivo o negativo. Por una parte, el NO ralentiza la senescencia en las hojas, pero a la vez tiene un papel señalizador para desencadenar la senescencia en los nódulos radiculares. Es importante destacar el hecho de que el NO probablemente interactúe con otros compuestos reguladores de la senescencia, como hormonas y ROS, y que estos programas de senescencia son órgano-dependientes (Bruand and Meilhoc, 2019).

Por otro lado, aunque poco estudiado, el número de publicaciones que vinculan el NO y las ROS con la embriogénesis somática ha ido en aumento en los últimos años. Se ha demostrado que los compuestos inductores de estrés oxidativo aumentan los niveles endógenos de auxinas y promueven la desdiferenciación celular (Pasternak *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2006). Por su parte, en su trabajo con cultivos celulares de alfalfa Ötvös *et al.* (2005) demostró que el H₂O₂ y el NO tienen un efecto promotor de la

embriogénesis somática. La producción de embriones en *Arabidopsis* también parece ser susceptible a los niveles de NO y aumenta en presencia de donadores como el nitroprusiato sódico (SNP) y la S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), mientras que con la adición del compuesto secuestrador del NO, 2-fenil-5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) se ve disminuida (Elhiti *et al.*, 2013). En la Figura 6 se resumen las funciones del NO en plantas.

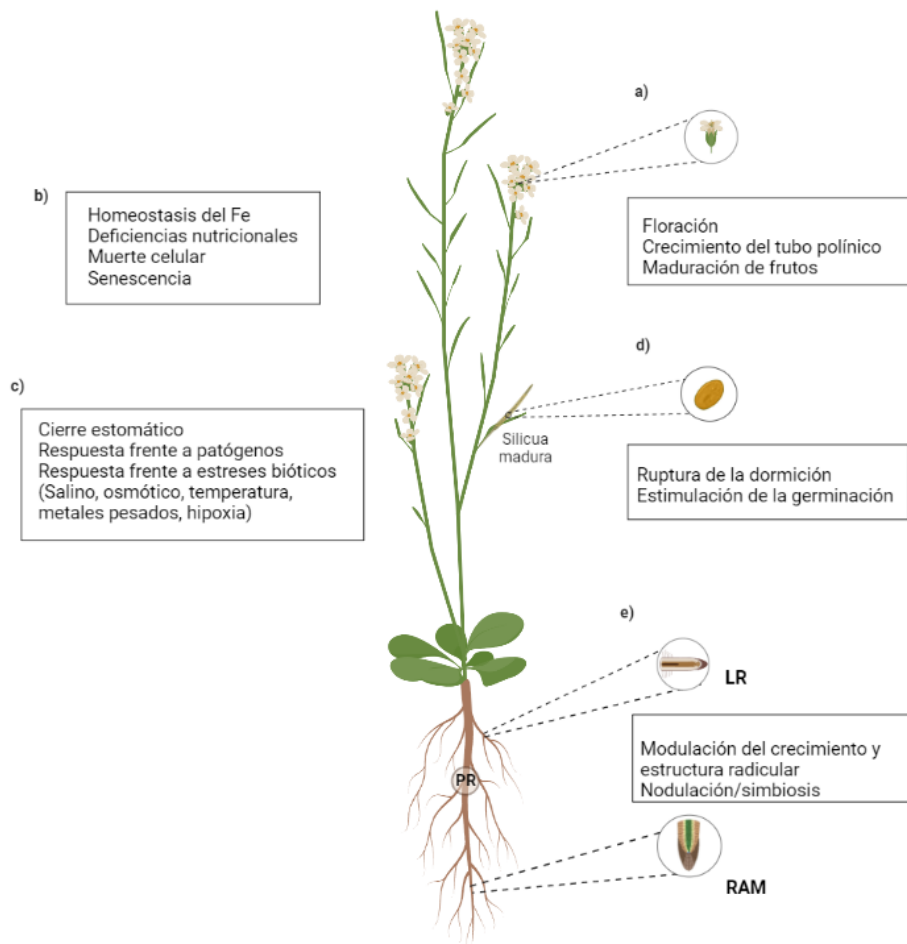


Figura 6. Funciones del NO en plantas. a) funciones en floración b) funciones de desarrollo c) funciones en respuesta a estrés d) efectos en germinación e) efectos en desarrollo y estructura radicular.

1.3.2.1 Funciones fisiológicas del NO en situaciones de estrés biótico

Las plantas dependen de una red compleja de rutas de transducción de señales para responder a los ataques por patógenos y condiciones ambientales no favorables, lo que conlleva a una reprogramación metabólica y transcripcional (Valeri *et al.*, 2020). Varias fitohormonas han sido relacionadas con la defensa de la planta, entre ellas el ácido salicílico (SA), que es comúnmente asociada con patógenos biotrofos, mientras que el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) son asociados con patógenos necrótrofos (Wildermuth *et al.*, 2001; Thaler *et al.* 2004; revisado en Conrath, 2006; Halim *et al.* 2006).

Aunque ya se ha demostrado ampliamente que el NO está implicado en una gran variedad de procesos celulares asociados con crecimiento y desarrollo (revisado en Sanz *et al.*, 2015; revisado en Manrique-Gil *et al.* 2020), se describió por primera vez como una molécula relacionada con la inmunidad de la planta por Delledonne *et al.*, (1998) y Durner *et al.*, (1998). Las defensas basales y la respuesta hipersensible son dependientes de NO (Mur *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha visto que la expresión de las fitoglobinas influencia la respuesta de la planta a una variedad de patógenos, y su supresión resulta en niveles elevados de NO, H₂O₂ y JA en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Botrytis cinerea* (revisado en Mira *et al.*, 2016) (Figura 7).

Una de las respuestas celulares tempranas subsecuentes al reconocimiento de un patógeno es el llamado estallido oxidativo (*oxidative burst*) el cual es una producción rápida y transitoria de ROS, debida al consumo de O₂, y ésta a su vez puede desencadenar la respuesta hipersensible (HR) (Wojtaszek, 1997; Govrin and Levine, 2000; Torres *et al.*, 2006).

En este contexto, resulta difícil separar el NO de las ROS, considerando que sus rutas de señalización en interacciones bióticas se encuentran estrechamente conectadas (revisado en Sánchez-Vicente *et al.*, 2019).

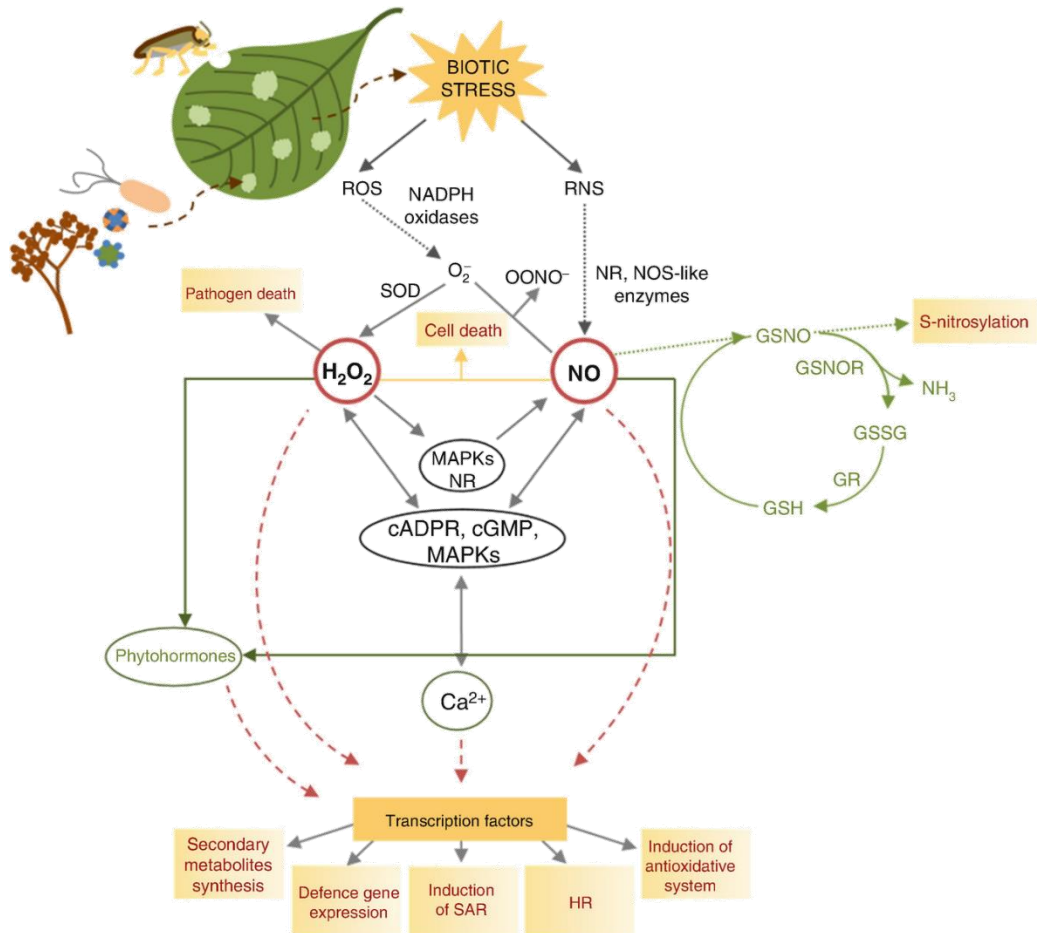


Figura 7. Funciones fisiológicas del NO en situaciones de estrés biótico (Tomado de Čamagajevac *et al.*, 2019).

Varias dianas de S-nitrosilación durante la HR han sido caracterizadas en *Arabidopsis* (Romero-Puertas *et al.*, 2008). El aumento de SA y NO lleva a la regulación de la conformación de NPR1 (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related 1*) uniéndose directamente a través de la Cys^{521/529}, y/o vía S-nitrosilación de la Cys¹⁵⁶ (Tada *et al.*, 2008). Más adelante se estableció un marco de referencia para la función de los nitrosotioles (tiales de cisteína modificados por NO, SNOs) durante la HR y la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Este trabajo mostró que durante los estallidos oxidativos y nitrosativos

la actividad de la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) conlleva un aumento de los SNOs celulares totales, lo que a su vez regula el nivel de muerte celular (Yun *et al.*, 2011).

Por otra parte, cuando las concentraciones de SNOs son altas, el NO lleva a cabo una retroalimentación negativa limitando la HR mediada por la S-nitrosilación de la NADPH oxidasa (Melo *et al.*, 2011). Cabe destacar que una cisteína conservada en el extremo C-terminal, Cys⁸⁹⁰, en la NADPH oxidasa sugiere que este mecanismo podría estar influenciando la respuesta inmune en plantas y animales (Yun *et al.*, 2011).

1.4 El NO en hongos

De manera similar a las plantas, el NO desempeña un papel importante y divergente en la biología de los hongos. El NO regula el crecimiento y desarrollo como una molécula señalizadora y reguladora y además es integrada a la estructura de metabolitos secundarios. El NO se produce en las células de hongos y oomicetos. Independientemente de su estrategia nutricional, los hongos parecen necesitar NO para la activación de su crecimiento y desarrollo, incluyendo la germinación de esporas, penetración de los tejidos vegetales y la formación de esporangióforos y cuerpos fructíferos (Jedelská *et al.*, 2021). En las secciones siguientes se detallará más ampliamente las funciones fisiológicas del NO en hongos y los posibles mecanismos de producción.

1.4.1 Producción de NO en hongos

Los diferentes mecanismos de biosíntesis de NO en hongos son una rama pobremente estudiada, a pesar de la gran cantidad de estudios acerca de la asimilación y metabolismo del nitrógeno y que ya hace años se demostró que los hongos producían NO (Ninnemann and Maier 1996; Cánovas *et al.*, 2016).

Los hongos no cuentan **con** una enzima NOS canónica como en mamíferos con excepción de algunas especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae* y *A. niger*) y *Glomerella graminicola* (Turrión-Gómez and Benito, 2011). No obstante, sí se ha logrado demostrar

que las células fúngicas son capaces de **llevar a cabo la** denitrificación y de fermentar amonio (Takaya, 2002), procesos que son detonados en respuesta a hipoxia y que promueven la generación NO y activan la respuesta a estrés nitrosativo (Hillmann *et al.* 2015). Este mecanismo consiste en tres reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas NR, NiR y NoR.

Los hongos *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon tonkinense* y *Fellomyces fuzhouensis* poseen una NiR disímil que cataliza la reducción de NO_2^- a NO asociada con la síntesis de ATP en la mitocondria (Abraham *et al.*, 1993; Kobayashi and Shoun, 1995; Kobayashi *et al.*, 1996; Uchimura *et al.*, 2002). Por otra parte, utilizando espectrometría de masas con introducción de membrana (MIMS)/ espectrometría de masas de ionización de resonancia (RIMS), se ha demostrado la síntesis de NO inducida por nitrito en cultivos de hongos **y oomicetos** fitopatógenos como *Pythium*, *Botrytis* y *Fusarium* (Conrath *et al.*, 2004).

No obstante, en la búsqueda del mecanismo de producción de NO a través de NR, el hongo *B. cinerea* fue incubado con NO_3^- pero no fue posible detectar la presencia de NO, sugiriendo que otro sistema fisiológico y genético diferente de NOS y NR es responsable de la producción de NO en este hongo (Turrion-Gomez and Benito, 2011). En la Figura 8 se presentan las rutas conocidas de producción de NO en hongos.

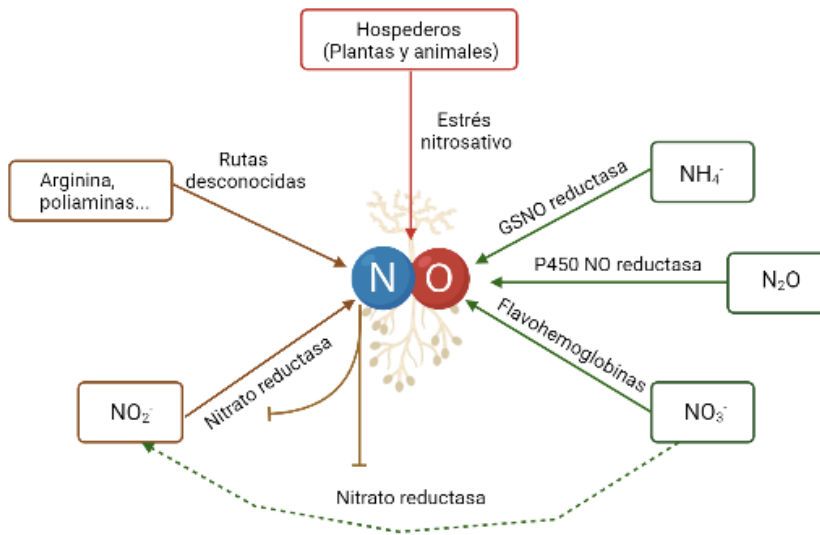


Figura 8. Rutas conocidas de producción de NO en hongos. Adaptado de Cánovas *et al.*, 2016.

1.4.2 Funciones fisiológicas del NO en hongos

Varias investigaciones han evaluado la implicación del NO en sistemas fúngicos. Por ejemplo, Wang y Higgins (2005) describieron la acumulación de NO en conidios e hifas de *Colletotrichum coccodes*, y que su intensidad y localización cambiaban dependiendo el estado de desarrollo que presentara el hongo. Otras aproximaciones han demostrado el papel regulador del NO durante la germinación, ya que un exceso de NO inhibía este proceso y el secuestro de NO lo aceleraba. Además, en *B. cinerea*, la producción de NO se ha detectado en todos los estadios de desarrollo, desde esporas hasta micelio maduro (van Baarlen *et al.*, 2004; Turrion-Gomez and Benito, 2011). Cabe destacar, que la producción de NO observada en esporas en germinación y micelio maduro, tanto en condiciones *in vitro* como *in planta* mostraron que este compuesto era capaz de difundir fuera de las células fúngicas donde se producía (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; Turrion-Gomez and Benito, 2010).

Por su parte Dean y Timberlake (1989) propusieron un umbral de NO requerido para cambiar de desarrollo asexual a desarrollo sexual en *A. nidulans*. Otros estudios han

resaltado el impacto de los niveles de NO en el balance de reproducción sexual y asexual. En *A. nidulans*, elevar artificialmente los niveles de NO reduce la conidiación y aumenta la formación de cuerpos fructíferos sexuales (Marcos *et al.*, 2016). La reducción de la conidiación podría explicarse debido a la incapacidad de activar transcripcionalmente genes específicos de esporulación inducidos por altos niveles de NO exógeno (Chiuchetta and Castro-Prado, 2005). Recientemente, se ha demostrado que niveles distintos de NO impactan de manera diferente en la expresión de *nsdD* en la regulación de desarrollo sexual y *brlA* en la regulación de la conidiación (Marcos *et al.*, 2016).

Por otro lado, la homeostasis de los niveles celulares de NO es regulada tanto por la síntesis de NO como por la expresión de flavohemoglobinas detoxificadoras de NO. La delección de los genes *fhb* en *A. nidulans* resultó en un aumento de niveles celulares de NO seguidos por un aumento en la producción de células Hülle y un aumento en la reproducción sexual (Baidya *et al.*, 2011). *B. cinerea* también posee un gen codificador de una flavohemoglobina implicada en la detoxificación de NO (Turrion-Gomez and Benito, 2011), de la cual se hablará con más detalle en los apartados siguientes.

Un resumen gráfico de las funciones del NO en hongos puede observarse a continuación en la Figura 9.

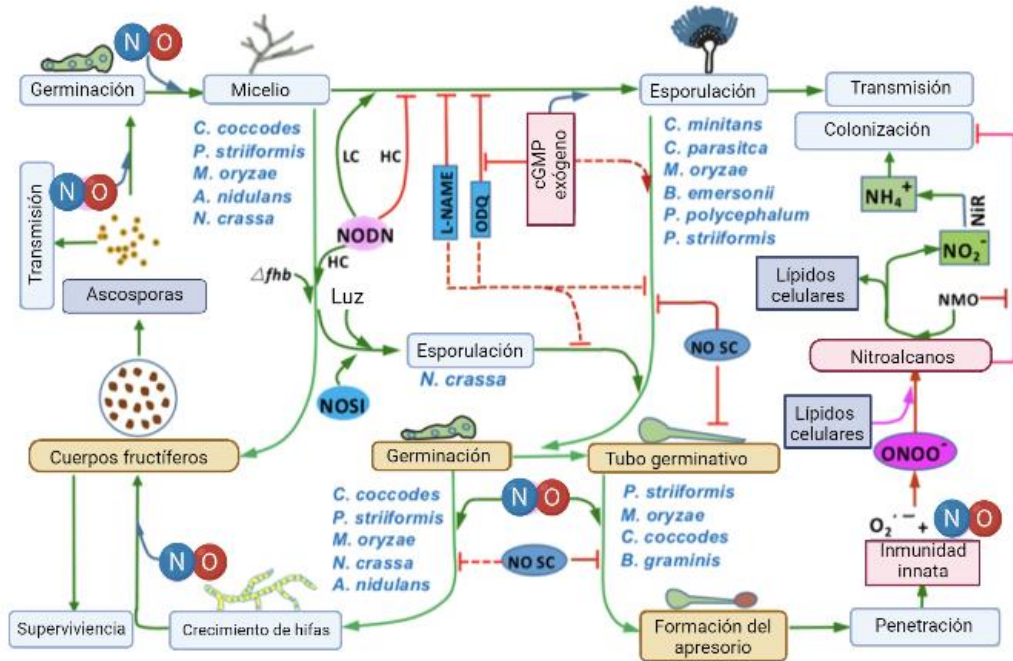


Figura 9. Funciones fisiológicas del NO en hongos. Adaptado de Zhao *et al.*, 2020.

1. *Botrytis cinerea*

2.1 Generalidades e importancia económica

B. cinerea es el hongo causal de la enfermedad llamada “podredumbre gris”, pertenece al género Ascomycota y se caracteriza morfológicamente por su micelio fino blanco o blanco grisáceo que puede observarse sobre el área de la planta infectada, necrótica o decaída (Spadaro *et al.*, 2020). El género *Botrytis* consiste en aproximadamente 35 especies necrotróficas, algunas de las cuales tienen un amplio rango de hospederos, entre ellas *B. cinerea* afecta aproximadamente a 1400 especies de plantas (Elad *et al.*, 2016). Ejemplos de importancia económica incluyen el tomate, pimiento, vid, fresas, frambuesas, manzana, pera, garbanzos, entre otros (Plesken *et al.*, 2015) (Figura 10).

El mercado de productos anti-*Botrytis* rondó los 15-25 millones de dólares en años recientes. Mundialmente, causa pérdidas anuales de hasta 100 billones de dólares. Es capaz de contrarrestar una amplia cantidad de compuestos de defensa de la planta, y es uno de los patógenos de plantas más ampliamente estudiados (Boddy, 2016). La intensidad de las medidas tomadas por agricultores continua sin disminución a través de los últimos años, pero el entendimiento de los procesos que gobiernan el ciclo de vida, patogenicidad y epidemiología ha aumentado exhaustivamente.

En los últimos 125 años, *Botrytis* ha sido objeto de investigación de un número en aumento de especialistas en diversos campos como son química, bioquímica, biología molecular y celular, genética, morfología e histología, taxonomía, ecología y epidemiología, siendo la fuente de una inmensa cantidad de publicaciones científicas (Richards *et al.*, 2021).

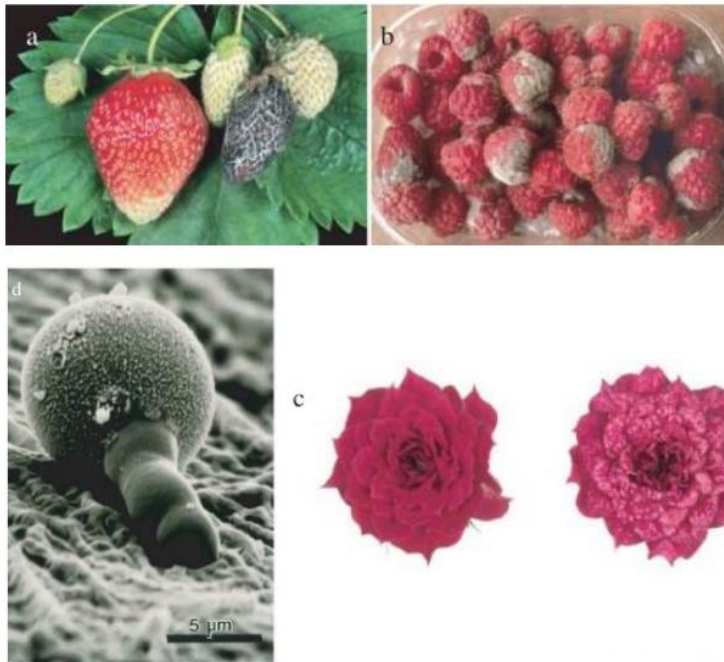


Figura 10. Hospederos de *Botrytis cinerea* colonizados por el hongo (a, b y c) y una espora en germinación (d). (Tomado de Williamson *et al.*, 2007).

2.2 Sistemática y descripción morfológica

B. cinerea pertenece al phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae. Es considerado un hongo necrótrofo por excelencia: ataca a numerosos huéspedes, posee enzimas degradadores de la pared celular, mata rápidamente a la planta huésped y es capaz de extraer nutrientes de tejidos muertos (Plesken *et al.*, 2014; Tudzynski and Kokkelink, 2009).

Su forma perfecta, *Botryotinia fuckeliana*, la cual es poco común en la naturaleza, fue descrita por de Bary en 1886 como un apotecio pedicelario de color marrón que nace sobre un esclerocio. La parte fértil está formada por ascas entremezcladas por hifas de longitud similar e incolora. Las ascas son cilíndricas, planas en la parte superior y contienen 8 ascosporas elípticas, incoloras y de dimensiones sobre 6-9 por 5-6 µm.

El micelio de su forma imperfecta, *B. cinerea*, es ramificado, septado y puede ser desde hialino hasta marrón y posee de 11 a 23 μm de diámetro. Los conidióforos que emergen directamente desde el micelio o esclerocios son altos, finos, ramificados de manera irregular en la porción terminal y soportan los grupos de conidios en pequeños dentículos. Los conidios son lisos, hialinos o grises, ovalados y tienen una longitud media de 10 μm y un ancho medio de 5 μm (Barnett and Hunter, 1998).

Los esclerocios, que son las estructuras de supervivencia, son comunes. Estas estructuras se forman a partir de ramificaciones de micelio que se fusionan y forman una masa globular, la cual es al principio hialina/blanquecina pero más adelante se torna marrón o negra debido a la deposición de pigmentos de melanina en la corteza exterior. Esta cobertura melanizada y los β -glucanos que revisten el micelio protegen los esclerocios de la desecación, radiación UV y ataques microbianos durante largos periodos de tiempo (Williamson *et al.*, 2007).

Cuando las condiciones ambientales son favorables, los esclerocios germinan dando lugar a conidióforos (lo cual es lo más común) o, después de un proceso sexual, el crecimiento de un apotecio (Jarvis, 1977). Por otra parte, los microconidios proporcionan un método microscópico y alternativo de propagación cuando *Botrytis* se encuentra en condiciones adversas. Por lo general, se encuentran en cultivos antiguos o contaminados por otros organismos y asociados a esclerocios. Los microconidios se desarrollan a partir de tubos germinativos producidos por los macroconidios o endógenamente, dentro de células huecas de hifas maduras y a partir de apresorios y esclerocios (Fukumori *et al.*, 2004; Holz *et al.*, 2007).

2.3 Ciclo de vida y epidemiología

El ciclo de vida de *Botrytis* comprende una fase vegetativa o anamorfa en la cual el micelio produce conidios asexuales (macroconidios) y en circunstancias ambientales adversas produce esclerocios (Beever and Weeds, 2007), y una fase sexual en la que se producen apotecios, la cual fue reportada por primera vez por Groves and Drayton en 1939.

B. cinerea es un ejemplo típico de hongo necrótrofo: primero mata las células del huésped y posteriormente coloniza el tejido necrótico (Amselem *et al.*, 2011). La temperatura mínima de crecimiento son 0°C mientras que la óptima es de 20°C con un máximo de 30°C. Por consiguiente, *B. cinerea* puede desarrollarse fácilmente durante el almacenamiento post cosecha de frutas y vegetales aun cuando estos estén realizados en frío.

En climas templados, los esclerocios germinan funcionando como una fuente de inóculo primario en los cultivos. Además, el micelio también puede sobrevivir en las células muertas del hospedero y dentro de algunas semillas, sirviendo de fuente primaria de inóculo en periodos fríos o de condiciones desfavorables para el hongo. En cultivos perennes, las hojas, flores y frutas muertas contienen masas de micelio que en muchas ocasiones están idealmente situados en la zona apical de los cultivos para producir conidios e iniciar infecciones (Williamson *et al.*, 2007) (Figura 11).

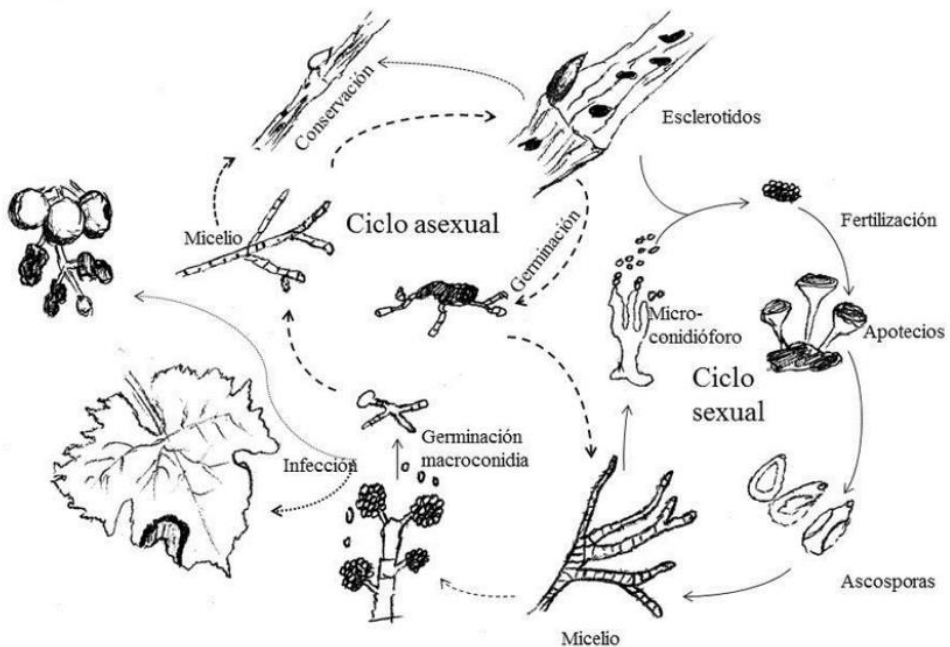


Figura 11. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* (elaborado por Martínez-Bracero, 2019 y adaptado de Billard, 2011).

B. cinerea produce una gran cantidad de esporas asexuales, las cuales, cuando entran en contacto con la superficie de la planta, germinan y forman un apresorio y una clavija de penetración que rompe la cutícula de la planta (Romanazzi and Feliziani, 2014). Si se producen estructuras de infección verdaderas durante este proceso aun es un tema de debate. Una vez el hongo penetra en la planta el proceso de muerte celular comienza y se establece una lesión primaria en la que pueden producirse respuestas de defensa y necrosis (revisado por Prusky, 1996).

Cabe destacar que el hongo secreta enzimas como cutinasas y lipasas y además produce H_2O_2 para facilitar la entrada a la planta. Una vez la cutícula ha sido vulnerada, la hifa de penetración alcanza una célula de la epidermis y crece en la pared celular rica en pectina que es perpendicular a la superficie de la planta, lo que resulta en una rápida maceración del tejido vegetal en el cual el hongo finalmente esporula y produce el inóculo para la siguiente infección (Romanazzi and Feliziani, 2014).

Por otro lado, además de las cutinasas y lipasas, *B. cinerea* produce varios compuestos que causan la muerte de la planta huésped, incluyendo metabolitos de bajo peso molecular como el botridiol y el ácido oxálico. Durante la etapa de penetración y formación de las lesiones primarias, el hongo desencadena un estallido oxidativo en la planta, acumulación de radicales libres y respuesta hipersensible. Además, *B. cinerea* es capaz de suprimir la inmunidad del huésped produciendo ARN de silenciamiento (sRNA) (Weiberg *et al.*, 2013). Asimismo, el hongo también produce pectinasas, celulasas y hemicelulasas que descomponen la pared celular. En condiciones óptimas, el ciclo de infección puede completarse en periodos tan cortos como 3-4 días, dependiendo del tipo de tejido y la planta atacada (Boddy, 2016).

En el campo, la podredumbre gris puede ser parcialmente controlada con una combinación de fungicidas, aunque el control biológico en flores y frutas utilizando microorganismos antagonistas presenta potencial futuro. Entre las medidas de control importantes podrían destacarse la eliminación de material infectado y la reducción de la humedad durante el almacenamiento de frutos y bulbos, como también en los invernaderos (Boddy, 2016).

2.4 El NO en *B. cinerea*

Para colonizar satisfactoriamente a la planta los hongos fitopatógenos han desarrollado una amplia variedad de estrategias para evadir, contraatacar o aprovecharse del sistema inmune de las plantas y así completar su ciclo de vida y asegurar la reproducción de una progenie viable. Estos mecanismos incluyen sistemas de resistencia a estrés nitrosativo y oxidativo (Marroquin-Guzman *et al.*, 2017).

Como se mencionaba en secciones anteriores, las investigaciones han demostrado que el NO está involucrado en la regulación de varios procesos fisiológicos y del desarrollo en hongos, dentro de los que destacan la germinación de las esporas, el crecimiento y desarrollo, el metabolismo secundario y la protección frente a condiciones ambientales adversas (Rószler, 2012). A pesar de esto, la literatura sobre los efectos y sistemas de producción de este gasotransmisor en *B. cinerea* es escasa. Varios estudios ya han demostrado que este necrótrofo dispone de varios sistemas enzimáticos que contribuyen a la protección frente a los efectos tóxicos de las ROS, como también sobre los efectos de estas especies reactivas en la fisiología del hongo tanto durante el crecimiento saprofítico y durante la interacción con el huésped (Lyon *et al.*, 2004). Ya en 2004 se demostró que *B. cinerea* producía NO como respuesta al estrés producido por el fungicida F500 en condiciones aeróbicas (Conrath *et al.*, 2004), mientras que la producción de NO por *B. cinerea* durante la infección *in planta* ha sido localizada mediante reacciones de quimioluminiscencia por diversos autores (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; van Baarlen *et al.*, 2004; van Baarlen *et al.*, 2007).

En los trabajos de Turrión-Gómez *et al.*, 2010 y Turrión-Gómez and Benito, 2011, antecedentes de esta tesis doctoral, se caracterizó el sistema de detoxificación de NO en *B. cinerea* basado en una enzima de tipo flavohemoglobina. En *B. cinerea*, el gen *Bcfhg1* es el único gen codificador de enzimas de tipo flavohemoglobina identificado en su genoma. La flavohemoglobina BCFHG1 constituye el principal y probablemente único mecanismo detoxificador de NO en *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). La expresión de *Bcfhg1* es inducible por NO exógeno y muestra un patrón de expresión *in planta* que podría conferir ventajas adaptativas a un patógeno necrótrofo durante el proceso de infección. Sin embargo, la flavohemoglobina no puede ser considerada como un factor de

patogenicidad en este hongo ya que los mutantes $\Delta Bcfhg1$ no presentan alteraciones en su capacidad infectiva. No obstante, el sistema de detoxificación de NO basado en BCFHG1 es muy eficiente, como demuestra el hecho de que los mutantes $\Delta Bcfhg1$ sean incapaces completamente de detoxificar NO (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). El gen *Bcfhg1* no se expresa en esporas en estado de reposo, presenta un nivel basal en esporas activadas, muestra un pico de expresión durante la fase de germinación de las esporas (entre las 4 y las 6 horas de cultivo en medio líquido en agitación) y decae posteriormente a los niveles basales de expresión en fases posteriores de desarrollo y crecimiento del micelio (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

B. cinerea produce NO tanto en la fase de esporas en germinación como en la fase de desarrollo de micelio y este NO producido por el hongo difunde al medio circundante. La producción de NO por *B. cinerea* es, además, estimulada por la adición de NO exógeno durante la fase de micelio en crecimiento, aunque no durante el desarrollo de las esporas (Turrión-Gómez and Benito, 2011). Podría suponerse que la sensibilidad de *B. cinerea* a NO exógeno depende del estado de desarrollo por lo que podría sugerirse que durante el establecimiento de una interacción entre *B. cinerea* y su huésped existe un flujo de NO al que pueden responder tanto la planta como el patógeno (Turrión-Gómez & Benito, 2011) siendo a su vez una estrategia de defensa de la planta y un medio del hongo para facilitar la infección (Figura 12).

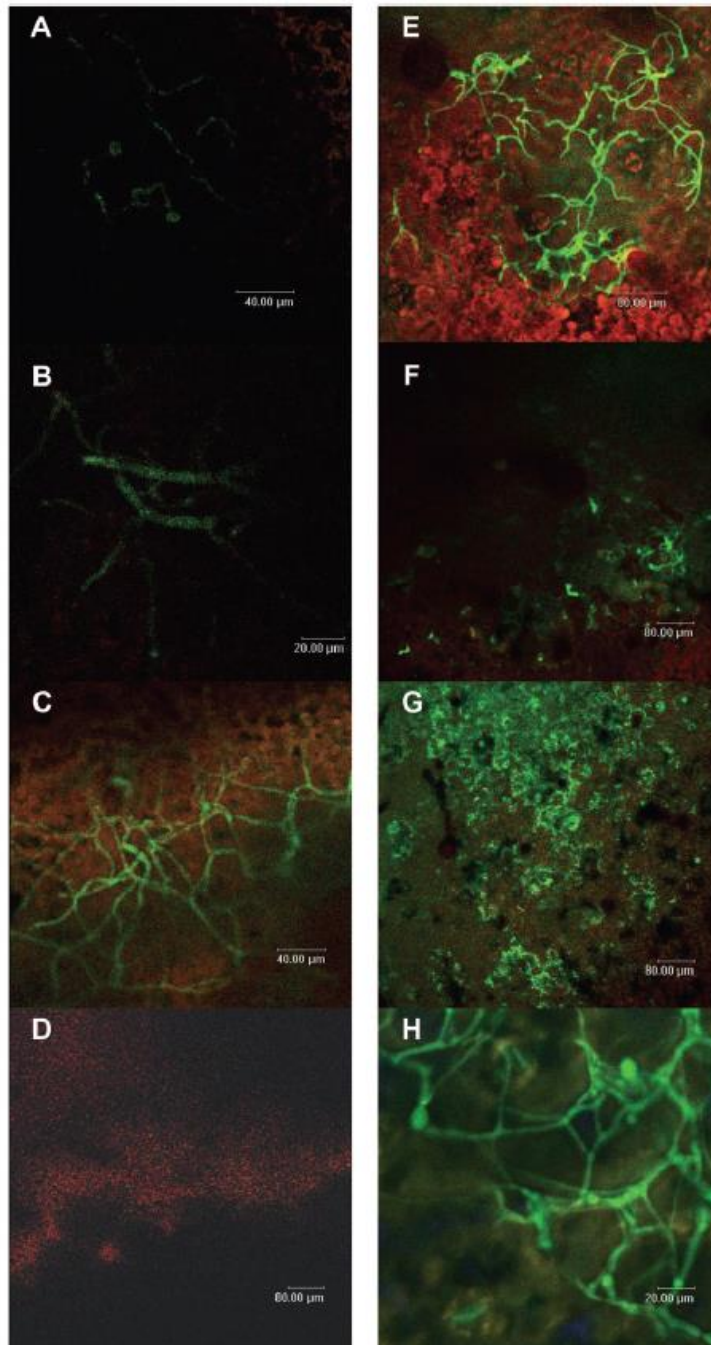


Figura 12. Visualización de NO con la sonda fluorescente DAF-2DA durante la interacción de *Botrytis cinerea* con hojas de tomate (A-D) y hojas de tabaco (E-H). (Turrión-Gómez, Tesis Doctoral, 2010).

2. Señalización hormonal en la interacción *A. thaliana* y *B. cinerea*

La defensa de la planta frente a los patógenos es un complejo proceso biológico que involucra importantes cambios a nivel bioquímico, molecular y fisiológico. Una vez se detecta un patógeno, se activan las redes señalizadoras en la planta, a través de la generación de pequeñas moléculas señalizadoras y su balance con las rutas hormonales para iniciar los mecanismos de defensa (AbuQamar *et al.*, 2017).

Se conoce ampliamente que el SA posee un papel importante en la defensa contra patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que el JA y ET están activamente involucrados en la defensa contra insectos herbívoros y patógenos necrótrofos, incluyendo *B. cinerea* (War *et al.*, 2012; Glazebrook, 2005). Algunos trabajos publicados, estudiando expresión génica, han revelado que tanto las rutas del SA con del JA/ET están involucradas en la respuesta a patógenos biotrofos y necrótrofos (Antico *et al.*, 2012; Toth *et al.*, 2016).

Otras fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA) y los brasinoesteroides (BRs) también regulan la inmunidad de las plantas, principalmente interactuando con factores de transcripción o a través de la biosíntesis de camalexina o la deposición de callosa (Audenaert *et al.*, 2002; Denancé 2013). Por otro lado, varios estudios han proporcionado evidencias notables sobre la interacción del SA, JA y ET con otras hormonas en la regulación de las respuestas de defensa de la planta frente a *B. cinerea* (De Bruyne *et al.*, 2014).

3.1 Ácido salicílico (SA)

El SA es un importante regulador de las respuestas de defensa de la planta. Varios mutantes de *A. thaliana* afectados en la resistencia a patógenos, tanto bacterianos como fúngicos, presentan defectos en la acumulación, percepción o transducción del SA. A pesar de esto, el papel de las defensas dependientes de SA contra los hongos necrótrofos no está claro.

En Ferrari *et al.* (2003) se determinó la susceptibilidad de un grupo de mutantes de *Arabidopsis thaliana* previamente catalogados como afectados en la respuesta de defensa a *B. cinerea*.

El desarrollo de los síntomas en las hojas infectadas estuvo afectado por respuestas mediadas por los genes *EIN2*, *JAR1*, *EDS4*, *PAD2*, y *PAD3*. Además, plantas que expresaban el transgén *nahG* o tratadas con un inhibidor de la fenilalanina amonioliasa (PAL) presentaron un mayor desarrollo de los síntomas, sugiriendo que el SA producido vía PAL actúa en el desarrollo de la lesión. Aunque los mutantes de *npr1* presentaban una susceptibilidad normal al patógeno, el doble mutante *ein2 npr1* se vio significativamente más afectado que los mutantes simples de *ein2*, mientras que la aplicación de SA exógeno disminuyó el tamaño de las lesiones en un mecanismo dependiente de *NPR1* (Ferrari *et al.*, 2003).

En otro estudio, llevado a cabo por Dieryckx *et al.*, (2015), se observó que el SA inhibe el crecimiento de *B. cinerea in vitro*. Este efecto inhibitorio también fue observado con la utilización de dos derivados del SA, el ácido metilsalicílico y ácido acetilsalicílico. Los análisis proteómicos mostraron que el proteoma del micelio, tanto de forma intracelular como extracelular, se vio afectado en los tratamientos con SA.

Cabe destacar, el estudio donde el botridiol, un sesquiterpeto fitotóxico producido por *B. cinerea*, induce la HR, la deposición de callosa, acumulación de ROS y la expresión de *PR1* y *PDF1.2*. En este estudio, las plantas de *Arabidopsis* y tabacos deficientes en la señalización de SA fueron más resistentes al efecto del botridiol que el genotipo silvestre, mientras que las plantas defectivas en la señalización del JA fueron más susceptibles. Estas observaciones llevaron a concluir que los efectos de estos compuestos están mediados por las rutas de señalización del JA y SA (Rossi *et al.*, 2011).

3.2 Ácido jasmónico (JA)

La ruta de señalización del JA está implicada en la regulación de varios procesos, incluyendo crecimiento, fertilidad y defensa frente a insectos y hongos necrótrofos (Howe and Jander, 2008; Browse, 2009). En respuesta a herbívoros el JA se acumula y desencadena grandes cambios en la expresión génica (Reymond *et al.*, 2000, 2004; De Vos *et al.*, 2005; Ehlting *et al.*, 2008).

Los jasmonatos son derivados de una familia de ácidos grasos oxigenados llamados oxilipinas (Wasternack and Kombrick, 2010). El JA se sintetiza con la conversión de ácido α -linoleico a ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) en una serie de reacciones enzimáticas en el cloroplasto (Kazan and Manners, 2008). El OPDA es subsecuentemente transportado a los peroxisomas donde experimenta una serie de reacciones β -oxidativas que generan JA (Vick and Zimmerman *et al.*, 1984; Wasternack, 2007).

Como respuesta a situaciones de estrés el JA se conjuga a Isoleucina (Ile) y se une a un complejo receptor que consiste en las proteínas CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) y JASMONATE ZIM-domain (JAZ) (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). COI1 es parte del complejo Skip/Cullin/Fbox ubiquitina E3 ligasa que participa en la ubiquitinación de las proteínas diana y su posterior degradación por el proteasoma 26S. En ausencia de JA-Ile, los represores JAZ se unen a los factores de transcripción del tipo MYC (Lorenzo *et al.*, 2004) y bloquean su actividad interactuando con NINJA y el correpresor TOPLESS (Pauwels *et al.*, 2010). Con la acumulación de JA-Ile y su unión a COI1, los represores JAZ son degradados por SCF^{COI1}, y permiten la unión de MYC2 a los promotores activando la transcripción de los genes de respuesta a JA (Chini *et al.*, 2007).

La ruta de señalización de JA responde fuertemente al ataque de hongos necrótrofos y la respuesta iniciada suele ser más efectiva que la de genes de resistencia o la ruta asociada a SA (Spoel *et al.*, 2007). La señalización dependiente de JA causa un aumento de la síntesis de JA e induce la expresión de genes de defensa efectores como *PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)*, *THIONIN 2.1 (THI2.1)* y *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN (VSP)* (Glazebrook, 2005).

En *Arabidopsis*, todas las actividades conocidas del JA parecen necesitar a COI1 (Glazebrook 2005). Muchos estudios han caracterizado su papel en la defensa contra una gran variedad de hongos necrótrofos. Adicionalmente, los mutantes *coi1* presentan susceptibilidad a *A. brassicicola*, *B. cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina* (Thomma *et al.*, 1998). El triple mutante *fad3 fad7 fad8*, un mutante de la biosíntesis de JA también muestra susceptibilidad a *A. brassicicola* (McConn and Browse, 1996; Stintzi *et al.*, 2001) y el mutante de señalización del JA *jar1* (insensible a JA) muestra susceptibilidad a *B. cinerea* (Kachroo and Kachroo, 2009).

Además, el ortólogo en tomate de *coi1*, conocido como *jasmonate insensitive 1 (jai1)* y el mutante *acyl-coA oxidase (acx1)*, el cual es deficiente en la biosíntesis de JA, presentan ambos susceptibilidad a *B. cinerea* (Antico, 2012).

3.3 Etileno (ET)

El ET es una hormona gaseosa que regula varios procesos fisiológicos y del desarrollo en plantas, como son la germinación, la senescencia de hojas y flores, maduración y abscisión, y que también está implicada en la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Abeles, 1992). Hoy en día, la ruta de transducción primaria del ET se conoce en detalle e involucra proteínas receptoras de membrana del retículo endoplasmático. Diverge aguas abajo de la proteína reguladora central EIN2, llevando a la activación de varios factores de transcripción como EIN3/EIL que en conjunto con otros factores regulatorios ERFs condicionan las respuestas (Lorenzo *et al.*, 2003; Guo and Ecker, 2004).

El aumento de la producción de ET es una respuesta temprana y activa de las plantas ante la percepción del ataque de un patógeno y está asociada con la inducción de las defensas (Boller, 2018). Generalmente, se asume que la producción de ET durante el estrés contribuye a la resistencia, pero varios hongos y bacterias fitopatógenas son capaces de producir ET como un factor de virulencia, lo cual aumenta sus capacidades de infectar a la planta (Arshad and Frankenberger, 2002; Chagué *et al.*, 2006). Esta discrepancia en la función del ET en la respuesta a patógenos ha sido estudiada en varios patosistemas. Algunos autores han aplicado ET gaseoso directamente a las plantas o utilizado etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), un regulador químico que se descompone en ET, ácido hidrocloreídrico y ácido fosfónico cuando es asimilado por las plantas (Abeles, 1992; Boller, 2018).

Otros estudios han utilizado inhibidores de la síntesis de ET o de su acción. Dependiendo de las condiciones y del patosistema, se han obtenido resultados que pueden ser contradictorios (Abeles, 1992; Boller, 2018; Arshad and Frankenberger, 2002). Por ejemplo, el ET parece favorecer la infección de *B. cinerea*, pero en zanahoria, el ET parece estar involucrado en resistencia (van Loon *et al.*, 2006). En general, los tratamientos con ET promueven la senescencia y maduración de los frutos, lo cual puede hacer que los

tejidos sean más susceptibles o resistentes a los ataques de patógenos (Panter and Jones, 2002). En muchos casos se ha observado que cuando se aplica ET antes de la inoculación con un patógeno, se reduce o no tiene ningún efecto en su patogenicidad, mientras que la enfermedad se desarrolla con más velocidad cuando el ET es aplicado después de la infección (Abeles, 1992). Por lo tanto, parece ser que el momento en que la planta es expuesta a ET puede determinar si la resistencia es estimulada o reducida.

3.4 Ácido abscísico (ABA)

Con algunas excepciones, el ABA es considerado como un regulador negativo de la resistencia a patógenos. Este efecto negativo parece deberse a que el ABA interfiere con la señalización ante estrés biótico que regulan el SA, JA y el ET. Se ha demostrado que un aumento en los niveles de ABA se correlaciona con un aumento de la susceptibilidad y que cuando se reducen los niveles de ABA aumenta la resistencia a una variedad de patógenos (AbuQamar *et al.*, 2017). Poco se conoce sobre el motivo por el que el ABA causa susceptibilidad a los patógenos, ya que el ABA no inhibe ni estimula directamente el crecimiento de los hongos (Lamichhane *et al.*, 2016; Denancé 2013). Se ha observado que el tratamiento con ABA suprime la síntesis de fitoalexinas y que inhibe la actividad y acumulación de la PAL (Lamichhane *et al.*, 2016; Glazebrook, 2005; Audenaert, Meyer and Höfte, 2002). La evidencia actual sugiere que el ABA afecta negativamente la resistencia a las enfermedades ya que interfiere en distintos niveles de la señalización por estrés biótico. La intervención del ABA en la producción de callosa es uno de los pocos ejemplos en los que al ABA interviene positivamente en la resistencia. Existen cada vez más evidencias de que la red de señalización controlada por el ABA y la red de señalización controlada por SA, JA y ET están interconectadas en varios niveles.

3.5 Crosstalk hormonal durante los procesos de defensa de la planta

La cantidad, composición y momento en que se comunican las rutas de señalización hormonales contribuye a la activación efectiva de las defensas (Lorenzo and Solano, 2005; De Vos *et al.*, 2005; Pieterse *et al.*, 2012; Vos *et al.*, 2013; Caarls *et al.*, 2015). El *crosstalk* entre el SA y JA se ha descrito en varias ocasiones (Bostock, 2005; Stout *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2012). La utilización de tratamientos farmacológicos en *Arabidopsis* ha revelado que la expresión de los genes de respuesta a JA, como *PDF1.2* y *VSP* son susceptibles de ser suprimidos por SA.

Los efectos antagonísticos del SA en la señalización del JA se han observado en un amplio número de accesiones de *Arabidopsis* (Koornneef *et al.*, 2008) y puede afectar a la resistencia. Por ejemplo, la inducción de la ruta del SA como consecuencia de la aplicación exógena de SA o la infección del patógeno hemibiotrofo *P. silyringae* ocasionó que las plantas fueran más susceptibles al ataque del hongo necrótrofo *A. brassicola* (Spoel *et al.*, 2007; Leon-Reyes *et al.*, 2009).

De la misma forma, entre las ramas ERF- y MYC de la ruta de señalización del JA existe una relación mutuamente antagonista (Lorenzo *et al.*, 2003; Verhage *et al.*, 2011). Este antagonismo, puede afectar la respuesta de la planta ante el ataque de hongos necrótrofos. Por ejemplo, las plantas mutadas de MYC2 (*jin1*) y los mutantes de la biosíntesis de ABA (*aba2-1*), presentan la rama ERF de la ruta de señalización del JA estimulada, lo que resulta en una mayor resistencia al ataque de hongos necrótrofos, como *B. cinerea*, *P.a cucumerina*, y *F. oxysporum* (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004; Sánchez-Vallet *et al.*, 2012).

Otro regulador importante del *crosstalk* hormonal durante la respuesta a patógenos en el complejo Mediator 25 (MED25). El complejo Mediator es un coactivador transcripcional esencial que está altamente conservado en eucariotas.

MED25 tiene un papel importante en la señalización del JA (Zhai and Li, 2019). La degradación dependiente de COI1 de los represores JAZ lleva a la reactivación de los TFs del tipo MYC (Chini *et al.*, 2007). En consecuencia, los TFs del tipo MYB forman un complejo de activación transcripcional con MED25 y activan la expresión de los genes de respuesta a JA (Zhai *et al.*, 2017). MED25 también interactúa con TFs intermediarios del

tipo AP2/ERF como son *OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59 (ORA59)* y *ERF1* (Ou *et al.*, 2011; Çevik *et al.*, 2012). Los estudios de activación transcripcional de los genes de respuesta a patógenos como *PLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2)*, la cual es dependiente de ORA59 y ERF1 requiere de MED25. Estos estudios implican una función importante de MED25 en la regulación de la transcripción mediada por JA (Zhai and Li, 2019).

La comunicación extensiva entre las rutas de señalización de defensa le permite a la planta afinar la respuesta de defensa al patógeno (Reymond and Farmer, 1998). Como la activación de las defensas de la planta es un proceso con alto coste energético, existe un intercambio entre la defensa y el crecimiento (Heil and Baldwin, 2002; Van Hulten *et al.*, 2006; Walters and Heil, 2007). El crosstalk hormonal puede haber evolucionado como un mecanismo de la planta para reducir la energía utilizada en la represión de defensas innecesarias que son inefectivas frente a los patógenos encontrados (Pieterse and Dicke, 2007; Thaler *et al.*, 2012).

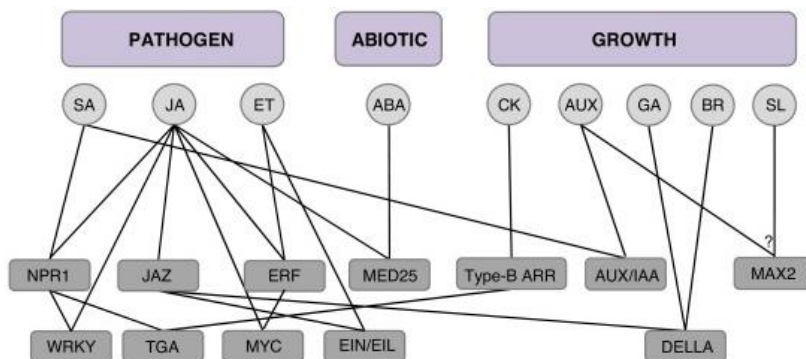


Figure 13. Interacciones hormonales en respuesta al estrés biótico, abiótico y durante el crecimiento. Las interacciones entre las distintas rutas de señalización (líneas) durante los procesos de inmunidad que pueden funcionar como centros de interacción de las distintas proteínas se presentan en los cuadros grises, los cuadros púrpuras representan clasificación clásica de las hormonas. Los círculos grises representan las distintas hormonas vegetales. SA—ácido salicílico; JA—jasmonato; ET—etileno; ABA—ácido abscísico; AUX—auxina; CK—citokinina; GA—giberelina; BR—brasinoesteroides; SL—estrigolactonas. Un '?' indica una interacción no esclarecida.

3. El metabolismo secundario en el contexto del estrés biótico

Las plantas poseen una extensa cantidad de metabolitos secundarios que poseen diversas funciones protectoras, de defensa o de señalización. Asimismo, varias actividades enzimáticas están implicadas en la biosíntesis, modificación y compartimentalización de estos compuestos (Pichersky and Gang, 2000).

Los metabolitos secundarios son muy diversos en su estructura química. Estructural y biosintéticamente se clasifican en tres grupos principales que incluyen terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenoides contienen una o más unidades C₅, las cuales son sintetizadas por medio de la ruta del ácido mevalónico o por medio de la vía del metileritrol fosfato (vía MEP/DOXP). Los compuestos fenólicos son muy diversos e incluyen a los fenilpropanoides, cumarinas, estilbenos, y flavonoides. Los fenilpropanoides contienen al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilos, estos son sintetizados únicamente por la ruta del shikimato o en combinación con la ruta del melonato.

Los compuestos nitrogenados, a su vez, son muy diversos e incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos y aminas. Su biosíntesis usualmente contiene varias rutas, las cuales frecuentemente empiezan con aminoácidos. (Chen *et al.*, 2007; Fang, 2011).

Numerosos metabolitos secundarios como son los ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, sesquiterpenos y glucosinolatos poseen actividad antimicrobiana *in vitro* (Osbourn, 1999; Van Etten *et al.*, 1989). Sin embargo, la actividad antimicrobiana *in planta* es difícil de identificar, ya que los patógenos pueden diferir en su sensibilidad a compuestos específicos (Thomma *et al.*, 1999; Tierens *et al.*, 2001), posiblemente debido a su extensa variación genotípica (Osbourn, 1999; Quidde *et al.*, 1998).

4.1 Glucosinolatos

4.1.1 Descripción general

Los glucosinolatos (GLSs) son un grupo de metabolitos secundarios encontrados en 16 familias botánicas de plantas dicotiledóneas angiospermas, en su mayoría del orden Brassicales y a su vez son particularmente abundantes en la familia Brassicaceae (Raiola *et al.*, 2017). Los GLSs, que antes eran llamados tioglucósidos, son S-glicósidos en los que la glicona es b-D-tioglucosa y la aglicona es una oxima sulfatada (Figura 14). Al ser hidrolizados por las tioglucosidasas endógenas llamadas mirosinasas, producen diferentes compuestos como son los isotiocianatos, tiocianatos y los nitrilos. Estos productos de la hidrólisis de GLSs poseen diferentes actividades biológicas y pueden funcionar como compuestos de defensa y como atrayentes. Para los humanos los GLSs funcionan como agentes anticancerígenos, biopesticidas y saborizantes (Halkier, 2006).

Desde que el genoma de *Arabidopsis* fue completado, la investigación respecto a los glucosinolatos ha progresado considerablemente, elucidándose casi por completo, su ruta central de biosíntesis y su regulación (revisado en Halkier, 2006).

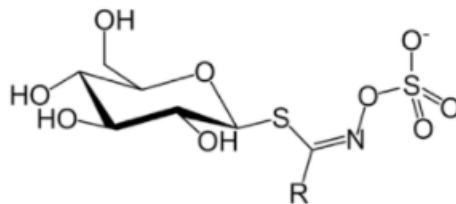


Figura 14. Esqueleto de los glucosinolatos. Cada glucosinolato posee un radical R diferente.

4.1.2 Biosíntesis y clasificación

Los GLSs provienen del metabolismo de los aminoácidos a través de una serie de reacciones en las que el grupo carboxilo se pierde y el carbono α se transforma en el carbono central del GLS (Mikkelsen *et al.*, 2002). Teniendo esto en cuenta los GLSs se dividen en tres grupos principales dependiendo del aminoácido del que derivan, siendo alifáticos los que se producen a partir de metionina, alanina, leucina, isoleucina o valina; indólicos, los producidos a partir de triptófano, y aromáticos los producidos a partir de fenilalanina o tirosina (Barba *et al.*, 2016; Aires and Carvalho, 2017; Malka and Cheng, 2017; Seo and Kim, 2017) (Figura 15).

La ruta biosintética de los GLSs se divide en tres fases, desde la elongación de la cadena lateral de los aminoácidos, pasando por la síntesis del glucosinolato a partir del aminoácido modificado, hasta las modificaciones de la cadena lateral del GLS. Este último paso depende del producto final y puede incluir alquilación, eliminación, esterificación u oxidación de los grupos alifáticos o indólicos (Seo and Kim 2017).

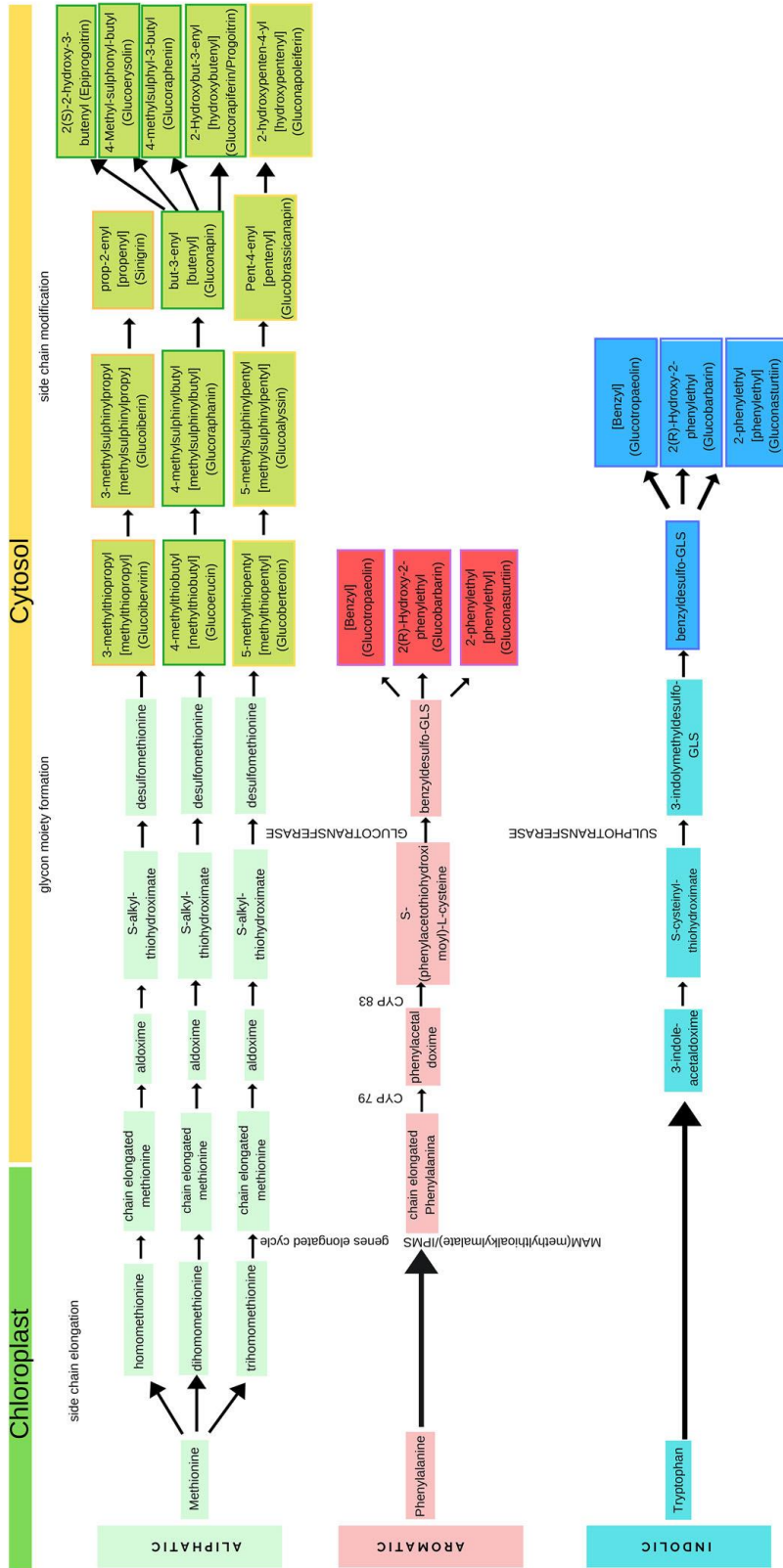


Figura 15. Biosíntesis y clasificación de los GLTs. Tomado de Sikorska-Zimny and Beneduce, 2020.

4.1.3 Efectos de los GLSs

El metabolismo de los GLSs en el contexto de diferentes estreses bióticos y abióticos involucra distintas fluctuaciones cuantitativas de estos compuestos de manera individual o global en un tejido determinado (Figura 16). El ajuste de los compuestos de defensa derivados de los GLSs depende de una retroalimentación regulatoria ligada al metabolismo primario, la señalización hormonal, el crecimiento y el comienzo de la floración. Los GLSs se han estudiado mayormente teniendo en cuenta su papel como defensas químicas ante el ataque de patógenos e insectos, y en la mayoría de los casos, esta actividad biológica depende de los productos de degradación derivados de los mismos a raíz de la actividad mirosinasa cuando la planta es atacada por patógenos como por insectos (Bednarek *et al.*, 2009; Wittstock and Burow, 2010; Wittstock, *et al.*, 2003).

Varios estudios se han centrado en la descripción de los niveles constitutivos de GLSs y del modo en que la estructura de estos influye en las interacciones planta-patógeno. En relación con la respuesta al ataque de un patógeno con frecuencia se ha descrito un aumento de la cantidad de GLSs indólicos como un aumento en la cantidad de GLSs totales, pero no ha podido observarse un patrón claro en el aumento de los GLSs del tipo alifático. Estos cambios en el perfil de GLSs son dependientes del tipo de patógeno y también del tipo de huésped y su genotipo (revisado en Halkier, 2006).

Se han observado aumentos en la producción de GLSs indólicos en respuesta al ataque de *A. brassicae*, frente a elicitores del patógeno bacteriano *Erwinia carotovora* y durante interacciones con hongos micorrícicos (revisado en Agerbirk *et al.*, 2009). Por otra parte en Kliebenstein *et al.*, (2005) observaron un descenso en los niveles de indolglucosinolatos durante la infección con *B. cinerea*, que fueron atribuidos a la competición metabólica con la biosíntesis de camalexina.

De una forma similar, y probablemente estudiado en mayor detalle, se ha observado que el ataque de insectos puede inducir todas las clases de GLSs. Estas observaciones se derivan en su mayoría de estudios realizados con larvas de áfidos y/o lepidópteros y al igual que en los trabajos con patógenos, se ha visto una mayor variación en los niveles de GLSs indólicos (Textor and Gershenson, 2008). Se ha descrito que el ataque de áfidos

conlleva un aumento de GLSs del tipo indólico, ya sea de manera general o individual, y que el ataque de insectos masticadores induce cambios en todas las clases de GLSs. Estas observaciones, puestas en conjunto, demuestran el nivel de complejidad de estas interacciones y como esta puede ser influenciada por el tipo de estímulo exterior presentado (revisado en Agerbirk *et al.*, 2009).

Numerosos experimentos han demostrado que los productos de degradación de los GLSs tienen efectos repelentes y/o tóxicos en herbívoros generalistas (revisado en Agerbirk *et al.*, 2009), por ejemplo, Irwin *et al.*, (2003) y Harvey *et al.*, (2007) correlacionaban el contenido de GLSs indólicos con una resistencia cualitativa a insectos en *Raphanus sativus* (rábano) y *B. oleracea* (col silvestre). A pesar de esto las complejas diferencias genéticas entre las plantas utilizadas en estos estudios hacen difícil determinar una relación causal directa entre el contenido individual de GLSs y el desempeño de los insectos. En un experimento de alimentación artificial, los productos de degradación de glucobrassicina: indol-3-acetonitrilo, indol-3-carbinol y di-indolilmetano, mostraron un efecto antialimentario dependiente de la concentración en ninfas de *Shistocerca gregaria*, aunque la glucobrassicina intacta (40 mmol/g) actuó como un fagoestimulante para estos insectos (El Sayed *et al.*, 1996).

Los áfidos, al alimentarse únicamente del tubo criboso del floema, pueden evitar que los GLSs entren en contacto con las enzimas mirosinasas producidas en las células adyacentes (Barth and Jander, 2006). Como los productos de degradación de los GLSs tienden a ser más tóxicos que los GLSs intactos podría sugerirse que los GLSs indólicos son particularmente importantes en la defensa contra insectos que se alimenten del floema. De hecho, se ha descrito que los conjugados de cisteína y glutatión del indol-3-carbinol reducen la fecundidad en áfidos en ensayos con dietas artificiales (Kim *et al.*, 2008).

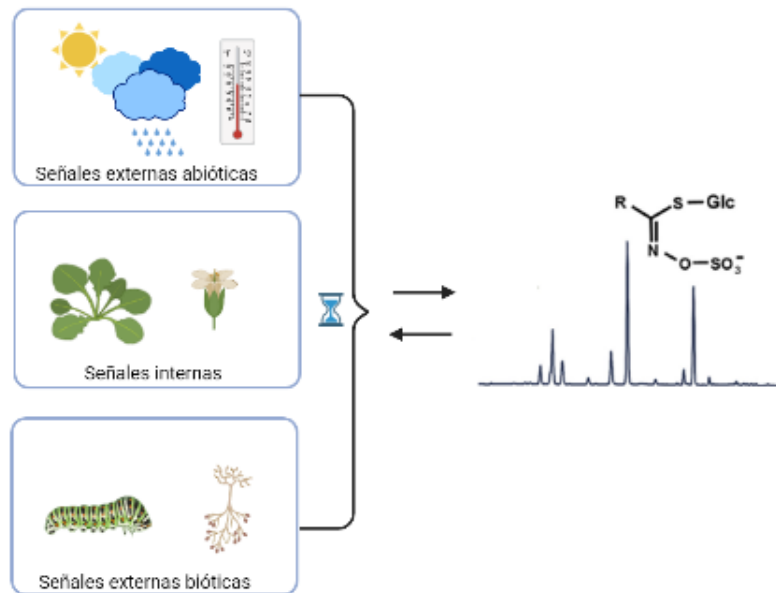


Figura 16. Señales que influyen los GLSs. Las interacciones de las señales internas y externas condicionan las respuestas de los glucosinolatos. El ajuste de los compuestos de defensa derivados de los glucosinolatos depende de una retroalimentación regulatoria ligada al metabolismo primario, la señalización hormonal, el crecimiento y el comienzo de la floración.

Cabe destacar que el control transcripcional constitutivo e inducido de la biosíntesis de los GLSs se encuentra estrechamente relacionado con la señalización del JA; esto se basa en que tanto la expresión de los genes relacionados con los GLSs como su contenido total aumentan con la aplicación de JA exógeno (Guo *et al.*, 2013). Además, plantas mutadas en tres factores de transcripción del tipo bHLH (MYC2, MYC3, MYC4), los cuales tienen funciones aditivas en las defensas mediadas por JA, están desprovistas de glucosinolatos alifáticos como indólicos (Frerigmann *et al.*, 2014; Schweizer *et al.*, 2013). Por este motivo, la señalización del JA es considerada como una ruta crítica respecto a la regulación del contenido de GLSs durante el ataque de herbívoros y probablemente patógenos.

4.1.4 Sistema Glucosinolato-Mirosinasa

Los GLSs cuando se encuentran intactos no son dañinos, pero son convertidos a derivados tóxicos gracias a la activación enzimática de las mirosinasas. Estas enzimas se encuentran en las células de mirosina/idioblastos separadas espacialmente de los GLSs que se encuentran en las llamadas células S (Andréasson and Jørgensen, 2003), pero cuando el tejido vegetal es dañado, las mirosinasas se adhieren al motivo glucosa de los GLSs y forman un aglucón inestable que se reorganiza espontáneamente, proceso que en inglés se conoce como “*mustard oil bomb*” (Matile, 1980; Hunzikeret *et al.*, 2019).

La actividad de las mirosinasas difiere entre especies y es dependiente del pH, aumentando considerablemente a pH ácidos (con actividad máxima en pH 3.0). Los productos de la hidrólisis de los GLSs son los epionitrilos, isotiocianatos (ITCs), nitrilos y tiocianatos (Figura 17) (Roman *et al.*, 2018). El tipo de producto final depende del GLS inicial como también de la inestabilidad del aglucón formado. Esto, a su vez, es dependiente del pH, de la presencia de iones férricos, la proteína epitoespecificadora (ESP), la proteína específica de nitrilos (NSP) y la proteína formadora de tiocianatos (TFP) (Agerbirk and Olsen, 2012; Barba *et al.*, 2016; Sturm and Wagner, 2017; Glindemann *et al.*, 2019).

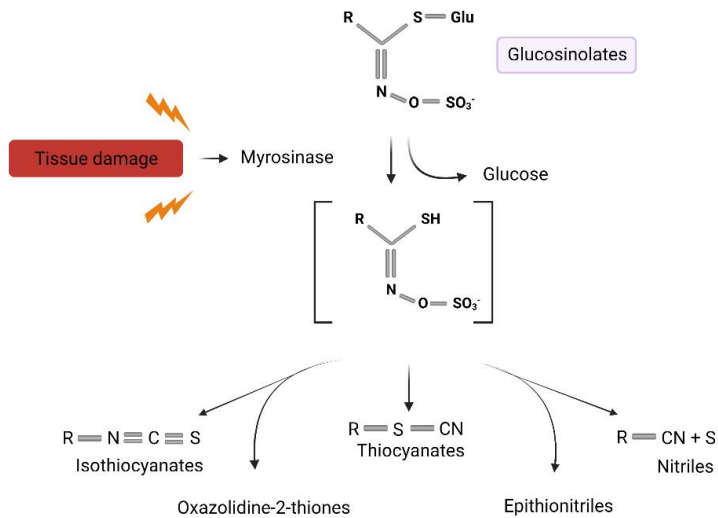


Figura 17. Sistema Glucosinolato-Mirosinasa. Cuando el tejido vegetal es dañado, las mirosinasas se adhieren al motivo glucosa de los glucosinolatos y forman un aglucón inestable que se reorganiza espontáneamente, los productos finales de la hidrólisis de estos glucosinolatos son los epionitrilos, isotiocyanatos (ITCs), nitrilos y tiocyanatos.

4.1.5 Relación de las mirosinasas con los factores de transcripción bHLH del tipo MYC.

Dos de las familias más grandes de factores de transcripción (TF) en *Arabidopsis* son las de los MYB y los bHLH (basic-Helix-loop-Helix). Se ha demostrado que miembros de ambas familias son responsables de los efectos más considerables en la regulación de los GLSs (Frerigmann *et al.*, 2021).

Los TFs MYB28, MYB29, y MYB76 actúan en conjunto en una compleja interacción para controlar los GLSs alifáticos (Hirai *et al.*, 2007; Gigolashvili *et al.*, 2008; Sønderby *et al.*, 2010), mientras que MYB34, MYB51, y MYB122 controlan los genes de GLSs indólicos (Gigolashvili *et al.*, 2007). El análisis de mutantes y líneas que sobrepresan han demostrado que los niveles de GLSs están directa y específicamente correlacionados con

la actividad de estos TF (Celenza *et al.*, 2005; Gigolashvili *et al.*, 2008; Sønderby *et al.*, 2007).

Por otro lado, los TF del tipo bHLH MYC2/MYC3/MYC4 actúan aditivamente en las respuestas a JA, incluyendo la inhibición del crecimiento radicular y defensa frente a insectos (Fernández-Calvo *et al.*, 2011) y se ha demostrado que el tratamiento con MeJA induce la expresión de genes de biosíntesis de GS y su acumulación (Kliebenstein *et al.*, 2002, Mikkelsen *et al.*, 2003; Reymond *et al.*, 2004).

En Schweizer *et al.*, (2013) se analizó el transcriptoma del triple mutante *myc234* y encontraron que los 50 genes más desregulados eran los relacionados con la biosíntesis de GLSs. El análisis de genes importantes en la biosíntesis de GLSs alifáticos y GLSs indólicos mostró que estos genes se encontraban fuerte o completamente suprimidos en *myc234*, mientras que este patrón de expresión no se encontró en *coi1*. De la misma forma, no se detectaron GSL en el triple mutante *myc234*, pero sí se encontraron cantidades considerables en *coi1*. Además, el triple mutante *myc234* es extremadamente susceptible al herbívoro generalista *Spodoptera littoralis*, y la ausencia de GLSs en *myc234* modificó drásticamente el comportamiento de alimentación de *S. littoralis*. No obstante, un aumento de MYC/bHLHs por sí solo no provoca un aumento en la biosíntesis de GLSs si no hay una abundancia paralela de TF del tipo MYB (Smolen *et al.*, 2002).

4.2 Nitrilasas

4.2.1 Generalidades

Los nitrilos son compuestos orgánicos que contienen un grupo funcional (-CN). Los nitrilos encontrados de forma natural comprenden a los cianoglucósidos, cianolípidos y al fenilacetónitrilo (Marron *et al.*, 2012) que son producidos como metabolitos de defensa de las plantas.

En la industria química los nitrilos son utilizados extensivamente como materia prima, solventes, polímeros, farmacéuticos, pesticidas, entre otros. Los nitrilos también son importantes intermediarios de la síntesis orgánica de amidas, aminas, ácidos carboxílicos, ésteres y cetonas (Gong *et al.* 2012; Kobayashi and Shimizu, 2000).

La biocatálisis mediada por nitrilasas, que transforman directamente los nitrilos a sus ácidos carboxílicos correspondientes y a amonio, ha ganado un interés sustancial para el desarrollo de tecnologías verdes sostenibles para la producción de ingredientes activos selectivos y complejos para las industrias farmacéuticas y agroquímicas (Gong *et al.* 2012).

El principio de la investigación sobre las nitrilasas puede datarse de 1952 y está estrechamente relacionado con la hormona de crecimiento vegetal IAA, gracias a la purificación de una “nueva auxina” que resultó ser el indol-3-acetonitrilo (IAN). Además, otros nitrilos como son el 1-naftaleno acetonitrilo y el fenilacetonitrilo también poseen actividad del tipo auxina, lo cual ha sido explicado por una posible conversión de estos compuestos a sus respectivos ácidos carboxílicos activos en la célula (Steiner, 1948; Zimmerman and Wilcoxon, 1935).

La primera nitrilasa vegetal fue clonada por Bartling *et al.*, (1992) en un intento por identificar proteínas de membrana plasmática de plantas. Entre un número de clones, se observó que uno mostraba homología de secuencia con una nitrilasa de *Klebsiella ozaenae*, y la proteína codificada (nitrilase 1, NIT1) mostró una actividad IAN-hidrolasa/nitrilasa (Bartling *et al.*, 1992). Más adelante fue identificada una segunda nitrilasa (NIT2) (Bartling *et al.*, 1994). Y de forma independiente, se identificó a NIT2 y dos nitrilasas adicionales en *A. thaliana* (NIT3 y NIT4) (Bartel and Fink, 1994).

Por otro lado, se conoce que los hongos filamentosos son una fuente abundante de enzimas nitrilasas, sin embargo, estos estudios no han sido explotados extensivamente (Martínková *et al.*, 2009). Los primeros estudios de nitrilasas en hongos fueron publicados en 1960. Uno de estos trabajos iniciales reportó la habilidad que poseen algunos hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gibberella* y *Fusarium* de convertir indol-3-acetonitrilo (IAN) a ácido indol-3-acético (IAA) (Thimann and Mahadevan, 1964). Por lo tanto, existe una gran necesidad de explorar la producción de nitrilasas por hongos filamentosos en detalle.

4.2.2 Química de las nitrilasas y nitrilo hidratatasas

Las nitrilasas (nitrilo aminohidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de nitrilos (cianidas orgánicas) a sus ácidos carboxílicos correspondientes y amoniaco. Forman un grupo de enzimas homólogas que están ampliamente distribuidas en bacterias, hongos y plantas (Martínková *et al.*, 2009).

Las nitrilasas son enzimas con alta sensibilidad debido a la presencia de un residuo de cisteína sensible a oxígeno en su sitio activo (Sheldon, 2012). En el caso de las nitrilo hidratatasas, a la hidratación del grupo nitrilo a menudo le precede una enantioselectividad pobre, pero la coexpresión de una amidasa resulta en un eficiente método para la producción de ácidos carboxílicos quirales y tienen como producto final amidas y amonio (Wells, 2012).

Las nitrilasas están estrechamente relacionadas a las cianuro hidratatasas de las bacterias y de los hongos, las cuales convierten cianuro a formamida o ácido fórmico y amonio y de las de las cuales se hablará más adelante (revisado en O'Reilly and Turner, 2003).

4.2.3 Funciones fisiológicas en plantas

Las funciones probables de las nitrilasas en plantas consisten en la detoxificación de cianuro, suministro de nitrógeno para el crecimiento, y en condiciones específicas, la producción de IAA (revisado en Piotrowski, 2008).

Como se mencionó en la sección anterior, la investigación sobre las nitrilasas comenzó con la observación de que el IAN actuaba como hormona de crecimiento en algunos casos (Jones *et al.*, 1952). En la actualidad solo se conocen dos grupos de nitrilasas que convierten IAN a IAA a una velocidad significativa, los homólogos NIT1 de las Brassicaceae y los homólogos NIT4 del maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) (Ishikawa *et al.*, 2007, Jenrich *et al.*, 2007, Kriechbaumer *et al.*, 2007, Osswald *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2003).

La biosíntesis de auxinas en *Arabidopsis* procede parcialmente del intermediario indol-3-acetaldoxima (IAOx), el cual es también un intermediario para la síntesis de GLSs indólicos y camalexina. Se ha sugerido que el IAN es un intermediario en la conversión de IAOx a

IAA (revisado en Ljung *et al.*, 2002). No obstante, el mutante *sur2*, el cual tiene un flujo reducido de IAOx a GLSs y niveles elevados de IAA, posee niveles bajos de IAN (Barlier *et al.*, 2000). Curiosamente, el IAOx puede convertirse a IAN por medio de la citocromo p450 monooxigenasa, la cual está implicada en la biosíntesis de camalexina y el papel del IAN como intermediario en esta ruta ha sido establecido con anterioridad (Nafisi *et al.*, 2007).

La fuente más probable de IAN libre en *Arabidopsis* es el GLS indólico glucobrasicina. La glucobrasicina puede ser metabolizada a IAN y existe una correlación positiva entre los niveles de glucobrasicina e IAN (Müller and Weiler, 2000; Reintanz *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002). De este modo, en situaciones en las cuales los niveles de IAN a partir de glucobrasicina aumentan, las nitrilasas podrían tener un papel en la biosíntesis de IAA. Se ha observado en plantas de *Arabidopsis* con deficiencia de azufre, en las cuales el gen *NIT3* se indujo fuertemente, mientras que al mismo tiempo disminuían los niveles de GLSs. Como la glucobrasicina se degrada con más rapidez en las raíces, se desarrolló un modelo en el cual el IAN de la glucobrasicina y su posterior conversión a IAA por *NIT3* estimula el crecimiento de la raíz y la formación de raíces laterales (Kutz *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis*, *NIT1* es la isoforma que se expresa con predominancia (Bartel and Fink, 1994) y podría ser responsable de la degradación general de los GLSs. En contraste la expresión de *NIT2* se induce fuertemente con el ataque de patógenos y heridas mecánicas (Almeras *et al.*, 2003, Bartel and Fink, 1994, Weber *et al.*, 2004).

En la Figura 18 se puede observar la evolución de la función nitrilasa en plantas.

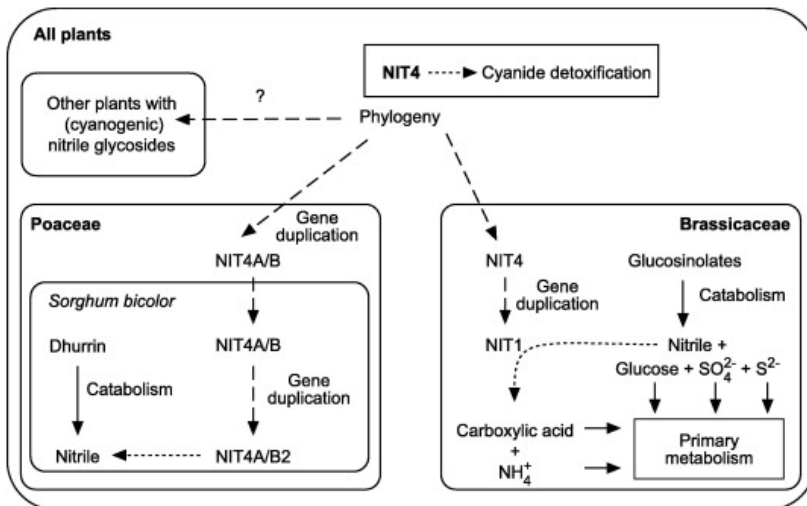


Figura 18. Evolución de la función nitrilasa en plantas (tomado de Piotrowski, 2008).

4.2.4 Funciones fisiológicas en hongos

Las funciones naturales de las nitrilasas en microorganismos son menos comprendidas que las de las plantas, pero podría hipotetizarse que sus principales papeles/funcionales son la detoxificación de nitrilos y el reciclaje de nitrógeno, lo cual puede facilitar la participación de estos organismos en patogenicidad (revisado en Prasad and Bhalla, 2010).

El interés en las nitrilasas se ha debido a su habilidad para hidrolizar nitrilos en condiciones ambientales, a valores medios de pH, además de ser capaces de discriminar entre enantio- y regiosómeros, y por hidrolizar selectivamente grupos ciano- aun en la presencia de otros grupos funcionales. Estas funciones han sido examinadas en su mayoría en nitrilasas bacterianas y en algunos casos de plantas, mientras que la investigación de las nitrilasas en hongos ha sido menos (revisado en Osswald *et al.*, 2002, Martínková *et al.*, 2017).

La primera nitrilasa fúngica fue purificada de *Fusarium solani* por Harper (1977) pero su secuencia aminoacídica no fue determinada. Más adelante, utilizando 2-cyanopyridina y valeronitrilo como inductores pudieron aislarse dos nitrilasas de esta especie y

determinar parcialmente sus secuencias (revisado en Martíňková *et al.*, 2009). Además, una nitrilasa con una amplia especificidad de sustrato pudo ser inducida en *Fusarium proliferatum* utilizando ϵ -caprolactama (Yusuf *et al.*, 2013). No obstante, el aislamiento de nitrilasas en hongos tiene sus límites, ya que la producción enzimática puede ser baja y es difícil encontrar el inductor adecuado. Por lo tanto, cada vez más se está utilizando la expresión heteróloga para obtener nuevas nitrilasas fúngicas y proceder a su caracterización.

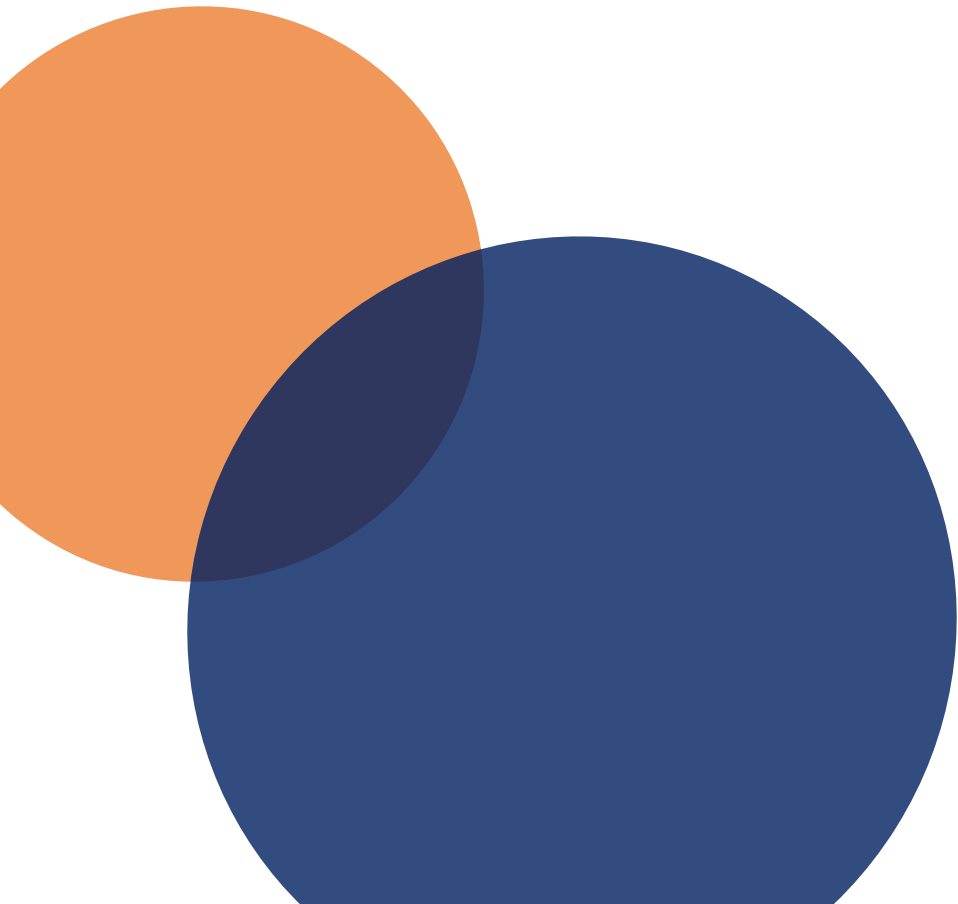
4.3 Cianuro hidratatasas

Las nitrilasas y las cianuro hidratatasas son un grupo de proteínas que están estrechamente relacionadas. Estas proteínas presentan similitudes significativas a nivel estructural, aunque, presentan diferencias en su capacidad catalítica (revisado en O'Reilly and Turner, 2003).

El cianuro es un compuesto abundante en la naturaleza y se encuentra tanto en forma inorgánica (HCN), como cianuro orgánico o nitrilos. En este sentido, es relevante mencionar que la degradación de los GLSs conduce a la producción de nitrilos (Wittstock and Halkier, 2002). Las enzimas capaces de hidrolizar cianuro y nitrilos se han estudiado en una amplia variedad de especies microbianas y cada vez más en plantas. La conversión enzimática de HCN/nitrilo al correspondiente ácido carboxílico puede tener lugar en un solo paso por medio de las nitrilasas o las cianuro dihidratatasas (CDH) o en dos pasos con un intermediario amida por medio de las nitrilo hidratatasas o cianuro hidratatasas.

Las cianuro hidratatasas, aunque funcionalmente diferentes de las nitrilasas y cianuro dihidratatasas, están estrechamente relacionadas con ellas (Wang and VanEtten 1992; Cluness *et al.*, 1993). Estas enzimas han sido clasificadas dentro de una misma familia enzimática, conocida como la familia nitrilasa/cianuro hidratasa, que también incluye a las menos relacionadas amidasas alifáticas (O'Reilly and Turner, 2003), todas estas pertenecen a su vez a un grupo mayor de proteínas relacionadas llamada superfamilia nitrilasa (Pace and Brenner 2001).

Antecedentes y objetivos



El NO regula una gran cantidad de procesos fisiológicos en plantas ya que su versatilidad como radical libre proporciona la capacidad de interactuar y modular la acción de otros reguladores del crecimiento (Manrique-Gil *et al.*, 2021; Sanz *et al.* 2015). El NO también es importante en las interacciones planta-patógeno, se ha descrito que el H₂O₂ y el NO juegan un papel crucial en la activación de la respuesta hipersensible (HR) (Delledonne *et al.*, 1998).

En nuestro grupo de investigación trabajos anteriores han elucidado un papel del NO durante la germinación y desarrollo temprano (Albertos *et al.*, 2015; Albertos *et al.*, 2021). Además, también se ha detectado la presencia de NO en el nicho de células madre y se ha observado como las alteraciones en la homeostasis del NO afectan el desarrollo de la raíz primaria y proliferación de células meristemáticas (Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Sanz *et al.*, 2014; de Luis-Balaguer *et al.*, 2017)). A su vez, se ha detectado alteraciones en la biosíntesis, el transporte y señalización de auxinas en los mutantes de la homeostasis de NO durante el desarrollo vegetal (Lechón *et al.*, 2020; Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Sanz *et al.*, 2014).

El NO también posee un amplio papel señalizador en hongos, participando en procesos que van desde la infección y colonización hasta la modulación del metabolismo secundario y desarrollo tanto sexual como asexual (revisado en Zhao *et al.*, 2020; Wang and Higgings, 2005). Como ya se mencionaba anteriormente en la introducción de esta Tesis Doctoral, en Turrión-Gómez *et al.*, (2010) y Turrión-Gómez and Benito (2011) se caracterizó el sistema de detoxificación de NO en *B. cinerea* basado en la flavogemoglobina BCFHG1. BCFHG1 constituye el principal y probablemente único mecanismo detoxificador de NO en *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). *Bcfhg1* se induce tras la aplicación de NO exógeno y muestra un patrón de expresión *in planta* que podría conferir ventajas adaptativas a un patógeno necrótrofo durante el proceso de infección (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

Por otro lado, en Anta-Fernández *et al.*, (2022) se realizó un análisis de expresión global en la cepa silvestre B05.10 y la cepas mutantes $\Delta Bcfhg1$. que indicaba una situación de fuerte estrés nitrosativo tras la aplicación de NO exógeno, con mucha mayor intensidad en las cepas mutantes. Se pudo observar la activación de varios sistemas de defensa, incluyendo un aumento de expresión en los genes codificadores de la flavohemoglobina BCFHG1, una nitronato monooxygenasa (NMO) y la nitrilasa/cianuro hidratasa estudiada

en esta Tesis Doctoral. Además, se observó la inducción de genes relacionados con la asimilación de nitrato siendo BCFHG1 el sistema enzimático responsable de su inducción. Los análisis de expresión comparativa, a su vez, mostraron la influencia del NO en otros procesos celulares, como la respiración mitocondrial y el metabolismo primario y secundario (Anta-Fernández *et al.*, 2022).

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores, cabe destacar que la sensibilidad de *B. cinerea* al NO exógeno parece depender estado de desarrollo, por lo que podría sugerirse que durante el establecimiento de una interacción entre *B. cinerea* y su huésped existe un flujo de NO al que pueden responder tanto la planta como el patógeno (Turrión-Gómez and Benito, 2011), siendo a su vez una estrategia de defensa de la planta y un medio del hongo para facilitar la infección.

Partiendo de la información generada previamente, pretendemos analizar el efecto del NO en el proceso de infección y el metabolismo secundario de la planta durante la interacción con el hongo. A su vez, profundizar en la función del gen codificador de la enzima nitrilasa inducido por la aplicación de NO exógeno.

Para ello, nos proponemos abordar los siguientes objetivos:

1. Evaluación de la respuesta de mutantes alterados en la homeostasis del NO de *Arabidopsis thaliana* durante el proceso de infección de *Botrytis cinerea*.
2. Estudio de la producción de glucosinolatos y compuestos fenólicos en *Arabidopsis thaliana* durante la infección con cepas *Botrytis cinerea* afectadas en la homeostasis del NO.
3. Caracterización funcional del gen codificador de la nitrilasa/cianuro hidratasa *Bcin12g06180* de *Botrytis cinerea*.
4. Estudio de la influencia del NO en las nitrilasas de *Arabidopsis thaliana*.

Materiales y métodos



1. Organismos

1.1 Plantas

1.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) como fondo genético silvestre correspondiente a las líneas *hot5-2* (Leer *et al.*, 2008), *cue1-5* (Redei *et al.*, 1965; Streatfield *et al.*, 1999), *cue1-6* (Streatfield *et al.*, 1999), *nox1-1* (He *et al.*, 2004), *noa1* (Guo *et al.*, 2003), *noa1nia1nia2* (Lozano-Juste and Leon, 2010), y *35S:FLAG1-GSNOR* (Frungillo, L., Skelly, M., Loake, G. *et al.* 2014). La línea *hot5-4* se encuentra en el fondo genético Wassileskija (WS), la línea *tt4* (*transparent testa 4*) en el fondo genético Landsberg erecta (Ler) (Koornneef, 1990), y la línea *cue1-1* en el fondo genético Bensheim (Be-0) (Li *et al.*, 1995). Las líneas *AHb1* se encuentran en el fondo genético silvestre C24 (Pezarrolli *et al.*, 2004).

Todos los mutantes *cue1* son defectivos en el locus *CUE1* (AT5G33320), mientras que ambos mutantes *hot5* son defectivos en el locus *GSNOR1* (AT5G43940). Las líneas *cue1-5* (CS3156) y *cue1-6* (CS3168) fueron generadas por mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) en una población de Col-0 (Streatfield *et al.*, 1999), mientras que el mutante *nox1-1* fue generado por mutagénesis de neutrones (He *et al.*, 2004). El alelo *cue1-1* fue generado por Li *et al.* (1995) mutagenizando una población de pOCA108-1 con radiaciones gamma. pOCA108-1 es una línea de inserción simple que contiene una construcción reportadora pOCA108 en el cromosoma 2.

Ambos alelos *hot5* son mutantes de inserción de T-DNA obtenidos del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). La inserción de T-DNA de *hot5-2* se localiza en el exón 1 y es idéntica al alelo del gen *gsnor1-3* reportado por Feechan *et al.*, (2005), mientras que la inserción de *hot5-4* se encuentra en el exón 4 (Lee *et al.*, 2008).

El mutante *noa1* (AT3G47450) posee menor producción de NO (Guo *et al.*, 2003; Crawford, 2006; Moreau *et al.*, 2008), mientras que el triple mutante *noa1nia1nia2*, es una línea simultáneamente afectada en *noa1* y las nitrato reductasas NR1/NIA1 y NR2/NIA2, las cuales se han descrito previamente como implicadas en la síntesis de NO

(Lozano-Juste and Leon, 2010). Por otro lado, el mutante de pérdida de función *tt4* carece de flavonoides (Saslowsky *et al.*, 2000).

Se utilizaron además líneas reportadoras de los genes codificadores de nitrilasas *NIT1*, *NIT2*, *NIT3*, *NIT4* de *Arabidopsis thaliana* proporcionadas amablemente por la Dra. Bonnie Bartel de la Universidad de Rice, Estados Unidos. Estas líneas son portadoras de fusiones transcripcionales del gen *uidA*, codificador de la β -glucuronidasa (β -GUS), a las regiones promotoras de los genes correspondientes (Bartel and Fink, 1994). En siguiente tabla (Tabla 1) se muestra un resumen de los patrones de expresión obtenidos por Bartel and Fink (1994) en sus condiciones de cultivo.

Tabla 1. Resumen de los patrones de expresión de las fusiones NIT-GUS.

Gen	3-12 días						5 semanas					
			Hoja		Raíz							
	Cotiledon	Hipocotilo	Punta	Vascular	Punta	Vascular	Hoja	Estipula	Tallo	Sépalos	Anteras	Silicua
<i>NIT1</i>	+	+	+	*	+	*	+	+	+	+	+	+
<i>NIT2</i>	+	*	-	-	*	-	-	+	-	*	-	+
<i>NIT3</i>	+	+	-	*	-	*	-	-	-	-	-	-
<i>NIT4</i>	*	-	+	-	+	-	+	+	+	+	*	+

+ Presencia de GUS en todos los transformantes, * presencia leve/pobre de GUS en algunos transformantes, - sin presencia de GUS. (Adaptado de Bartel and Fink, 1994).

1.1.2 *Vitis vinifera*

El material vegetal de vid (*V. vinifera*) utilizado en este trabajo fue recogido de cepas de vid mantenidas en las instalaciones del invernadero de Parque Científico de la Universidad de Salamanca. Se utilizaron diferentes tipos de variedades de campo cultivadas tradicionalmente y comercialmente en Castilla y León como Rufete, Juan García, Tempranillo, Verdejo, Sauvignon Blanc y Viura.

1.1.3 *Phaseolus vulgaris*

Las plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) variedad Blanca Riñón de la región de Ávila-Piedrahíta, España fueron cultivadas en el invernadero.

1.2 Hongos

1.2.1 *Botrytis cinerea*

La cepa tipo silvestre de *B. cinerea*, B05.10, fue obtenida en el laboratorio del Profesor Paul Tudzynski (Wilhelms Universität Münster, Alemania) (Buttner *et al.*, 1994). Esta cepa haploide proviene de la cepa de campo SAS56 (Faretra *et al.*, 1988) y fue obtenida mediante tratamiento con benomilo.

Las cepas mutantes en el gen de la flavohemoglobina $\Delta Bcfhg1$: $\alpha 7.2$ y $\beta 16.7$ fueron obtenidas por Juan Luis Turrión-Gómez en el laboratorio de Genética del Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE) (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

La cepa que sobreexpresa el gen *Bcfhg1*, OV96, fue obtenida por la Dra. Daniela Santander Gordón y el Dr. Ernesto Pérez Benito en el laboratorio de Genética del Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE).

1.3 Bacterias

1.3.1 *Escherichia coli* DH5 α

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (F-, *supE44*, *lacU169*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) fue utilizada en los experimentos de transformación bacteriana.

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1 Condiciones de siembra

2.1.1 Esterilización y estratificación de semillas

Las semillas de *Arabidopsis* fueron sometidas a un proceso de esterilización de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Realizar 1 lavado de 5 min en agitación con hipoclorito sódico al 25% (v/v) y Tritón X-100 al 0,01% (v/v).
- Realizar 3 lavados sucesivos con agua estéril y en vigorosa agitación con el fin de eliminar todos los posibles restos o trazas de hipoclorito sódico que puedan quedar.
- Adición de 1ml de agua estéril para la conservación de las semillas hasta su utilización.

Tras este procedimiento, las semillas se mantuvieron a 4°C en condiciones de oscuridad para llevar a cabo con la estratificación al menos 48h, eliminando la dormición y para alcanzar una correcta sincronización de la germinación.

2.1.2 Siembra y germinación en medio sólido

La siembra fue realizada con ayuda de una pipeta y puntas estériles en placas Petri con medio Murashige y Skoog suplementado con 2% (w/v) de sacarosa y agar bacteriológico al 0,6% (w/v) para su solidificación.

El medio posteriormente fue esterilizado en autoclave durante 10 minutos a 120°C antes de ser distribuido en las placas dentro de la campana de flujo laminar.

Tras la siembra las placas fueron selladas con esparadrapo quirúrgico "Micropore 3M", para proteger el cultivo de cualquier posible contaminación y a la vez permitir el intercambio de gases con el exterior.

Las placas fueron transferidas a cámaras de crecimiento bajo condiciones de 16/8 horas de fotoperíodo, temperatura de 22°C y humedad relativa de 50-60%.

2.1.3 Crecimiento de plántulas en invernadero

A. thaliana

Para la obtención de plantas adultas de *Arabidopsis* se procedió a transferir las plantas cuando alcanzaron un desarrollo adecuado a alveolos individuales con mezcla de sustrato para horticultura, TREF y vermiculita en proporción 3:1.

El desarrollo de estas se completó en el Invernadero Experimental del Parque Científico/USAL, en condiciones ambientales controladas.

P. vulgaris

Las semillas, previamente esterilizadas mediante tratamiento con hipoclorito sódico 5%, fueron germinadas en vermiculita. Transcurridos 7 días desde la siembra, las plántulas fueron transferidas individualmente a macetas con sustrato vegetal. Éstas fueron mantenidas durante 7 días más en el invernadero antes de su utilización en los experimentos de infección.

2.1.4 Cultivo en medio sólido de *B. cinerea*

Para la obtención de conidios se prepararon placas de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) suplementadas con 25% (w/v) de hojas de tomate trituradas (Benito *et al.*, 1998). Estas placas fueron inoculadas con 5 µl de una suspensión de conidios o con un dado de agar procedente del borde de crecimiento del hongo en placa e incubadas a 22°C durante 3 días aproximadamente. Transcurrido este tiempo fueron expuestas a luz ultravioleta de onda larga (280-420 nm) durante 8 horas para favorecer la conidiación. Las placas se mantuvieron a continuación dos semanas más a 22°C en la oscuridad para obtener una buena producción de conidios.

Para el análisis de crecimiento saprofítico y el mantenimiento de las cepas se utilizaron placas de MEA (Malt Extract Agar, Difco), o de medio B5 sólido compuesto por sales Gamborg's B5 (AppliChem) y 2% de agar o medio mínimo Czapek Dox con modificaciones

compuesto de 2% sacarosa, 0.1% KH_2PO_4 , 0.3% NaNO_3 , 0.05% KCl , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y agar al 2% ajustado a pH 5.

Para la selección de transformantes de *B. cinerea* se utilizó MEA (Malt Extract Agar, Difco) suplementado con 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina (Roche), que se añadió al medio de cultivo una vez que éste había sido autoclavado.

2.1.5 Cultivo en medio líquido de *B. cinerea*

Para el cultivo de micelio para la preparación de protoplastos, las esporas de *B. cinerea* fueron inoculadas en medio de extracto de malta (Bacto Malt Extract, Difco) a una concentración final de 5×10^5 esporas/ml en matraces de 250 ml con 30 ml de medio. Los matraces se mantuvieron en oscuridad a 22°C y mantenidos en agitación a una velocidad de 180 rpm en un agitador orbital Künher 1SF-1-W durante 16 horas para la obtención de protoplastos y 96 horas para la extracción de ADN.

En el caso del cultivo para análisis relativos a la actividad nitrilasa se utilizó el medio Gamborg's B5 suplementado con aminoácidos (Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without uracil, Sigma) y glucosa 10 mM o el medio Czapek-Dox modificado. Los matraces fueron inoculados con una concentración de 5×10^5 esporas/ml y mantenidos en agitación a luz continua a 22°C a 180 rpm en el incubador orbital.

Para el análisis del efecto del NO en la germinación de *B. cinerea* se utilizaron placas Petri, ya que el cultivo en matraces en agitación favorece la agregación de las esporas lo que dificulta la observación posterior y conteo en el microscopio. Para esto se utilizó el medio PDB a la mitad de la concentración recomendada por el fabricante y se inoculó a una concentración de 5×10^5 esporas/ml en un volumen de 60 ml. Esta suspensión se depositó en placas Petri cuadradas de 120mm y se mantuvieron a 22°C en oscuridad en una cámara de germinación FRIOCELL 222 hasta el momento de la toma de imágenes.

2.1.6 Cultivo de *Escherichia coli*

E. coli fue cultivada en medio LB (Luria-Bertani), el cual está compuesto por 0,5% de extracto de levadura (Difco), 1% de bacto triptona (Difco), 1% de NaCl y 2% de agar en el caso del medio sólido. La temperatura de incubación fue 37 °C y en el caso de cultivo en medio líquido se aplicó agitación a 220 rpm. Cuando fue requerida la selección de colonias, se añadieron 100 µg/ml de ampicilina esterilizada por filtración, después de la esterilización del medio LB en el autoclave.

3. Extracción de conidios de *B. cinerea*

La extracción de esporas se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar. A las placas de PDA tomate se les añadieron en superficie aproximadamente 10 ml de agua Milli-Q estéril. Con ayuda de un extendedor de vidrio se frotó suavemente la superficie de la placa para favorecer la liberación de los conidios en la suspensión. A continuación, la suspensión de esporas fue filtrada a través de un embudo con lana de vidrio en su parte más estrecha para eliminar restos de micelio. Las esporas fueron recolectadas en un tubo de 50 ml. La suspensión de conidios recolectada se centrifugó a 800 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió éste procedimiento 2 o 3 veces y finalmente las esporas sedimentadas fueron resuspendidas en 5 ml de agua destilada estéril. Se tomaron entonces alícuotas de diluciones apropiadas (generalmente 1:100 o 1:50) para poder contar conidios en la cámara Thoma. Las esporas fueron conservadas a 4 °C durante 2 semanas para su uso en fresco. Para su uso a largo plazo se conservaron en 15% de glicerol a -80 °C.

4. Ensayos de infección

El análisis del grado de infección de cepas de *B. cinerea* se realizó según Benito *et al.*, (1998). En primer lugar, se preparó una suspensión de esporas de cada cepa a analizar en el medio B5 a una concentración de 1×10^5 sp/ml para *Arabidopsis* y 5×10^5 sp/ml en el caso de *V. vinifera*, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente.

Mientras las esporas reposaban, se preparó el material vegetal a infectar. En el caso de plantas de vid se cortaron las hojas y se insertaron por el peciolo en bloques de espuma de floristería previamente saturados en agua y colocados sobre placas Petri con agua. Esta estructura se colocó en bandejas de plástico en cuya base se colocaron láminas de papel absorbente humedecido y una rejilla que permitiera una separación entre el papel húmedo y las hojas inoculadas. En el caso de hojas de *Arabidopsis*, se inocularon directamente sobre las hojas con gotas de 5 μ l con 500 conidios. Se dejaron secar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se selló la parte superior de las bandejas con una película de plástico para crear un microclima con alta humedad relativa (HR). Las bandejas se incubaron en germinadores a una temperatura de 22 °C, 80% HR, 16/8 horas de fotoperíodo, durante 72 horas en el caso de *Arabidopsis* y 96 horas en el caso de la vid. Alternativamente, para los ensayos de infección en vid y judía se utilizaron discos de agar de 5mm de diámetro procedentes del borde de crecimiento de las cepas correspondientes y se procedió a sellar las cajas y bandejas como se mencionó anteriormente.

Para el análisis del proceso de infección, la agresividad de las distintas cepas analizadas se evaluó cuantificando dos parámetros diferentes. En primer lugar, estimando el porcentaje de lesiones dispersivas producidas, y en segundo lugar, el diámetro medio de las lesiones dispersivas producidas.

5. Ensayos de germinación

5.1 Ensayos de germinación en *A. thaliana*

Para el análisis de la sensibilidad al indol-3-acetonitrilo de las distintas líneas se realizó la siembra en placas de medio MS suplementado con una concentración de 70 μ M de indol-3-acetonitrilo. Las placas se mantuvieron durante 7 días a 22 °C y un fotoperíodo de 16/8 horas. Se asumió como planta germinada aquellas en las que la radícula ha emergido de las cubiertas que rodean a la semilla (testa y endospermo).

5.2 Ensayos de germinación en *B. cinerea*

La germinación de *B. cinerea* fue evaluada en medio PDB½ y en placas Petri de 45 mm. Para ello se prepararon diluciones de las distintas cepas analizadas a una concentración final de 5×10^5 sp/ml. En los tratamientos control se colocó una gota de 100 μ l de la suspensión de esporas en el centro de la placa. En los tratamientos con DETA 250 μ M (donador de NO) se utilizaron gotas preparadas combinando 2.5 μ l de DETA 10 mM con 97.5 μ l de la dilución.

El conteo del número de esporas germinadas se realizó a las 2, 4, 6 y 8 horas. Se colocó la placa en el microscopio óptico y se enfocó con el lente de 20X. Se tomaron fotografías de 4 o 5 campos diferentes y sobre ellas se procedió a contar las esporas germinadas y no germinadas en cada tiempo. Con los datos recogidos se procedió a calcular el porcentaje de esporas germinadas en cada tratamiento.

Las esporas se subdividieron en tres grupos según el estado de germinación alcanzado distinguiéndose tres fases: en la fase 0 las esporas no muestran signos de emergencia del primordio del tubo germinativo; en la fase 1 el primordio ha emergido pero la longitud del tubo germinativo no supera la longitud del diámetro de la espora en fase 0; y en la fase 2 la longitud del tubo germinativo es mayor que el diámetro de la espora en fase 0. Se considera como esporas germinadas aquellas que se encuentran tanto en fase 1 como en fase 2 (Figura 19).

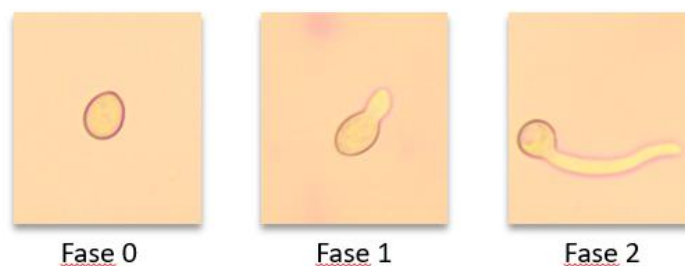


Figura 19. Clasificación de las esporas en germinación según la longitud del tubo germinativo.

6. Ensayos de crecimiento saprofítico

Una suspensión de 5×10^5 sp/ml de cada cepa fue utilizada como stock inicial. El medio de cultivo base fue MEA, Gamborg's B5 o Czapek-Dox suplementado según las necesidades del experimento. En el centro de la placa se depositó una gota de 5 μ l de la suspensión de conidios. Por cada muestra se realizaron 3 réplicas. Las placas se dejaron crecer a 22 °C y se midió el diámetro de la colonia a los 3 y 5 días después de la inoculación. En cada colonia (placa) se midieron dos diámetros perpendiculares. El diámetro considerado finalmente para cada colonia fue la media de los dos diámetros registrados para cada caso.

6.1 Ensayos de sensibilidad a estrés nitrosativo y oxidativo en *B. cinerea*

Para la inducción de estrés nitrosativo se utilizaron los donadores de NO DETA/NO (Dietilenotriamina, Sigma) a una concentración de 125 μ M y SNP (Nitroprusiato de sodio, Sigma) a una concentración de 500 μ M en medio MEA. Para la inducción de estrés oxidativo se añadió Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30% w/w (Sigma) a una concentración de 2,5 mM en MEA. En la medida de lo posible, las placas de medio MEA con SNP fueron preparadas inmediatamente antes de su utilización para reducir el tiempo de almacenamiento.

6.2 Actividad nitrilasa durante el crecimiento saprofítico

Uno de los métodos para la detección de la actividad nitrilasa en hongos filamentosos es la utilización de un nitrilo como única fuente de nitrógeno para el crecimiento en medio mínimo (Figura 20). En este caso se utilizó el medio Czapek-Dox modificado suplementado con el nitrilo 3-cianopiridina en concentraciones de 10 mM, 5 mM, 1 mM y 0.5 mM. Las placas se dejaron crecer a 22 °C y luz continua. Se midió el diámetro de la colonia a los 3 y 5 días después de la inoculación. A su vez, se observó la morfología de la colonia durante toda la duración del experimento. Por cada muestra se realizaron 3 réplicas.

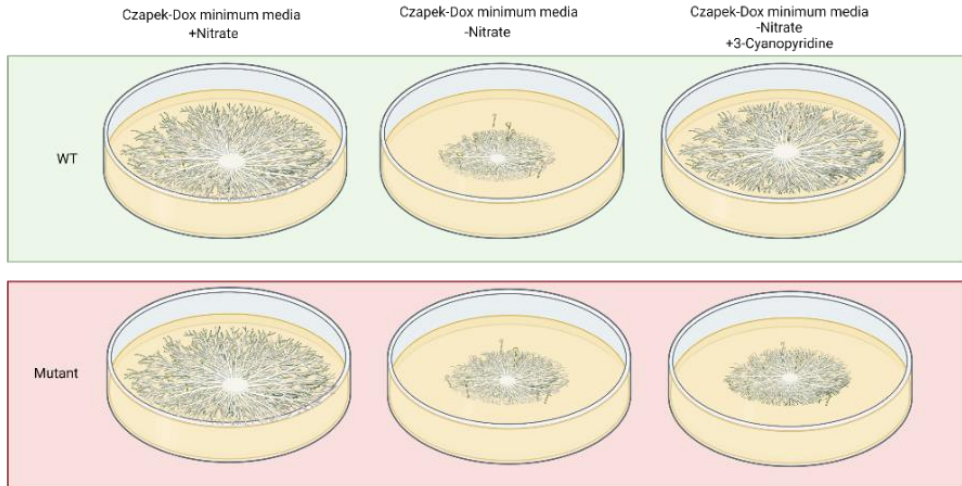


Figura 20. Resultados esperados con la utilización de 3-cianopiridina como única fuente de nitrógeno como medio de detección de actividad nitrilasa.

7. Extracción y cuantificación simultánea de compuestos fenólicos y glucosinolatos

Para el estudio de la identificación y cuantificación simultánea de GLSs y compuestos fenólicos se utilizó el método presentado en Francisco *et al.* (2009) con modificaciones (Figura 21). Este estudio fue realizado en colaboración con el grupo de Grupo de Investigación en Polifenoles, Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, con la implicación especial de la Dra. María Teresa Escribano Bailón y el Dr. Ignacio García Estévez.

7.1 Preparación de muestras:

Las muestras fueron liofilizadas y trituradas hasta obtener un polvo homogéneo, se pesaron 5 mg de este polvo en tubos de vidrio y se le adicionaron 3 ml de MeOH al 70%. Las muestras se mantuvieron a 70 °C durante 30 minutos, mezclando con vórtex cada 5 minutos para facilitar la extracción. Una vez completado este proceso las muestras se trasladaron a tubos de 15 ml y se centrifugaron a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Una vez completado el proceso de centrifugado se colectaron los sobrenadantes en globos de evaporación y el MeOH y agua fueron eliminados completamente con la ayuda de un rotavapor de vacío a 37 °C. El material seco obtenido fue resuspendido en 500 µl de agua ultrapura y filtrado con la ayuda de una jeringa y un filtro de 0.20 µm.

7.2 Análisis HPLC-DAD

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1200 provisto de bomba cuaternaria y de un detector de diodos en circuito integrado y acoplado a una estación de tratamiento de datos HP Chem Station (Rev. B.04.01).

Para la determinación de compuestos fenólicos y GLSs se utilizó una columna de fase reversa Aqua C18 (4.6x150 mm, 3 µm) (Phenomenex, Inc.) termostata a 35 °C. La fase móvil utilizada es (A) 0.1% de ácido trifluoroacético, (B) 100% acetonitrilo de calidad HPLC. El gradiente de elución fue el siguiente: isocrático 10% de B durante 3 min., de 10 a 15% de B en 12 min., isocrático 15% de B durante 5 min., de 15 a 18% de B en 5 min., de 18 a 30% de B en 20 min. y de 30 a 35 de B en 5 min. El flujo de trabajo fue de 0.5 ml/min y el volumen inyectado de 100 µL. Las longitudes de onda establecidas como preferentes fueron 227 nm para los glucosinolatos y 280, 330 y 370 nm para los compuestos fenólicos.

7.3 Análisis por espectrometría de masas

El espectrómetro de masas utilizado fue un Finnigan LCQ con una fuente de ionización ESI y un detector de masas con trampa iónica, controlados por el software LCQ Xcalibur. El gas auxiliar y el envolvente fue nitrógeno con flujos de 6 y 1.2 L/min, respectivamente. El voltaje de la fuente era de 4.5 kV y el voltaje del capilar fue de 28V, la temperatura del

capilar era de 270 °C. Los espectros fueron registrados en modo positivo entre 150 y 2000 m/z. El detector de MS fue programado para realizar una serie de 3 registros consecutivos que incluyeron un registro completo, un MS2 del ion más abundante en el primer registro y un MS3 del ion más abundante del MS2 usando una energía de colisión normalizada del 45%.

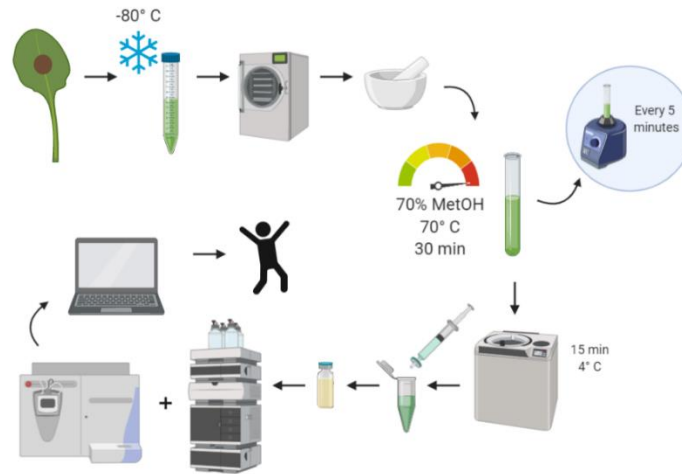


Figura 21. Flujo de trabajo para la detección simultánea y cuantificación de compuestos fenólicos y GLSs.

8. Extracción de proteínas

El material vegetal fue pesado y congelado en nitrógeno líquido. En el caso de que la extracción no se realizara el mismo día, los tubos fueron mantenidos a -80°C hasta su uso. El tejido congelado fue triturado hasta obtener un polvo fino con la ayuda de bolas de vidrio de 2 mm (Bohemia Cristal, Kavalierglass) y con la utilización de un homogeneizador Silamat S6 (Ivoclar Vivadent) a velocidad alta y en series de 10 segundos. Una vez obtenido un polvo homogéneo se añadió el buffer de extracción de proteínas (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25% NP-40, 100 μM PMSF, 1x cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail).

Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Una vez resuspendidas en buffer de extracción fueron centrifugadas a velocidad máxima y a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y mantenido en hielo hasta su cuantificación.

8.1 Cuantificación de proteínas (método Bradford)

La proteína total fue cuantificada utilizando el kit “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad), basado en ensayo de proteínas Bradford (Bradford, 1976). Este es un método colorimétrico basado en los cambios de absorbancia en el compuesto Coomassie Brilliant Blue G-250 en condiciones ácidas. La emisión cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a las proteínas.

La cuantificación se realizó en placas microtiter de 96 pocillos. Y se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Merck) para la realización de la curva standard, usando diez diluciones de BSA desde 0.1 µg/µl a 1 µg/µl en un volumen final de 10 µl.

La muestra se pipeteó por triplicado en una dilución 1:5 en un volumen total de 10 µl. Una vez pipeteados todos los standards y muestras se agregaron 200 µl de reactivo diluido a cada pocillo. La placa se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a medir a 595 nm en un fluorímetro Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoFisher Scientific).

9. Análisis y separación de fracciones proteicas

Las muestras de proteína se combinaron con buffer de muestras SDS 4x compuesto de 0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% β-mercaptoetanol y bromophenol blue, y se incubaron a 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Los geles de poliacrilamida fueron elaborados siguiendo el protocolo descrito por Sever *et al.* (2015) utilizando el kit Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Se cargaron entre 70 y 90 µg de proteína total por pocillo. El tamaño de las proteínas se determinó utilizando el

marcador Dual Color (Bio-Rad). El gel resultante fue transferido a una membrana Immobilon-P PVDF.

10. Western Blot

Las proteínas fraccionadas se transfirieron a una membrana Immobilon-P PVDF activada con metanol (Merck Millipore, Merck) utilizando el sistema de transferencia semi-húmeda Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo durante 20 min a 25V y 2 mA.

La membrana entonces fue bloqueada a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% disuelta en buffer salino Tris adicionado con 0.1% Tween (TBST). Para la detección de la proteína de interés, las membranas se incubaron a 4 °C toda la noche con el respectivo anticuerpo en una dilución 1:10.000 en leche en polvo al 5% disuelta en TBST. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces en TBST durante 5 min y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario. La membrana fue lavada nuevamente y se procedió a revelar con el reactivo Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare Life Sciences) y observada en el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Para la detección del control de carga, se incubó la membrana en stripping buffer (62.5mM Tris-HCl pH 6.7, 2% SDS y 100 mM β -mercaptoetanol) a 55 °C durante 10 min para remover los anticuerpos anteriores. Una vez completado el proceso de stripping se procedió a bloquear e incubar la membrana como se explicó con anterioridad. Como anticuerpo primario se utilizó α actina disponible comercialmente (Sigma-Aldrich, Merck) en una dilución 1:10.000 y como secundario una dilución 1:10.000 de un anticuerpo HRP α mouse IgG (Amersham, GE Healthcare Life Sciences).

11. Actividad mirosinasa

El protocolo para la cuantificación de actividad mirosinasa ha sido el utilizado por Brandt *et al.*, (2018) con modificaciones. Se utilizaron extractos de proteína filtrada de *Arabidopsis*, en un volumen total de 200 μ l, que consistían en 10 μ l de extracto de proteínas, 0.13 mM ácido ascórbico, 0.5 mM sinigrina y 10 μ l de extracto de proteína y buffer de extracción (Figura 22).

La absorbancia fue cuantificada en el fluorímetro Varioskan LUX en una placa microtiter de 96 pocillos a 227nm por 30 min. Cada 30 segundos se obtuvo un punto de absorbancia. Por cada replica biológica se llevó a cabo un control con buffer de extracción 0.13 mM ácido ascórbico y 10 μ l de extracto de proteína.

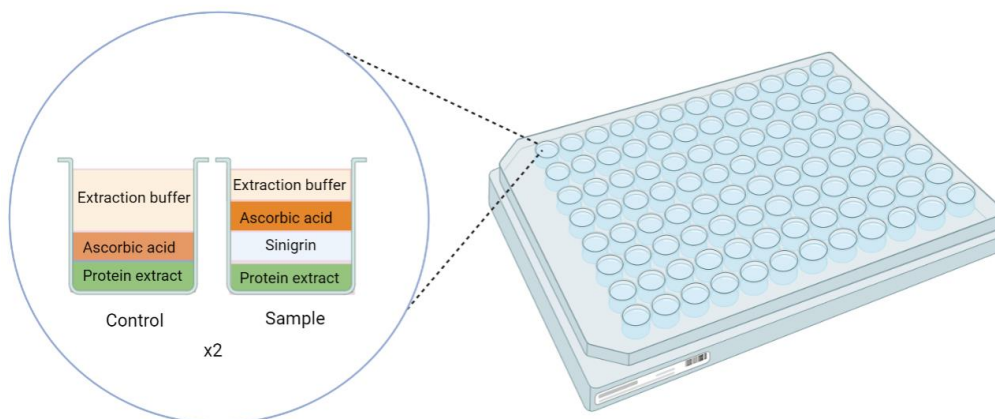


Figura 22. Representación del contenido de los pocillos muestra y control para la determinación de la actividad mirosinasa en extractos proteicos de *A. thaliana*.

12. Actividad nitrilasa/cianuro hidratasa

La detección de la actividad nitrilasa/cianuro hidratasa puede llevarse a cabo gracias a la cuantificación de compuestos derivados de su actividad, como son el amonio y la formamida.

12.1 Detección de amonio

La concentración de amonio en cultivos líquidos del hongo se determinó con una prueba colorimétrica de la casa comercial Merck (Ammonium test) con modificaciones.

Las muestras se centrifugaron a velocidad máxima durante 5 min para eliminar los restos celulares y tisulares de la muestra. Se procedió entonces a mezclar en vórtex 500 µl de la muestra centrifugada con 4,5 ml de agua destilada y 600 µl del reactivo NH4-1. Posteriormente, se añadieron los reactivos NH4-2 y NH4-3 según las indicaciones del kit. Se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 690 nm en el espectrofotómetro. Como muestra blanco se utilizaron 5 ml de agua destilada y como muestra de referencia se utilizaron 500 µl del medio de cultivo, en ambos casos se procedió tal y como se ha descrito para las muestras a analizar.

Los valores de la concentración de amonio (mM) se determinaron con la siguiente fórmula matemática: concentración de amonio (mM) = $[(Am-Ar)*1,58]/18$, donde Am es el valor de absorbancia de la muestra problema y Ar es el valor de la absorbancia de la muestra de referencia. Alternativamente se utilizó el método descrito por Yusuf *et al.* (2013) con modificaciones.

12.2 Detección de la actividad cianuro hidratasa a través de la cuantificación de formamida

La detección de formamida se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Cluness *et al.*, (1993), con modificaciones. Se utilizaron 100 μ l de las muestras procedentes de la centrifugación del micelio en cultivo líquido y se incubaron en 1 ml de 120 mM-NaCN/100 mM-Tris/HCl buffer (pH 8.5, 20 °C) por 15 min. Se agregaron 2 ml de 2.3M de hidroxilamina y se incubaron las muestras 7 min a 20 °C. Las muestras se colocaron el hielo y se agregó entonces 1 ml de 4M HCl y 1 ml de 1.23M FeCl₃/75mM HCl. Se midió la absorbancia a 540 nm y se estimó la cantidad de formamida con una curva estándar.

13. Actividad β -glucuronidasa

La actividad β -glucuronidasa se localizó en tejido infectado de plantas transformadas con el gen reportador β -GUS mediante ensayos histoquímicos, siguiendo una modificación del protocolo descrito por Jefferson *et al.* (1987):

- Tratar las plántulas con una solución de acetona al 90% (v/v), previamente enfriada a -20°C, durante 5 min.
- Eliminar la solución de acetona y lavar con agua destilada. Eliminar la solución de lavado y repetir.
- Retirar la solución de lavado y añadir la solución β -GUS.
- Incubar a 37 °C el tiempo necesario, dependiendo de las muestras.
- Eliminar la solución β -GUS y lavar con agua destilada dos veces.
- Decolorar las muestras con etanol al 70% (v/v). Repetir el lavado con etanol al 70% (v/v).
- Almacenar las muestras a 4 °C en la solución de etanol hasta realizar las correspondientes fotografías.

La solución está compuesta de: NaPO₄ 50 mM, pH 7, tritón X-100 0.5% (v/v), K₃Fe(CN)₆ 1 mM, K₄Fe(CN)₆ 1 mM, EDTA 0.05% (w/v) y 1 mg/ml del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucurónico, Sigma) disuelto en DMSO (Sigma).

14. Tinción Trypan blue

La tinción con azul de tripano (trypan blue) es un ensayo histológico utilizado para la detección de muerte celular. La solución utilizada para realización de este protocolo cuenta con los siguientes componentes:

- 10 ml ácido láctico (85% w/w)
- 10 ml fenol (TE buffer equilibrated, pH 7.5-8.0)
- 10 ml glicerol ($\geq 99\%$)
- 10 ml de agua destilada
- 40 mg de trypan blue (concentración final de 10 mg/ml)

Las hojas inoculadas se cortaron y colocaron inmediatamente en placas Petri de (55mm) con 5ml de solución fresca, asegurando que las muestras se encontraban totalmente sumergidas. Se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min.

Una vez pasado el tiempo de incubación se retiró completamente la solución y se añadieron 5 ml de etanol al 100%. Las placas se sellaron y se incubaron toda la noche y se reemplazó el etanol hasta que se eliminó toda la clorofila y el tejido se tornó incoloro. Una vez obtenido este punto se colocó la muestra en un portaobjetos y se observó el tejido la lupa de microscopía estereoscópica LEICA MZ 16 FA.

15. Extracción de ácidos nucleicos

15.1 ADN genómico

El método más frecuente para la obtención de material de extracción fue el cultivo en medio líquido. El micelio producido en los matraces se recogió en tubos de 50 ml y se centrifugaron 3 veces a 3.000 rpm durante 5 min, en cada centrifugación se lavaron con 25 ml de agua destilada estéril.

El precipitado obtenido se colocó en papel de filtro y prensado para eliminar los restos de agua, repitiendo este proceso hasta que la muestra se encontró totalmente seca. El tejido obtenido se colocó en papel de aluminio y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron homogeneizadas en morteros con nitrógeno líquido y recogidas en fracciones de aproximadamente 250 mg en tubos de 1.5 ml. De no ser utilizadas inmediatamente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Alternativamente, el material para la extracción se obtuvo a partir de placas de hongo cultivado en medio sólido. En este caso, el micelio aéreo se obtuvo raspando toda la superficie de la placa con un bisturí estéril, evitando coleccionar medio de cultivo. El micelio obtenido se depositó en tubos de 1,5 ml, congelados en nitrógeno líquido y liofilizados antes de la extracción en un liofilizador Virtis advantage durante 8 horas. Una vez completado este proceso las muestras fueron pulverizadas con la ayuda de una varilla de vidrio estéril y se procedió inmediatamente a la extracción de ADNg.

Para la extracción de ADNg se utilizó el siguiente protocolo. En primer lugar se añadieron 400 μL de buffer de lisis (200mM Tris; 25mM EDTA; 250mM NaCl y 0.5% SDS), 200 μL de fenol y 200 μL de cloroformo:isoamílico (24:1), dando un vórtex fuerte al añadir cada compuesto. La suspensión resultante se centrifugó 30 minutos a 4°C y 7.500 rpm y la fase acuosa superior obtenida se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 3 μL de RNase (Roche) (10 mg/ml) al extracto y se incubó por 15 minutos a 37°C . Una vez completada la incubación se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico.

Posteriormente, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico, el tubo se agitó por inversión y se centrifugó 15 minutos a 4°C y 7.500 rpm. Se recogió nuevamente la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadió un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), se mezcló el contenido por inversión y se centrifugó durante 10 min 8.000 rpm y 4°C .

La fase acuosa se transfirió nuevamente a un tubo de 1,5 ml nuevo y se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y acetato de sodio (AcNa) 0,3 M, pH 5.2. La muestra se incubó a -20°C durante un tiempo mínimo de 30 min para precipitar el ADNg. Pasado este tiempo, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a velocidad máxima y 4°C . Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol al 70%. Se procedió a centrifugar nuevamente a 12.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet completamente utilizando el concentrador de vacío

Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator vacuum kit (ThermoFisher Scientific) o dejando el tubo abierto por unos minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 100 µl de agua Milli-Q estéril. La concentración y calidad del ADN_g obtenido se determinó utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se verificó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (m/V). El ADN_g se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

15.2 Extracción de ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN de plásmidos replicados en *E. coli* se utilizaron distintos procedimientos experimentales, eligiéndose uno u otro en función de las necesidades que se tuvieran en cada caso.

15.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid

Con el kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel) se siguió el protocolo para aislamiento de ADN plasmídico de alto número de copias. En primer lugar, se preparó convenientemente el tampón de lavado A4 (Wash Buffer A4) añadiendo los 100 ml de etanol 96% indicados en el manual. Además se precalentó a 50 °C el tampón AW (Buffer AW) y a 70 °C el tampón AE (Buffer AE), siguiendo las recomendaciones del manual del kit.

Las células transformadas de *E. coli* transformada con un vector portador de resistencia a ampicilina fueron cultivadas en 5 ml de medio LB líquido con 100 µg/ml a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 500 µl de LB.

Seguidamente, se centrifugó a 11.000 g durante 30 seg y se descartó el sobrenadante, retirando la mayor cantidad de líquido posible. Se añadieron 250 µl de tampón A1 (Buffer A1) y se resuspendió el pellet completamente mediante agitación en el vórtex. Se tuvo cuidado de que no quedaran grumos antes de añadir el tampón A2 (Buffer A2). Previo a la adición del tampón A2, se constató que el SDS que éste contiene no estuviera

precipitado. Si lo estaba, se hacía necesario calentar el tampón a 30-40 °C, hasta conseguir su disolución completa de nuevo. Se añadieron 250 µl y la suspensión se mezcló suavemente mediante inversión del tubo de 6 a 8 veces. Se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 300 µl del tampón A3 (Buffer A3) y se mezcló la suspensión mediante inversión del tubo de 6 a 8 veces.

Se centrifugó la muestra durante 5 min a 11.000 g y a temperatura ambiente (este paso debe ser repetido si se aprecia que el sobrenadante no es transparente). Se añadió un volumen máximo de 750 µl del sobrenadante a una columna y se centrifugó a 11.000 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió este paso hasta pasar todo el volumen de muestra por la columna.

Se añadieron 500 µl del tampón AW precalentado a 50 °C y se centrifugó a 11.000 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 600 µl de tampón A4 y se centrifugó a 11.000g durante 1 min. La columna vacía fue sometida a centrifugación a 11.000 g durante 2 min para remover todos los restos del tampón A4 que pudieran quedar y que pudieran interferir en las reacciones enzimáticas posteriores.

Se colocó la columna a un tubo de 1,5 ml, se añadieron 50 µl de tampón AE precalentado a 70 °C y se mantuvo el conjunto a 70 °C durante 2 min. Se centrifugó la columna 11.000 g durante 1 min y el eluido se almacenó a -20 °C.

15.2.2 Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se siguieron los procedimientos indicados en el manual *Molecular Cloning Third Edition* (Sambrook and Russell, 2001). Las células de *E. coli* transformadas con un plásmido portador de resistencia a ampicilina fueron cultivadas en 5 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina durante una noche. El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de solución I compuesta por 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8. Se resuspendió el precipitado de células y se incubó 5 min a temperatura ambiente.

Se añadieron 200 µl de solución II compuesta por 0,2 N NaOH y 1% SDS. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 min. La extracción se transfirió a un tubo de

1,5 ml y se añadieron 150 µl de 3 M acetato sódico pH 5,2. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante a un nuevo tubo, desechándose el resto. Un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) fue añadido a la extracción y la muestra fue agitada en el vórtex durante 30 seg. Después, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, eliminándose el resto. Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó a 12.000 rpm y 4 °C durante 15 min, desechándose el sobrenadante consecuente. Se lavó el precipitado con 200 µl etanol al 70%, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se desecó en el Speedvac. Finalmente, el precipitado de ácido nucleico se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ.

15.3 Extracción de ARN

15.3.1 Extracción de ARN de *A. thaliana*

Para la extracción de ARN a partir de tejido pulverizado de *A. thaliana*, se agregaron a la muestra 600 µl de buffer de extracción compuesto de Tris-HCl 1 M, NaCl 3 M, EDTA 0,5 mM, SDS 10% y 2 µl/ml de β-mercaptoetanol. Se añadieron 140 µl de KCl 3 M y se mantuvieron las muestras en hielo durante 15 min invirtiendo los tubos ocasionalmente. Se centrifugaron los tubos a velocidad máxima a 4 °C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml y se añadió 1 volumen de LiCl 8 M, y se mezcló el contenido de los tubos por inversión.

Se incubaron las muestras un mínimo de 2 horas a 4 °C y se procedió a centrifugar a velocidad máxima durante 20 min a 4 °C.

Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 µl de agua DEPC y 40 µl de NaAc 3 M. Se disolvió el pellet por pipeteo y se mezcló. Se añadieron 450 µl de fenol cloroformo y se mezcló en vórtex. Se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min a 4 °C. Una vez centrifugadas las muestras se tomó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml con 10 µl de NaAc 3 M. Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Los tubos se mantuvieron a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron a velocidad

máxima durante 20 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet, el cual se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

15.3.2 Extracción de ARN de *B. cinerea*

Para la extracción la ARN a partir de tejido liofilizado de *B. cinerea* se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System de la casa comercial Promega según indicaciones del fabricante.

15.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

La pureza y concentración de ADN y ARN se estimaron midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm en un espectofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). La relación A_{260}/A_{280} es un indicativo de la pureza del ácido nucleico de interés respecto a las proteínas y tiene un valor de 1,8 para el genoma de *E. coli* y 2,0 para el ARN total, valores que pueden presentar ligeras variaciones en función del contenido GC del genoma del organismo de interés. La estimación dada por el espectofotómetro se verificó analizando alícuotas de las muestras de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (m/V) para ADN y 1% (m/V) para el ARN. Se utilizó marcador de tamaño molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen) o Marcador de ADN Lambda/HindIII (Thermo Scientific™) dependiendo de las necesidades.

16.1 pGEM[®]-T Easy

Es un plásmido utilizado para la clonación de fragmentos de PCR y se adquiere de forma linearizada en un kit de la casa comercial Promega. Posee un residuo de timina adicional en cada uno de sus extremos 3' para mejorar la eficiencia de ligación en el plásmido de los productos de PCR. Contiene la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*) cuya inactivación insercional permite la identificación por color de los clones recombinantes. El tamaño del plásmido es de 3015 pb. En la Figura 23 se presenta la estructura del plásmido pGEM-T Easy.

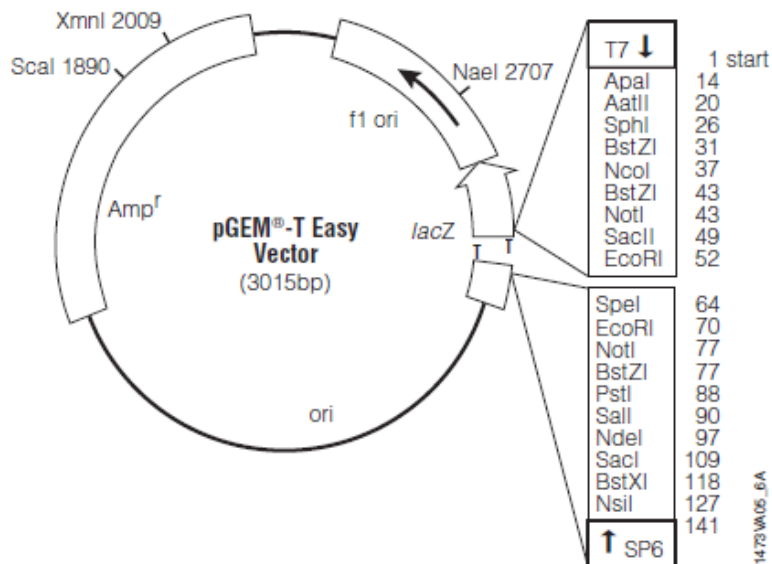


Figura 23. Estructura del plásmido pGEM-T Easy.

16.2 pDONR™221

Este plásmido es utilizado en la metodología "Deletions via Gateway" (DelsGate) desarrollado por García-Pedrajas *et al.* (2008) y combina la PCR con la tecnología Gateway® y el uso de la enzima endonucleasa *I-SceI* para generar construcciones de transformación que tienen como objetivo obtener mutantes en genes específicos mediante reemplazamiento génico. El plásmido pDONR-A-Hyg utilizado en DelsGate es una versión modificada del vector pDONR201 (Invitrogen) que incluye la inserción de marcadores de selección para la posterior transformación de hongos Ascomicetes. El procedimiento permite acelerar el proceso de construcción del vector de transformación. En la Figura 24 se presenta su estructura.

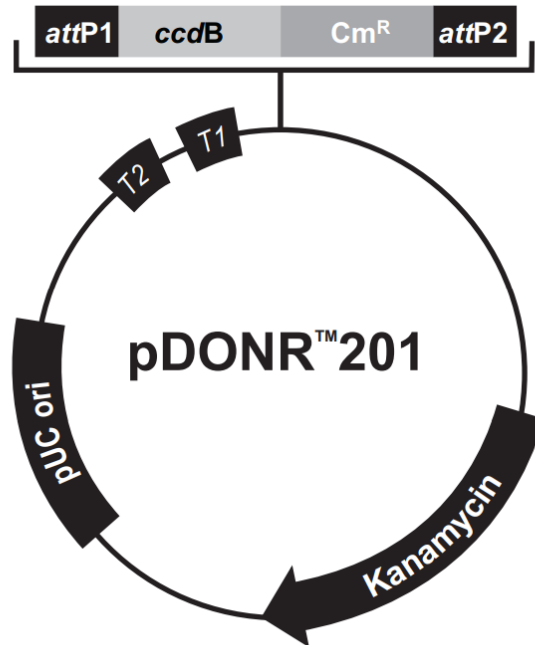


Figura 24. Estructura del plásmido pDONR™221.

17. Tratamientos enzimáticos del ADN

17.1 Enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo para la caracterización física de plásmidos y fragmentos de ADN y para la construcción de vectores recombinantes. Las diversas enzimas de restricción fueron proporcionadas por la casa comercial Takara a una concentración de 10 U/ μ l o 15 U/ μ l. Se define una unidad como la actividad de la enzima que digiere completamente 1 μ g de ADN en una h a 37 °C en un volumen total de 50 μ l. El tampón de incubación es proporcionado a una concentración 10 veces superior a la de trabajo por la casa Takara y es específico de cada tipo de enzima.

17.2 Ligaciones

La ligasa DNA T4 cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre terminaciones yuxtapuestas de 5'-fosfato y 3'-hidroxil en ADN o ARN de doble cadena con extremos romos o cohesivos. Esta enzima requiere ATP como cofactor de la reacción. La casa comercial Roche suministra junto con la enzima un tampón 10X que incluye ATP (660 mM Tris HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5). Las incubaciones se realizaron a 16 °C toda la noche. Como normal general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo en volúmenes de 10 o 20 μ l con las diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1 μ l de la enzima a una concentración de 1 U/ μ l.

18. Electroforesis

18.1 Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa (del 0,7 al 2%) preparados en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA) o tampón TBE 1X (89

mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Se utilizaron cubetas horizontales de 15 o 30 cm de largo, utilizándose como tampón de electroforesis 1X TAE o 1X TBE. El ADN se mezcló en proporción 6:1 con el tampón de carga de electroforesis (30% glicerol, 0,1% azul de bromofenol y 0,1% xilene cianol FF). Se cargaron las muestras en el gel de agarosa incluyendo rutinariamente en cada gel una carrera con una muestra de un marcador de peso molecular. Los geles se corrieron a una potencia de unos 80V, aunque ésta se redujo dependiendo del rango de tamaños a resolver y de la cantidad de ADN. Después de 45 a 60 min los geles se tñeron en un baño de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en 1X TAE durante 15 min a no ser que se agregara el bromuro directamente al gel de agarosa a una concentración de 0,1 µl/ml. El ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta Ingenius³ de la casa comercial Syngene.

18.2 Electroforesis de ARN

La electroforesis de ARN se realizó en condiciones desnaturalizantes siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook *et al.* (1989) y las indicaciones recogidas en el manual de marcaje de sondas DIG (Roche Molecular Biochemicals). Los geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes proporcionan la matriz y las condiciones apropiadas para una correcta separación y detección del ARN. Se preparan con concentraciones variables de agarosa (normalmente 1%) en tampón 1X MOPS, 5 mM AcNa, 1 mM EDTA pH 7,0, que contiene 2% formaldehído y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las muestras de ARN antes de ser cargadas se mezclaron con 2 volúmenes de tampón de carga. Para 0,5 ml de tampón de carga se añadieron 250 µl de 100% formamida desionizada, 83 µl de formaldehído, 50 µl de 10X MOPS, 50 µl de 100% glicerol, 10 µl de 2,5% de azul de bromofenol y 57 µl de agua 1% DEPC. Tras una incubación de 10 min a 65 °C para desnaturalizar el ARN, las muestras fueron depositadas en hielo y cargadas en el gel. Como tampón de electroforesis se utilizó 1X MOPS. La electroforesis se corrió a una potencia de 80 V durante 2 h dentro de una campana de extracción.

19. Recuperación de fragmentos de ADN

La muestra con el fragmento a recuperar se cargó generalmente en un gel de agarosa al 0,7%. Las condiciones de la electroforesis se seleccionaron garantizando la máxima resolución y separación del fragmento deseado. Se pesaron tantos tubos de 10 ml como muestras se necesitaba purificar. Una vez realizada la electroforesis y la tinción con bromuro de etidio, se registró la imagen y se procedió a cortar la banda del fragmento a recuperar, colocándolo entonces en el tubo previamente pesado. Posteriormente, para la purificación del fragmento de ADN del bloque de agarosa se utilizó el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up siguiendo las indicaciones recomendadas en el manual.

20. Transformaciones

20.1 Transformaciones de *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* con plásmidos se realizaron utilizando el método del choque térmico. En primer lugar, se prepararon células competentes que se almacenaron a -80 °C (Hanahan *et al.*, 1991). Para ello se incubaron células de *E. coli* DH5 α en 5 ml de LB a 200 rpm y 37 °C toda la noche. Este preinóculo se añadió a 500 ml de medio cuya composición para un litro es de 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,745 g de MgSO $_4$ y ajustado el pH a 7,6 con 10 N KOH. El medio se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta una OD $_{550}$ de 0,48 y se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 150 ml de TFB1 a 4 °C. La composición de la solución TFB1 es 12,1 g/l RbCl $_2$, 6,3 g/l MnCl $_2$, 2,9 g/l acetato potásico, 1,1 g/l CaCl $_2$, 15% glicerol, con un pH ajustado a 5,8 con ácido acético y se esteriliza por filtración. Las células en TBF1 se incubaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 2.500 rpm y 4 °C durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 ml de TBF2 a 4 °C. La composición de la solución TBF2 es 2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l de RbCl $_2$, 8,3 g/l CaCl $_2$, 15% de glicerol, con un pH ajustado a 7 con NaOH y se esterilizó por filtración. Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo durante 15 min y se repartieron en alícuotas para su conservación a -80 °C.

Para cada ensayo de transformación se mezclaron 100 μl de células competentes con 10 μl de ADN procedente de reacciones de ligación (en concentraciones de ADN variables según experimentos, pero generalmente entre 5 y 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Después se sometieron las células a un choque térmico que consistió en una incubación de 1 min a 42 °C seguida de una incubación en hielo durante 2 min. Se añadieron entonces 250 μl de LB y se incubó la mezcla de transformación a 37 °C y 200 rpm durante una hora y media. Las células se sembraron sobre placas de medio LB en presencia del agente selectivo y se incubaron durante 16 h aproximadamente a 37 °C.

Cuando se pretendía multiplicar un plásmido se recurrió a un procedimiento de transformación más rápido pero menos eficiente. Se mezclaron 10 μl de células competentes con 1 μl de plásmido (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Se incubó la mezcla por 1 min en hielo, 1 min a 37 °C y otro minuto en hielo. Se añadieron 100 μl de LB a la mezcla de transformación y se sembraron alícuotas de la misma en placas de LB con el agente selectivo.

En el caso de que el plásmido introducido contuviera el gen *lacZ*, sobre las placas de LB donde se siembran las células se extendieron previamente en una solución de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) 2 mg/ml . El gen *lacZ* codifica el péptido α de la enzima β -galactosidasa que metaboliza el X-Gal produciendo un compuesto derivado de color azul. Cuando se produce una inserción dentro del *polilinker* introducido entre el operador y el gen estructural de la β -galactosidasa, la enzima codificada no es activa, no se metaboliza el X-Gal y la coloración de la colonia es blanca. Así, se seleccionan colonias donde se ha insertado ADN en el *polilinker* del plásmido.

20.2 Transformación de *B. cinerea*

La transformación de *B. cinerea* se realizó siguiendo procedimientos basados en la obtención de protoplastos y la utilización de PEG (Hamada *et al.*, 1997). Para su obtención se partió de esporas de *B. cinerea* inoculadas en una concentración de 1×10^8 sp/ml en tres matraces de fondo estriado de 500 ml que contenían 100 ml de 1% de extracto de malta. Los matraces fueron incubados durante 16 h a 22 °C y 140 rpm. El cultivo se vertió en dos tubos de 50 ml, se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se repitió éste procedimiento hasta que se recogió todo el cultivo. Se añadió agua MilliQ

estéril hasta los 50 ml y se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadió solución KC (0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂, esterilizado en autoclave) hasta 50 ml en los dos tubos, se resuspendió el micelio, se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 ml de KC a uno de los tubos, se transfirió el micelio resuspendido al otro tubo, se resuspendió todo el micelio, se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante.

Para la obtención de protoplastos, el micelio sedimentado se resuspendió en 50 ml de 0,5% enzimas de lisis de *Trichoderma harzianum* (Sigma) disuelto en KC y esterilizado por filtración. La suspensión de micelio se incubó a 22 °C y 140 rpm en un matraz estéril de 100 ml durante al menos 2 h. Pasado este tiempo se comprobó el progreso de la formación de protoplastos con la ayuda de un microscopio. Los protoplastos se filtraron a través de una membrana de 25 µm. Se añadió KC a 4 °C hasta obtener un volumen de 50 ml, se centrifugó la suspensión a 1.200 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el lavado y finalmente se resuspendieron los protoplastos en el KC restante de la eliminación del sobrenadante para posteriormente mantenerlos en hielo. Para transformar los protoplastos se incubaron 10-20 µg de ADN de plásmido disuelto en 95 µl de KC con 5 µl de 5 mM de espermidina en hielo durante 5 min. Se añadieron 100 µl de la suspensión de protoplastos a la suspensión de ADN y se incubó en hielo durante 5 min. Después se añadieron y mezclaron suavemente 100 µl de solución PEG, compuesta por 25% PEG 3350, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, y se incubó la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadieron otros 500 µl de solución PEG, la suspensión se mezcló suavemente y se prolongó la incubación durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron finalmente 200 µl de solución KC y la suspensión se mezcló por inversión. Para sembrar la suspensión de transformación, ésta fue transferida a un matraz con 100 ml de medio SH Agar líquido, medio compuesto por 0,6 M sucrosa, 5 mM Tris-HCl pH 6,5, 1 mM NH₄H₂PO₄ y 0,8% agar, a 50 °C y la mezcla resultante fue agitada muy suavemente. Se dispusieron alícuotas de 10 ml en placas Petri y se dejaron regenerar los protoplastos durante 16-20 h a 22 °C. Se añadió entonces el medio de selección compuesto por SH agar líquido a 50 °C con 70 µg/ml de higromicina. Después de dos días de incubación a 22 °C se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico que fueron transferidos individualmente a placas de medio MEA suplementado con higromicina 100 µg/ml.

21. Reacción en cadena de la polimerasa

21.1 PCR estándar

Las amplificaciones de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo utilizando distintas enzimas polimerasas de ADN dependiendo del objetivo de la amplificación. Para comprobaciones rutinarias como la verificación de fragmentos clonados en plásmidos recombinantes o para identificar transformantes positivos se utilizó la enzima Biotools DNA Polymerase. Para utilizaciones más específicas, que necesitaban un ADN de mejor calidad, se utilizó la KAPA HiFi HotStart PCR kit. Las concentraciones de enzima utilizadas en cada caso fueron las recomendadas por la casa comercial, generalmente 1 unidad de enzima por cada 50 μ l de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 o 50 μ l que contenían 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada uno de los oligonucleótidos cebadores (*primers*) y 0,05 unidades de polimerasa por μ l de reacción. Cada enzima tiene su tampón específico proporcionado a 10 veces la concentración final de reacción y suplementado con $MgCl_2$.

La cantidad de ADN molde utilizado varió según el tipo de ADN y su pureza. En el caso de que el molde fuera ADN genómico se utilizaron entre 50-100 ng y para ADN plasmídico se utilizaron entre 0,01 y 10 ng. Cuando la intención era comprobar la clonación de un fragmento de ADN en un vector de *E. coli* se utilizó como molde 1 μ l de una suspensión de células preparada a partir de la colonia original diluida en 50 μ l de agua MilliQ estéril.

En el perfil del programa de PCR se incluyó una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguida de 35 a 40 ciclos de amplificación consistentes cada uno de ellos en una primera fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, una segunda fase de anillamiento de los cebadores a la temperatura óptima de anillamiento de cada par de cebadores considerados, durante 30 seg y una tercera fase de extensión de 72 °C durante entre 1 y 3 min, dependiendo del tamaño de fragmento a amplificar. Como pauta general se programó 1 min por cada 1.000 pares de nucleótidos que se quisieron amplificar. Todos los programas de PCR utilizados incluyeron un ciclo final a 72 °C durante 5 min.

La descripción de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR estándar en este estudio se encuentra detallada en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de cebadores utilizados (a) Locus en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (b) Locus en el genoma de B05.10 (c) Plásmido.

Nombre del cebador	Locus	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Aplicación
12g06180-5-HindIII	<i>Bcin12g06180^b</i>	ATC CAG GCT AAG CTT GGA CAG CTG CGG CC	68.8	PCR estándar
12g06180-5-KpnI	<i>Bcin12g06180^b</i>	TGA ACA GGT ACC TAT CGT AAT GCC AGC TAG	60.7	PCR estándar
12g06180-3-XbaI	<i>Bcin12g06180^b</i>	CAG ACC TCT AGA TGC CCC TAA AGT TGA TGG	61.3	PCR estándar
12g06180-3-NotI	<i>Bcin12g06180^b</i>	CAT GAG CGG CCG CTA GGT GTG AGT GAT TCT CTA CG	67.1	PCR estándar
12g06180-5UF	<i>Bcin12g06180^b</i>	GTG ATC TAG AAT GTG CTC CTC C	54.7	PCR estándar
12g06180-3DR	<i>Bcin12g06180^b</i>	CTT GGA GAT GCC GAA TAT GCT C	55.7	PCR estándar
12g06180-QF1	<i>Bcin12g06180^b</i>	GGA CCA GAT GGA CAA TGA CTT GC	60.6	PCR estándar
12g06180-QR1	<i>Bcin12g06180^b</i>	CGA TTC CAC CAT CCT GGT CTG CC	61.9	PCR estándar
HphAc	pITQ5 ^c	CGG GCA GTT CGG TTT CAG GC	66	PCR estándar
HphBc	pITQ5 ^c	CGT CTG GAC CGA TGG CTG TG	66	PCR estándar
B3140QF	<i>Bcin12g00460^b</i>	AAG GAA AGC CTG ACA GCG AGG AA	60.2	PCR estándar
B3140QR	<i>Bcin12g00460^b</i>	AGC ATG TGT GGG TGG AAG AGT CG	59.9	PCR estándar
OBcubq1-F	<i>Bcin02g04920^b</i>	ATT CAA GCC TCC CAA GGT CAG	64	PCR estándar
OBcubq1-R	<i>Bcin02g04920^b</i>	GAT CGG TCG GTC TTG TAA ACG	64	PCR estándar
BactA-62F	<i>Bcin16g02020^b</i>	TTG CAC CAT CGT CGA TGA AG	60	PCR estándar
BactA-131R	<i>Bcin16g02020^b</i>	CCA CCA ATC CAG ACG GAG TAT T	66	PCR estándar
<i>Bcin12g06180QF2</i>	<i>Bcin12g06180^b</i>	GGA CAA TGC CTT GCA AAG GC	57.7	RT-qPCR
<i>Bcin12g06180QR2</i>	<i>Bcin12g06180^b</i>	GAC GGA TGA GAT CAG GTC TC	54.3	RT-qPCR
<i>Bcin05g04960QF4</i>	<i>Bcin05g04960^b</i>	GCT GTT GTG TGA AGA ACG AAT	54.8	RT-qPCR
<i>Bcin05g04960QR4</i>	<i>Bcin05g04960^b</i>	CTT GGC CAC CCG TTT TTG AG	57.1	RT-qPCR
<i>Bcin02g03010QF2</i>	<i>Bcin02g03010^b</i>	ATT GCT CGG CAT GGC CAC CC	63.6	RT-qPCR
<i>Bcin02g03010QR2</i>	<i>Bcin02g03010^b</i>	GAA GAA TTG GCG CTC ACT CC	56.3	RT-qPCR
<i>Bcin14g00790QF1</i>	<i>Bcin14g00790^b</i>	TGG GAA CAT AGT GGA GGA CC	56.1	RT-qPCR
<i>Bcin14g00790QR1</i>	<i>Bcin14g00790^b</i>	CTA CCG CTGTT CCT GAC TTA	54.7	RT-qPCR
NIT1qPCR F	<i>AT3G44310^a</i>	AAC TGC ATT GTA CGC CAA AGG C	58.8	RT-qPCR
NIT1qPCR R	<i>AT3G44310^a</i>	GAA TTG GCA AGC CGA CAA GAC G	59.1	RT-qPCR
NIT2qPCR F	<i>AT3G44300^a</i>	GCT TTG TAC GCC AAA GGC ATT GAG	59.2	RT-qPCR
NIT2qPCR R	<i>AT3G44300^a</i>	AGA ACT GGC AAG CCG ACA ATA CG	59.7	RT-qPCR
NIT3qPCR F	<i>AT3G44320^a</i>	CAG GTT ATT GGC GTT GAC CCA TC	58.3	RT-qPCR
NIT3qPCR R	<i>AT3G44320^a</i>	AAC TTC TCC GCC TTG TCT AAA GTG	57	RT-qPCR
NIT4qPCR R	<i>AT5G22300^a</i>	CCA ACG GCC ATC AAA TCT TCC C	58.8	RT-qPCR
NIT4qPCR R	<i>AT5G22300^a</i>	AGC AGT CTC TCT GCC TTA TCT AGC	57.8	RT-qPCR
qMYB28F	<i>AT5G61420^a</i>	AGA CTG CGA TGG ACC AAC TAC C	58.8	RT-qPCR
qMYB28R	<i>AT5G61420^a</i>	TCT CGC TAT GAC CGA CCA CTT G	58.7	RT-qPCR
qMYB29F	<i>AT5G07690^a</i>	AGT TGT AGA TTG CGA TGG GCT AAC	57.2	RT-qPCR
qMYB29R	<i>AT5G07690^a</i>	TGT CTC GCT ATG ACT GAC CAC TTG	58.4	RT-qPCR
qMYB76F	<i>AT5G07700^a</i>	TCT CGT GGC AAT AAG TGG TCT GTC	58.7	RT-qPCR
qMYB76R	<i>AT5G07700^a</i>	TGT GTC ACG GGA TCA ATG CCA TC	59.7	RT-qPCR
qMYB34F	<i>AT5G60890^a</i>	GTC GCA AGC AAA TAC GCG GTT	59.7	RT-qPCR
qMYB34R	<i>AT5G60890^a</i>	TTC CAC TGA TGA TCC GG TCA G	58.7	RT-qPCR
qMYB51F	<i>AT1G18570^a</i>	GCC CTT CAC GGC AAC AAA TG	57.6	RT-qPCR
qMYB51R	<i>AT1G18570^a</i>	GGT TAT GCC CTT GTG TGT AAC TGG	58	RT-qPCR
qMYB122F	<i>AT1G74080^a</i>	ACG AGG AAG ATT CCA TCA TCA ACC	56.8	RT-qPCR
qMYB122R	<i>AT1G74080^a</i>	CTA TGG CCG ACC ATT TGT TGC C	59	RT-qPCR

21.2 RT-PCR (síntesis de ADNc)

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN total, en primer lugar se eliminaron los posibles restos de ADN genómico que pudieran haber sido copurificados durante la extracción de ARN total, ya que pueden originar amplificaciones no deseadas. Este proceso se realizó utilizando el kit comercial Turbo DNA-free™ (Ambion). Se trataron 5 µg de ARN total en un volumen de reacción de 25 µl con 1 unidad de Turbo DNase y su correspondiente tampón. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 min y se procedió a la inactivación de la enzima añadiéndole a cada reacción 0,1 volúmenes (2,5 µl) de la resina (agente desactivador) que incluye el kit. Se dejó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000g durante 1 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, teniendo cuidado de no tocar la resina que se encuentra en el fondo del tubo. Se tomó una alícuota de 1 µl de cada muestra para hacer una PCR estándar de un fragmento de ADN con una combinación de cebadores previamente comprobados. De esta manera es posible comprobar si el tratamiento con la Turbo DNase ha sido efectivo, ya que en caso de no haberlo sido se obtendrá producto de amplificación.

Posteriormente, para generar fragmentos de ADNc a partir del ARN total tratado se utilizó el kit PrimeScript™ Takara o alternativamente el kit iScript de Bio-Rad según las recomendaciones de cada fabricante. Estas enzimas generan moléculas de ADNc de cadena sencilla que podrían ser utilizadas en procedimientos tales como PCR cuantitativa.

La reacción de transcripción inversa se diseñó en un volumen final de 10 µl con 500 ng de ARN libre de ADN. Se añadieron 2 µl de buffer 5X, 0,5 µl de Oligo dT 50 µM, 0,25 µl de la enzima PrimeScript RT y agua tratada con DEPC hasta completar los 10 µl. Se colocó la reacción en el termociclador a 37 °C durante 15 min, luego a 85 °C durante 5 seg y por último a 4 °C. Antes de guardar las reacciones a -80 °C hasta su uso se tomó una alícuota de 1 µl de ADNc para realizar con ella una PCR estándar y comprobar si hay amplificación. La amplificación efectiva en este caso demuestra que la síntesis de ADNc ha tenido lugar de forma satisfactoria y que la muestra puede ser utilizada en procedimientos posteriores tales como la PCR en tiempo real.

En el caso de iScript la reacción se diseñó en un volumen final de 20 µl con 1 µg de ARN libre de ADN. Se añadieron 4 µl del mix de reacción 5X, 1 µl de la enzima iScript RT y agua

libre de nucleasas hasta completar los 20 μl . Se colocó la reacción en el termociclador a 25 °C durante 5 min, luego a 46 °C durante 20 min y por último 1 min a 95 °C para inactivar la enzima. Antes de guardar las reacciones a -80 °C hasta su uso se tomó una alícuota de 1 μl de ADNc para realizar con ella una PCR estándar y comprobar si hay amplificación.

21.3 PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa se llevó a cabo con el equipo de Step One Plus™ de Applied Biosystems y utilizando el sistema KAPA SYBR® FAST ABI Prism® 2X qPCR Master Mix para la amplificación en tiempo real. Cada reacción de RT-qPCR se realizó en un volumen de 10 μL con los siguientes componentes:

- KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™ (KAPA Biosystems): Este cocktail contiene la DNA polimerasa, el colorante fluorescente SYBR Green I, MgCl_2 , dNTPs y estabilizadores.
- Cebadores: Fueron diseñados para amplificar fragmentos de ADNc entre 100 y 200 pb y con una eficiencia de amplificación entre 95-98%. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 600 nM y se detallan en la Tabla 3.
- ADNc: Se utilizó 1 μL del producto obtenido de las reacciones de RT-PCR descritas anteriormente.

El perfil de RT-qPCR utilizado fue el recomendado por los fabricantes para la utilización de SYBR® Green y fue programado en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Este programa tiene una fase inicial de 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de amplificación de 95 °C de 3 seg y 60 °C durante 30 seg. Se obtuvo también la temperatura de disociación (T_m) de todos los productos de PCR y así obtener la curva de disociación (melting curve) y poder identificar amplificaciones no específicas.

La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando el método de comparación de CT (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001). El valor CT equivale al número de ciclos de PCR en los que la señal de una muestra llega al umbral de detección, el cual es el valor de fluorescencia

sobre la fluorescencia base y dentro de la región de crecimiento exponencial de la curva de amplificación. Es un valor inversamente proporcional a la cantidad de ADNc en la muestra, ya que a mayor cantidad de molécula, menor número de ciclos (CT) son necesarios para alcanzar este umbral.

Para conocer la cantidad relativa de transcrito o RQ (Relative Quantity of transcript) se calcula la diferencia del valor CT del gen de interés y de un gen control (ΔCT). A continuación, se calcula la diferencia entre el valor ΔCT de las diferentes condiciones problema y la condición control ($\Delta\Delta CT$). Por último, el valor RQ se calcula con la siguiente fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

El valor 2 se refiere al 100% de eficiencia de la reacción de PCR, es decir, que el producto de PCR se duplica con cada ciclo. La condición control es aquella respecto a la cual todas las condiciones problemas se normalizan y a la cual se le asigna un valor arbitrario de RQ = 1.

22. Hibridaciones de ADN

22.1 Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron con una técnica no radioactiva que se basa en la incorporación de dUTP unido a la digoxigenina (DIG, Roche) en los fragmentos de ADN que van a ser utilizados como tales. La digoxigenina es un esteroide encontrado en la naturaleza en las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* que debido a sus propiedades bioquímicas tiene facilidad para unirse a anticuerpos.

Primero, se optimizaron las condiciones de la reacción de marcaje mediante PCR para obtener, en cada caso, una única y clara banda, indicativa de un único y específico fragmento de ADN amplificado, del tamaño esperado. Después se realizó el marcaje sustituyendo en la reacción de PCR los dNTPS por la Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix (Roche). En paralelo se llevó a cabo una reacción de PCR con la

mezcla de dNTPs normales, no marcados, como control positivo. Se comprobó en un gel de agarosa el correcto marcaje de la sonda ya que la banda correspondiente debe mostrar un tamaño ligeramente superior al del fragmento sin marcar debido al peso añadido de la digoxigenina.

22.2 Southern Blot

Para desarrollar este protocolo, se siguieron las recomendaciones de la casa comercial Roche, recogidas en el manual de usuario "Dig User's manual" (dNTPs marcados con digoxigenina) así como las recomendaciones generales ofrecidas por Sambrook *et al.* (1989).

Las muestras de ADN, digeridas con distintas enzimas de restricción, fueron cargadas en geles de agarosa (0,7%) y sometidas a electroforesis para una correcta separación de los fragmentos digeridos. Los geles se visualizaron con bromuro de etidio y se marcaron convenientemente para identificarlos y orientarlos.

La preparación para la transferencia del ADN del gel a una membrana de nylon consta de cuatro fases consecutivas que incluyen depurinación, desnaturalización, neutralización y equilibrado. La depurinación se realizó para favorecer la transferencia de los fragmentos de ADN mayores de 10 Kb y consistió en dejar el gel expuesto durante 5 min a la luz ultravioleta. Posteriormente, se sumergió en la solución de desnaturalización (1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH) durante 15 min. Este paso se repitió una vez más con solución fresca y se lavó el gel con agua destilada durante 5 min. A continuación, se sumergió el gel en la solución de neutralización (1,5 M NaCl y 0,5 M Tris-HCl pH 7,5) durante 15 min, repitiéndose este paso una vez más con solución fresca. El equilibrado se realizó con 10X SSC (1,5 M NaCl y 0,15 M citrato sódico, pH 7) durante 10 min.

La preparación del blot o conjunto de transferencia se hizo en una bandeja de vidrio que contenía el tampón de transferencia (10X SSC) sobre el que se disponía una placa de plástico resistente a modo de puente donde reposaban las tres láminas superpuestas de papel Whatman 3MM que se sumergían por sus extremos en el tampón de transferencia. El gel preparado se colocó en posición invertida sobre las láminas de papel Whatman, se

eliminaron posibles burbujas y sobre él se dispuso una lámina de nylon Hybond-N de igual tamaño debidamente marcada. Se dispusieron encima del mismo dos piezas de papel Whatmann 3MM y se cubrieron con láminas de papel de plástico las partes no cubiertas por el gel. Sobre la membrana se colocó papel absorbente y sobre el conjunto se dispuso un peso de 0,5 kg aproximadamente. El ADN del gel se dejó transferir a la membrana de nylon por un mínimo de 16 h, después de las cuales se retiró el filtro que se colocó sobre papel Whatmann humedecido en 2X SSC. El ADN se fijó a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta en un Stratalinker. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó entre papel secante a 4 °C hasta su posterior uso.

La hibridación de la membrana de nylon con la sonda se realizó en tubos de vidrio sellados. En primer lugar, se realizó la prehibridación que consiste en incubar la membrana con el tampón de hibridación (5X SSC, 0,1% N-laurilsarcosina, 0,02% SDS y 1% de Blocking reagent) durante una h a 65 °C.

Se desnaturalizó la sonda a 95 °C durante 10 min y se añadió al tubo de prehibridación. El conjunto se hibridó durante 16 h a 65°C para hibridaciones con sondas absolutamente homólogas. Después se desmanteló el conjunto para proceder a la detección de la sonda, guardándose el tampón de hibridación que contiene la sonda para futuros usos.

La membrana se lavó dos veces en 2X SSC/0,1% SDS durante 5 min por cada lavado y a temperatura ambiente. Después se lavó otras dos veces en 0,5X SSC/0,1% SDS durante 15 min a 65 °C (en caso de hibridación homóloga). Se incubó 2 min a temperatura ambiente con tampón de lavado (100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7,5) durante al menos 30 min. Posteriormente, la membrana se incubó en 1X "Blocking solution" con 0,75 U/μl de anticuerpo antidigoxigenina (Roche) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavó dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente en tampón de lavado y se incubó durante 3 min en tampón de detección (10 mM Tris y 10 mM NaCl, pH 9,5). La membrana se colocó sobre una lámina de papel de plástico y sobre ella se extendió 1 ml del sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) diluido 1:100 en tampón de detección por cada 100 cm² de membrana. Posteriormente, se incubó la misma durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se procedió a detectar la quimioluminiscencia en el equipo de detección Chemidoc Imaging System de la casa comercial Bio-Rad.

Para la eliminación de la sonda de la membrana se utilizó una solución de 0,1X SSC/0,1% SDS hirviendo y se realizaron dos lavados con esta solución. Se dejó enfriar la solución y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre una pieza de papel Whatmann.

23. Secuenciación

Para obtener las secuencias de fragmentos de ADN de interés se utilizó el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. El servicio cuenta con un secuenciador 3100 Genetic Analyzer de la casa Applied Biosystems. El servicio solicita una cantidad de ADN de entre 400 y 600 ng en caso de que se trate de ADN plasmídico y de 100 ng si se trata de una banda de 1 kb en caso de que sea un producto de PCR. La cantidad de cebador para una reacción de secuenciación es de 3.2 pmol de cebador en un volumen total de 8 μ l.

24. Análisis de datos y recursos informáticos utilizados

El procesamiento y alineamiento de secuencias, el diseño de los plásmidos y cebadores, y la visualización y edición de los cromatogramas de secuenciación se realizaron mediante el programa Geneious® Pro 5.6.5 y la plataforma online Benchling.

Las bases de datos de genomas y proteínas se consultaron a través de páginas web:

Las secuencias de *A. thaliana* se obtuvieron a partir del *Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (Phoenix Bioinformatics Corporation).

La base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se utilizó para la consulta de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como para realizar alineamientos con el programa Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*).

El acceso a la secuencia del genoma de la cepa B05.10 de *B. cinerea* fue facilitado a través de la página del Broad Institute, en la sección de "*Fungal Genome Initiative*".

Los cálculos y análisis de los datos de las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron con el programa de Step One Plus™ V2.3 de Applied Biosystems.

Para el análisis rutinario de los datos espectrofotométricos obtenidos relativos a la cuantificación de ácidos nucleicos se utilizó el programa NanoDrop ND-1000 3.3 (Thermo Fisher Scientific).

Para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa mediante irradiación ultravioleta se utilizó el programa GeneSys V 1.7.2.0.

ImageJ y Adobe Photoshop CC se utilizaron para el diseño gráfico y edición de imágenes.

Para la creación de figuras y esquemas se utilizó

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistics 25.

Bibliografía



- AbuQamar S, Moustafa K, Tran LSP.** 2017. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**, 262–274.
- Agerbirk N, De Vos M, Kim JH, Jander G.** 2009. Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews* **8**, 101–120.
- Agerbirk N, Olsen CE.** 2012. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* **77**, 16–45.
- Aires A, Carvalho R.** 2017. Rapid Separation of Indole Glucosinolates in Roots of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* Subsp. *Pekinensis*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *International Journal of Analytical Chemistry* **2017**, 7–10.
- Albertos P, Romero-Puertas MC, Tatematsu K, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Nambara E, Lorenzo O.** 2015. S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature Communications* **6**, 1–10.
- Améras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mène-Saffrané L, Farmer EE.** 2003. Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **34**, 205–216.
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, et al.** 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* **7**.
- Arredondo-Peter R, Hill R, Hargrove M.** 2016. Phytoglobin: A novel nomenclature for plant globins accepted by the globin community at the 2014 XVIII conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins. *F1000Research* **5**, 1–8.
- Baidya S, Cary JW, Grayburn WS, Calvo AM.** 2011. Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 5524–5528.
- Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhu Z, Koubaa M.** 2016. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition* **3**.
- Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhu Z, Koubaa M.** 2016. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition* **3**, 1–12.
- Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C.** 2000. The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14819–14824.
- Cánovas D, Marcos JF, Marcos AT, Strauss J.** 2016. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel? *Current Genetics* **62**, 513–518.
- Carisse O.** 2015. *Epidemiology and aerobiology of Botrytis spp*
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13454–13459.
- Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RMP, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE.** 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**, 3132–3147.

- Bartel B, Fink GR.** 1994. Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, 6649–6653.
- Barth C, Jander G.** 2006. Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. Plant Journal **46**, 549–562.
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, et al.** 2009. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates. Science **251**, 101–106.
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL.** 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. Plant Cell **16**, 332–341.
- Bethke PC, Libourel IGL, Reinöhl V, Jones RL.** 2006. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. Planta **223**, 805–812.
- Billard A, Fillinger S, Leroux P, Bach J, Lanen C, Lachaise H, Beffa R, Debieu D.** 2011. Fenhexamid Resistance in the Botrytis Species Complex, Responsible for Grey Mould Disease. Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects.
- Boddy L.** 2016. *Pathogens of Autotrophs*. Elsevier Ltd.
- Bostock RM.** 2005. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. Annual Review of Phytopathology **43**, 545–580.
- Browse J.** 2009. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. Annual Review of Plant Biology **60**, 183–205.
- Bruand C, Meilhoc E.** 2019. Nitric oxide in plants: Pro- or anti-senescence. Journal of Experimental Botany **70**, 4419–4427.
- Caarls L, Pieterse CMJ, Van Wees SCM.** 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. Frontiers in Plant Science **6**, 1–11.
- Campbell L, Brunger MJ, Nolan AM, Kelly LJ, Wedding AB, Harrison J, Teubner PJO, Cartwright DC, McLaughlin B.** 2001. Integral cross sections for electron impact excitation of electronic states of N₂. Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics **34**, 1185–1199.
- Castanho MARB.** 2006. European Biophysics Journal: Preface. European Biophysics Journal **35**, 91
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikk H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J.** 2005. The arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. Plant Physiology **137**, 253–262.
- Conrath U, Amoroso G, Köhle H, Sültemeyer DF.** 2004. Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. Plant Journal **38**, 1015–1022.
- Chagué V, Danit LV, Siewers V, Gronover CS, Tudzynski P, Tudzynski B, Sharon A.** 2006. Ethylene sensing and gene activation in Botrytis cinerea: A missing link in ethylene regulation of fungus-plant interactions? Molecular Plant-Microbe Interactions **19**, 33–42.
- Corpas FJ, Barroso JB.** 2013. Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. New Phytologist **199**, 633–635.

- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L.** 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**, 581–588.
- De Berrazueta JR.** 1999. El nobel para el óxido nítrico. la injusta exclusión del Dr. Salvador moncada. *Revista Espanola de Cardiologia* **52**, 221–226.
- De Bruyne L, Höfte M, De Vleeschauwer D.** 2014. Connecting growth and defense: The emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Molecular Plant* **7**, 943–959.
- Dean RA, Timberlake WE.** 1989. Production of cell wall-degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: a model system for fungal pathogenesis of plants. *The Plant cell* **1**, 265–273.
- Dieryckx C, Gaudin V, Dupuy JW, Bonneu M, Girard V, Job D.** 2015. Beyond plant defense: Insights on the potential of salicylic and methylsalicylic acid to contain growth of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* **6**
- Differential D.** 2010. R eview R eview. *Biomarkers* **5**, 63–77.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF.** 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10328–10333.
- Durrant WE, Dong X.** 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185–209.
- El Sayed G, Louveaux A, Mavratzotis M, Rollin P, Quinsac A.** 1996. Effects of glucobrassicin, epiprogoitrin and related breakdown products on locusts feeding: *Schouwia purpurea* and desert locust relationships. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **78**, 231–236.
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A.** 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **49**, 631–642.
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM.** 2003. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal* **35**, 193–205.
- Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz M, Milczarek G, Jelen H, Jackowiak H.** 2007. Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytologist* **175**, 718–730.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R.** 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344–350.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L.** 2010. Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816–3830.
- Frerigmann H, Gigolashvili T.** 2014. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in arabidopsis *Thaliana*. *Molecular Plant* **7**, 814–828.
- Frerigmann H, Hoecker U, Gigolashvili T.** 2021. New Insights on the Regulation of Glucosinolate Biosynthesis via COP1 and DELLA Proteins in Arabidopsis *Thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **12**, 1–15.

Fukumori Y, Nakajima M, Akutsu K. 2004. Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 256–260.

Gigolashvili T, Engqvist M, Yatusevich R, Müller C, Flügge UI. 2008. HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **177**, 627–642.

Gisone P, Dubner D, Del Rosario Pérez M, Michelin S, Puntarulo S. 2004. The role of nitric oxide in the radiation-induced effects in the developing brain. *In Vivo* **18**, 281–292.

Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205–227.

Glindemann CP, Backenköhler A, Strieker M, Wittstock U, Klahn P. 2019. Synthesis and Biochemical Evaluation of an Artificial, Fluorescent Glucosinolate (GSL). *ChemBioChem* **20**, 2341–2345.

Gong JS, Lu ZM, Li H, Shi JS, Zhou ZM, Xu ZH. 2012. Nitrilases in nitrile biocatalysis: Recent progress and forthcoming research. *Microbial Cell Factories* **11**, 1–18.

Govrin EM, Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**, 751–757.

Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB. 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany* **63**, 695–709.

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100–103.

Guo H, Ecker JR. 2004. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 40–49.

Gupta DK, Corpas PFJ. 2019. *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*.

Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT. 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.

Gupta KJ, Igamberdiev AU. 2011. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* **11**, 537–543.

Gupta KJ, Kaiser WM. 2010. Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant and Cell Physiology* **51**, 576–584.

Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM. 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601–2609.

Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology* **8**, 307–313.

Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 303–333.

Hao F, Zhao S, Dong H, Zhang H, Sun L, Miao C. 2010. *Nia1* and *nia2* are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 298–307.

- Harvey JA, Gols R, Wagenaar R, Bezemer TM.** 2007. Development of an insect herbivore and its pupal parasitoid reflect differences in direct plant defense. *Journal of Chemical Ecology* **33**, 1556–1569.
- Hecht F, McCaw BK, Peakman D, Robinson A.** 1975. Letters to nature. *Nature* **255**, 243–244.
- Heil M, Baldwin IT.** 2002. Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**, 61–67.
- Hillmann F, Shekhova E, Kniemeyer O.** 2015. Insights into the cellular responses to hypoxia in filamentous fungi. *Current Genetics* **61**, 441–455.
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, et al.** 2007. Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6478–6483.
- Holz G, Coertze S, Williamson B.** 2007. The ecology of botrytis on plant surfaces. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 9–27.
- Howe GA, Jander G.** 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 41–66.
- Hoy JA, Hargrove MS.** 2008. The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 371–379.
- Hunziker P, Halkier BA, Schulz A.** 2019. Arabidopsis glucosinolate storage cells transform into phloem fibres at late stages of development. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4305–4317.
- Irwin RE, Strauss SY, Storz S, Emerson A, Guibert G.** 2003. The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. *Ecology* **84**, 1733–1743. **Ignarro LJ.** 2019. Nitric oxide is not just blowing in the wind. *British Journal of Pharmacology* **176**, 131–134.
- Ishikawa T, Okazaki K, Kuroda H, Itoh K, Mitsui T, Hori H.** 2007. Molecular cloning of Brassica rapa nitrilases and their expression during clubroot development. *Molecular Plant Pathology* **8**, 623–637.
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GKS, Wendehenne D.** 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**.
- Jedelská T, Luhová L, Petřivalský M.** 2021. Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Experimental Botany* **72**, 848–863.
- Jenrich R, Trompetter I, Bak S, Olsen CE, Møller BL, Piotrowski M.** 2007. Evolution of heteromeric nitrilase complexes in Poaceae with new functions in nitrile metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18848–18853.
- Kachroo A, Kachroo P.** 2009. Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 153–176. **John P.** 2002. Arshad, M., Frankenberger, W.T. Jr. Ethylene: agricultural sources and applications. *Annals of Botany* **90**, 424–424.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, Sheng YH, Howe GA.** 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7100–7105.

- Kaul P, Banerjee A, Banerjee UC.** 2007. Nitrile hydrolases. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 531–547.
- Kazan K, Manners JM.** 2008. Jasmonate signaling: Toward an integrated view. *Plant Physiology* **146**, 1459–1468.
- Kinsella M, Monk C.** 2012. 基因的改变 NIH Public Access. **23**, 1–7. **Khan MN, Mobin M, Mohammad F, Corpas FJ.** 2014. *Nitric oxide in plants: Metabolism and role in stress physiology*.
- Klepper L.** 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment (1967)* **13**, 537–542.
- Kliebenstein DJ, Rowe HC, Denby KJ.** 2005. Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: Variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant Journal* **44**, 25–36.
- Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H.** 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 16263–16267.
- Koshland DE.** 1992. The molecule of the year. *Science* **258**, 1861.
- Kovacs I, Lindermayr C.** 2013. Nitric oxide-based protein modification: Formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1–10.
- Kriechbaumer V, Park WJ, Piotrowski M, Meeley RB, Gierl A, Glawischnig E.** 2007. Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and β -cyanoalanine hydrolysis. *Journal of Experimental Botany* **58**, 4225–4233.
- Kutz A, Müller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW.** 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **30**, 95–106.
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ.** 2009. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling1[W][OA]. *Plant Physiology* **149**, 1797–1809.
- Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ.** 2011. Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 789–793.
- Lindermayr C.** 2018. Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: Key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 110–115.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R.** 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1938–1950.
- Lorenzo O, Solano R.** 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 532–540.
- Lyon GD, Goodman BA, Williamson B.** 2007. Botrytis cinerea perturbs redox processes as an attack strategy in plants. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 119–141.

- Malka SK, Cheng Y.** 2017. Possible interactions between the biosynthetic pathways of indole glucosinolate and Auxin. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–14.
- Manrique-Gil I, Sánchez-Vicente I, Torres-Quezada I, Lorenzo O.** 2021. Nitric oxide function during oxygen deprivation in physiological and stress processes. *Journal of Experimental Botany* **72**, 904–916.
- Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, Carmona L, Strauss J, Cánovas D.** 2016. Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Molecular Microbiology* **99**, 15–33.
- Marron AO, Akam M, Walker G.** 2012. Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic supergroups. *PLoS ONE* **7**, 1–10.
- Marroquin-Guzman M, Hartline D, Wright JD, Elowsky C, Bourret TJ, Wilson RA.** 2017. The Magnaporthe oryzae nitrooxidative stress response suppresses rice innate immunity during blast disease. *Nature Microbiology* **2**.
- Martínez-Bracero M, Alcázar P, Velasco-Jiménez MJ, Galán C.** 2019. Fungal spores affecting vineyards in Montilla-Moriles Southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* **153**, 1–13.
- Martínková L, Vejvoda V, Kaplan O, Kubáč D, Malandra A, Cantarella M, Bezouška K, Křen V.** 2009. Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments. *Biotechnology Advances* **27**, 661–670.
- Martínková P, Drabínová A, Liaw YL, Sanders EA, McFarland JL, Price RM.** 2017. Checking equity: Why differential item functioning analysis should be a routine part of developing conceptual assessments. *CBE Life Sciences Education* **16**, 1–13.
- Mcconn M, Browse' J.** 1996. The Critical Requirement for Linslenic Acid 1s Pollen Development, Not Bhstssynthesis, in an Aabidspsis Mutant. *The Plant Cell* **8**, 403–416.
- Mikkelsen MD, Petersen BL, Olsen CE, Halkier BA.** 2002. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* **22**, 279–295.
- Mira M, Hill RD, Stasolla C.** 2016. Regulation of programmed cell death by phytooglobins. *Journal of Experimental Botany* **67**, 5901–5908.
- Moreau M, Gyu IL, Wang Y, Crane BR, Klessig DF.** 2008. AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 32957–32967.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF.** 2010. NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**, 372–383.
- Morrissey JP, Osbourn AE.** 1999. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 708–724.
- Muller A, Weiler EW.** 2000. IAA-synthase, an enzyme complex from arabidopsis thaliana catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. *Biological Chemistry* **381**, 679–686.
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova G V., Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ.** 2013. Nitric oxide in plants: An assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS* **5**, 1–17.

- Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, Glazebrook J.** 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* **19**, 2039–2052.
- Nathan C, Shiloh MU.** 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8841–8848.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT.** 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159**, 11–35.
- Ninnemann H, Maier J.** 1996. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photocondiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology* **64**, 393–398.
- O'Reilly C, Turner PD.** 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - A comparative study. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1161–1174.
- O'Reilly C, Turner PD.** 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - A comparative study. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1161–1174.
- Osswald S, Wajant H, Effenberger F.** 2002. Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* **269**, 680–687.
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szucs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A.** 2005. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant Journal* **43**, 849–860.
- Pace HC, Brenner C.** 2001. The nitrilase superfamily: Classification, structure and function. *Genome Biology* **2**, 1–9.
- Palma JM, Freschi L, Rodríguez-Ruiz M, González-Gordo S, Corpas FJ.** 2019. Nitric oxide in the physiology and quality of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4405–4417.
- Panter SN, Jones DA.** 2002. Age-related resistance to plant pathogens. *Advances in Botanical Research* **38**, 251–280.
- Park WJ, Kriechbaumer V, Müller A, Piotrowski M, Meeley RB, Gierl A, Glawischnig E.** 2003. The Nitrilase ZmNIT2 Converts Indole-3-Acetonitrile to Indole-3-Acetic Acid. *Plant Physiology* **133**, 794–802.
- Pasternak RC, Smith SC, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C.** 2002. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. *Journal of the American College of Cardiology* **40**, 567–572.
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, et al.** 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788–791.
- Pichersky E, Gershenzon J.** 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 237–243.
- Pieterse CMJ, Dicke M.** 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science* **12**, 564–569.

Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**, 489–521.

Plesken C, Weber RWS, Rupp S, Leroch M, Hahn M. 2015. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 7048–7056.

Plesken C, Westrich LD, Hahn M. 2015. Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. *Plant Pathology* **64**, 128–136. **Piotrowski M.** 2008. Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* **69**, 2655–2667.

Prasad S, Bhalla TC. 2010. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. *Biotechnology Advances* **28**, 725–741.

Prasad S, Bhalla TC. 2010. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. *Biotechnology Advances* **28**, 725–741.

Prusky D. 1996. Pathogen Quiescence in. *Annu. Rev. Phytopathol* **34**, 413–434.

Quidde T, Osbourn AE, Tudzynski P. 1998. Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 151–165.

Raina A, Jamwal U, Parshad R. 2013. Enhancing nitrilase production from *Fusarium proliferatum* using response surface methodology. *SpringerPlus* **2**, 1–7.

Raiola A, Errico A, Petruk G, Monti DM, Barone A, Rigano MM. 2018. Bioactive compounds in brassicaceae vegetables with a role in the prevention of chronic diseases. *Molecules* **23**, 1–10. **Publications GG.** 1952. DigitalCommons @ University of Nebraska - Lincoln Hydrogen Bond Energies in Carboxylic Acids.

Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K. 2001. bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351–367.

Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 404–411

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 707–719.

Richards JK, Xiao CL, Jurick WM. 2021. *Botrytis* spp.: A contemporary perspective and synthesis of recent scientific developments of a widespread genus that threatens global food security. *Phytopathology* **111**, 432–436.

Romanazzi G, Feliziani E. 2014. *Botrytis cinerea*. In : *Postharvest decay : Control strategies* (Silvia Bautista-Baños Ed .). *Postharvest Decay : Control Strategies*.

Romero-Puertas MC, Campostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M. 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459–1469.

Rossi FR, Gárriz A, Marina M, Romero FM, Gonzalez ME, Collado IG, Pieckenstein FL. 2011. The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 888–896.

Ruggeri Chiuchetta SJ, de Castro-Prado MAA. 2005. Genotoxic evaluation of sodium nitroprusside in *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Biology* **28**, 798–803.

Ruth MR. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Yearbook of Endocrinology* **2012**, 119–120.

Sánchez-Vallet A, López G, Ramos B, et al. 2012. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates *Arabidopsis* resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology* **160**, 2109–2124.

Sánchez-Vicente I, Fernández-Espinosa MG, Lorenzo O. 2019. Nitric oxide molecular targets: Reprogramming plant development upon stress. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4441–4460.

Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D. 2017. Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **63**, 30–38.

Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O. 2015. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2857–2868.

Schweizer F, Fernández-Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R, Reymond P. 2013. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25**, 3117–3132.

Seo MS, Kim JS. 2017. Understanding of MYB transcription factors involved in glucosinolate biosynthesis in Brassicaceae. *Molecules* **22**.

Sheard LB, Tan X, Mao H, et al. 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400–407.

Sikorska-Zimny K, Beneduce L. 2021. The glucosinolates and their bioactive derivatives in Brassica: a review on classification, biosynthesis and content in plant tissues, fate during and after processing, effect on the human organism and interaction with the gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**, 2544–2571.

Smolen G, Bender J. 2002. *Arabidopsis* Cytochrome P450. *Genetics* **332**, 323–332.

Sønderby IE, Burow M, Rowe HC, Kliebenstein DJ, Halkier BA. 2010. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **153**, 348–363.

Spadaro D, Peralta-Ruiz Y, Grande Tovar C, et al. 2021. *Postharvest Pathology: Next Generation Solutions to Reducing Losses and Enhancing Safety*.

Spoel SH, Johnson JS, Dong X. 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18842–18847.

Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12837–12842.

Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835–841.

Stout MJ, Thaler JS, Thomma BPHJ. 2006. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annual Review of Entomology* **51**, 663–689.

Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1411**, 217–230.

Sturm C, Wagner AE. 2017. Brassica-derived plant bioactives as modulators of chemopreventive and inflammatory signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.

Takaya N, Uchimura H, Lai Y, Shoun H. 2002. Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (CYP55) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 1039–1045.

Thaler JS, Owen B, Higgins VJ. 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* **135**, 530–538.

Thimann K V., Mahadevan S. 1964. Nitrilase. I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **105**, 133–141.

Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661–665.

Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15107–15111.

Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal* **19**, 163–171.

Tierens KFMJ, Thomma BPHJ, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BPA, Broekaert WF. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology* **125**, 1688–1699.

Tiso M, Tejero J, Kenney C, Frizzell S, Gladwin MT. 2012. Nitrite reductase activity of nonsymbiotic hemoglobins from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **51**, 5285–5292.

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373–378.

Tudzynski P, Kokkelink L. 2009. *Botrytis cinerea*: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style. *The Mycota*, 29–50.

Turrion-Gomez JL, Benito EP. 2011. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular Plant Pathology* **12**, 606–616.

Turrion-Gomez JL, Eslava AP, Benito EP. 2010. The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 484–496.

- Uchimura H, Enjoji H, Seki T, Taguchi A, Takaya N, Shoun H.** 2002. Nitrate reductase-formate dehydrogenase couple involved in the fungal denitrification by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biochemistry* **131**, 579–586.
- Usselman MC, Leaist DG, Watson KD.** 2008. Dalton's disputed nitric oxide experiments and the origins of his atomic theory. *ChemPhysChem* **9**, 106–110.
- Valeri MC, Novi G, Weits DA, Mensuali A, Perata P, Loreti E.** 2021. Botrytis cinerea induces local hypoxia in *Arabidopsis* leaves. *New Phytologist* **229**, 173–185.
- Van Baarlen P, Staats M, Van Kan JAL.** 2004. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* **5**, 559–574.
- Van Baarlen P, Van Belkum A, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BPHJ.** 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: How do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 239–277.
- Van Hulten M, Pelser M, Van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J.** 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5602–5607.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135–162.
- Verhage A, Vlaardingerbroek I, Raaymakers C, Van Dam NM, Dicke M, Van Wees SCM, Pieterse CMJ.** 2011. Rewiring of the Jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Frontiers in Plant Science* **2**, 1–12.
- Vick BA, Zimmerman DC, Vick BA, Zimmerman DONC.** 1984. Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species Published by : American Society of Plant Biologists (ASPB) Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/4268698> Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log in to JSTOR to access the linked references . Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species ' . **75**, 458–461.
- Vos IA, Pieterse CMJ, Van Wees SCM.** 2013. Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology* **62**, 43–55.
- Wang H, Hao L, Shung C, Sunter G, Bisaro DM.** 2015. Published by : American Society of Plant Biologists (ASPB) Linked references are available on JSTOR for this article : **15**, 3020–3032. **Walters D, Heil M.** 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**, 3–17.
- Wang J, Higgins VJ.** 2005. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 284–292.
- Wang P, VanEtten HD.** 1992. Cloning and properties of a cyanide hydratase gene from the phytopathogenic fungus *Gloeocercospora sorghi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **187**, 1048–1054.
- Wasternack C.** 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**, 681–697.
- Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE.** 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* **37**, 877–888.

- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM.** 2002. Erratum: corrigendum: Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **417**, 571–571.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL.** 2007. Botrytis cinerea: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**, 561–580.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT.** 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622–631.
- Wink DA, Darbyshire JF, Nims RW, Saavedra JE, Ford PC.** 1993. Reactions of the Bioregulatory Agent Nitric Oxide in Oxygenated Aqueous Media: Determination of the Kinetics for Oxidation and Nitrosation by Intermediates Generated in the NO/O₂ Reaction. *Chemical Research in Toxicology* **6**, 23–27.
- Wink DA, Mitchell JB.** 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 434–456.
- Wittstock U, Burow M.** 2010. Glucosinolate Breakdown in Arabidopsis: Mechanism, Regulation and Biological Significance. *The Arabidopsis Book* **8**, e0134.
- Wittstock U, Kliebenstein DJ, Lambrix V, Reichelt M, Gershenzon J.** 2003. Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. In: *Integrative Phytochemistry: From Ethnobotany to Molecular Ecology* (ed. Romeo, JT). *Recent Advances in Phytochemistry* **37**, 101–125.
- Xie Y, Mao Y, Lai D, Zhang W, Zheng T, Shen W.** 2013. Roles of NIA/NR/NOA1-dependent nitric oxide production and HY1 expression in the modulation of Arabidopsis salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3045–3060.
- Yan X, Chen S.** 2007. Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* **226**, 1343–1352.
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE.** 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**, 2470–2483.
- Yang G, Wei Q, Huang H, Xia J.** 2020. Amino acid transporters in plant cells: A brief review. *Plants* **9**, 1–17.
- Yun BW, Feechan A, Yin M, et al.** 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Zhai Q, Li C.** 2019. The plant Mediator complex and its role in jasmonate signaling. *Journal of Experimental Botany* **70**, 3415–3424. **Yusuf F, Chaubey A,**
- Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL.** 2002. Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: Involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development* **16**, 3100–3112.
- Zhao Y, Lim J, Xu J, Yu JH, Zheng W.** 2020. Nitric oxide as a developmental and metabolic signal in filamentous fungi. *Molecular Microbiology* **113**, 872–882.

East is up