



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

ÁREA DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Estudio del metabolismo del óxido nítrico (NO)  
en *Botrytis cinerea*: mecanismos de producción  
y efectos fisiológicos**

DANIELA ISABEL SANTANDER GORDÓN

2014

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

ÁREA DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**Estudio del metabolismo del óxido nítrico (NO) en  
*Botrytis cinerea*: mecanismos de producción  
y efectos fisiológicos**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado: Agrobiotecnología

Órgano responsable del Programa de Doctorado:

Departamento de Fisiología Vegetal

Daniela Isabel Santander Gordón

Salamanca, 2014

**D. Luis Román Fernández Lago**, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**Estudio del óxido nítrico (NO) en *Botrytis cinerea*: mecanismos de producción y efectos fisiológicos**”, ha sido realizada en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca por **Dña. Daniela Isabel Santander Gordón**, bajo la dirección del Prof. Dr. 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 14 de noviembre de 2014.

Fdo: D. Luis Román Fernández Lago

**D. Ernesto Pérez Benito**, Profesor Titular de Genética del Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**Estudio del metabolismo del óxido nítrico (NO) en *Botrytis cinerea*: mecanismos de producción y efectos fisiológicos**”, ha sido realizada en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo mi dirección, por **Dña. Daniela Isabel Santander Gordón**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 14 de noviembre de 2014.

Fdo: Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo: Dña. Daniela Isabel Santander Gordón

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio 1 del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor Dr. Ernesto Pérez Benito. Su ejecución ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos AGL2009-08954 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y AGL2012-39876-C02 (Ministerio de Economía y Competitividad). Durante el desarrollo de la Tesis, he disfrutado de una beca de de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT), por haberme concedido la beca con la cual he podido realizar mis estudios de doctorado.

No encuentro palabras que expresen la gratitud inmensa que siento hacia mi tutor, el Dr. Ernesto Pérez Benito. Más que un tutor, ha sido un amigo y es una persona excepcional de principio a fin. Sin su constante apoyo y preocupación, no solo por mi bienestar, sino también por el de Vinicio, esta aventura no habría sido la misma. Trabajar bajo su tutela ha sido todo un placer.

A mis compañeros del laboratorio 1, junto a quienes hemos compartido alegrías y sinsabores y sin los cuales el día a día en el laboratorio no habría sido lo mismo. Especialmente quiero agradecer a Vir por sus detalles y su inigualable espíritu colaborador. Me llevo muchos lindos recuerdos de cada uno y les agradezco de corazón por haber alegrado mis días de trabajo y siempre tener una mano amiga dispuesta a ayudar. Espero haber sido una buena compañera.

A los agrobiotecnólogos pseudosalmantinos: Tere, Irene, Gaby, Marta, Estefanía, Rubén, Nieves, Dani, Javier, Wilson y Juan. Gracias por su amistad sincera y por los momentos que hemos compartido tanto dentro como fuera de Salamanca. Espero que nos volvamos a encontrar. Ha sido increíble conocerlos chicos!.

A las personas que forman parte del CIALE, profesores, estudiantes y personal de apoyo, con quienes hemos compartido agradables momentos y a quienes les agradezco su apoyo y cordialidad durante mi estancia en este centro. Quiero expresar un agradecimiento muy especial a Jorge, Ángel, Álex, Vicky y Esclaudys por su calidez humana y los incontables momentos llenos de risas y sobre todo, de disparates. Esta experiencia me ha rejuvenecido gracias a ustedes y sus locuras.

A los amigos que se han cruzado en mi camino a lo largo de mi estancia en Salamanca, especialmente a Luisa y Lina, que aunque compartimos poco tiempo, con cada detalle y cada momento compartido han enriquecido mi vida y espero nuestra amistad perdure con el tiempo.

A mi padre Diego, mi madre Janeth, mis hermanos Diana y Andrés y a toda mi familia, primos, tíos, sobrinos, abuelos, que a pesar de nombrarlos en última posición, son mi más grande y principal apoyo y las personas más importantes en mi vida. Hemos estado separados durante largo tiempo pero a través de cada mensaje o llamada los he sentido junto a mí durante toda esta aventura. Gracias de verdad por estar pendientes y este trabajo va dedicado a ustedes. No puedo dejar de nombrar a Vinicio, con quien nos lanzamos a esta aventura, que con todos sus matices resultó una maravilla. No imagino un compañero de vida mejor! Gracias por todo.

**Daniela Isabel Santander Gordón**

# ÍNDICES

---





## ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICES .....	III
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	XII
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1. <i>Botrytis cinerea</i> .....	9
a. Descripción general.....	9
b. Descripción biológica.....	9
c. Sistemática y descripción.....	10
d. Ciclo de vida .....	10
e. Ciclo de infección y epidemiología .....	12
f. Diversidad genética .....	13
g. Métodos de control de la enfermedad .....	15
h. Importancia en el cultivo de vid .....	17
2. El óxido nítrico.....	19
a. Aspectos generales .....	19
b. Aspectos químicos y señalización .....	20
c. Funciones fisiológicas .....	21
i. En animales.....	21
ii. En plantas .....	22
iii. En hongos .....	23
d. Mecanismos de producción de NO .....	24
i. No enzimáticos .....	24
1. Reducción de nitrito a óxido nítrico.....	24
ii. Enzimáticos .....	25
1. Sistema dependiente de la enzima nitrato reductasa (NR).....	25
2. Sistema dependiente de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).....	26
e. NO y estrés oxidativo.....	27
f. NO y estrés nitrosativo.....	28
3. NO en la interacción planta-patógeno .....	30
4. La detoxificación de NO por microorganismos: función de la enzima flavohemoglobina.....	32
5. La Flavohemoglobina en <i>B. cinerea</i> .....	34

6.	Ciclo celular en eucariotas-----	36
a.	Descripción general-----	36
b.	Regulación del ciclo celular-----	37
i.	Procesos y targets controlados por Cdk1-----	38
c.	Mecanismos de parada de ciclo celular por daños en el ADN-----	40
d.	Efectos en ciclo celular del estrés nitrosativo mediado por NO-----	41
	<b>OBJETIVOS-----</b>	<b>43</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS-----</b>	<b>47</b>
1.	ORGANISMOS-----	49
a.	Plantas-----	49
b.	Hongos-----	49
c.	Bacterias-----	50
2.	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO-----	51
a.	Plantas-----	51
b.	Hongos-----	51
i.	Cultivo en medio sólido de <i>B. cinerea</i> -----	51
ii.	Cultivo en medio sólido de <i>C. graminicola</i> -----	51
iii.	Cultivo en medio líquido de <i>B. cinerea</i> -----	52
iv.	Cultivo en medio líquido de <i>C. graminicola</i> -----	52
c.	Bacterias-----	52
3.	EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE <i>B. cinerea</i> y <i>C. graminicola</i> -----	53
4.	ENSAYOS DE GERMINACIÓN-----	54
a.	Cultivo estático de <i>B. cinerea</i> -----	54
b.	Cultivo estático de <i>C. graminicola</i> -----	54
c.	Cultivo en agitación de <i>B. cinerea</i> -----	55
d.	Cultivo en agitación de <i>C. graminicola</i> -----	55
5.	ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO-----	56
6.	ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS-----	57
a.	Estrés nitrosativo-----	57
b.	Estrés oxidativo-----	57
c.	Estrés salino-----	57
d.	Estrés osmótico-----	57
7.	ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTAS DE JUDÍA ( <i>P. vulgaris</i> variedad Riñón)-----	58
8.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS-----	59

a.	ADN genómico de <i>B. cinerea</i> -----	59
i.	Método TENSF -----	59
ii.	Método rápido -----	60
b.	ADN Plasmídico -----	60
i.	Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid ----	60
ii.	Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico -----	61
c.	ARN total de <i>B. cinerea</i> -----	62
9.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) -----	63
10.	VECTORES DE CLONACIÓN -----	65
a.	pGEM®-T Easy -----	65
b.	pBluescript II SK (+) -----	65
c.	pDONR-A-Hyg -----	66
11.	TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN -----	67
a.	Enzimas de restricción -----	67
b.	Ligaciones -----	67
12.	ELECTROFORESIS -----	68
a.	Electroforesis de ADN -----	68
b.	Electroforesis de ARN -----	68
c.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE) -----	69
13.	RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN -----	70
14.	TRANSFORMACIONES -----	71
a.	Transformaciones de <i>Escherichia coli</i> -----	71
b.	Transformación de <i>B. cinerea</i> -----	72
c.	Transformación de <i>C. graminicola</i> -----	73
15.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) -----	74
a.	PCR estándar -----	74
b.	RT-PCR -----	76
c.	PCR Cuantitativa -----	77
16.	HIBRIDACIONES -----	80
a.	Marcaje de sondas -----	80
b.	Southern Blot -----	80
c.	Western Blot -----	82
17.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL -----	83
a.	Diseño Experimental -----	83

b.	Análisis de las comparaciones 3vs4 y 5vs6vs7 -----	84
18.	SECUENCIACIÓN -----	85
19.	DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO -----	86
a.	Fluorimetría -----	86
b.	Microscopía de fluorescencia -----	89
20.	MICROSCOPIA -----	90
21.	ANÁLISIS DE LOS DATOS -----	92
<b>RESULTADOS -----</b>		<b>93</b>
1.	ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE NO EN <i>B. cinerea</i> Y EN <i>C. graminicola</i> -----	95
a.	Aproximación genética en <i>B. cinerea</i> -----	95
b.	Aproximación bioinformática en <i>C. graminicola</i> -----	100
i.	Detección de la producción de NO en <i>C. graminicola</i> mediante fluorimetría ----	101
ii.	Detección de la producción de NO en <i>C. graminicola</i> mediante microscopía de fluorescencia -----	102
iii.	NOS de <i>C. graminicola</i> -----	103
iv.	Intentos de obtención de mutantes $\Delta CgNOS$ por reemplazamiento génico -----	106
2.	ANÁLISIS DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL NO EN <i>C. graminicola</i> Y <i>B. cinerea</i> ----	111
a.	Efectos sobre la germinación en <i>C. graminicola</i> -----	111
i.	Cultivo estático -----	111
ii.	Cultivo en agitación -----	112
b.	Efectos sobre la germinación en <i>B. cinerea</i> -----	114
i.	Cultivo estático de la cepa silvestre B05.10 -----	114
ii.	Cultivo estático de la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ y $\beta 16.7$ -----	116
iii.	Cultivo en agitación -----	118
3.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A NO --- -----	120
a.	Diseño experimental -----	121
b.	Análisis del efecto protector de BCFHG1 frente a NO en esporas (5vs6vs7) -----	126
i.	Determinación del número de núcleos de la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ -----	146
ii.	Estudio de la proteína Cdc25 en el mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ -----	149
c.	Análisis del efecto en NO en esporas en germinación en la cepa silvestre (3vs4) ---	151
i.	Elección de genes expresados diferencialmente para la obtención de mutantes por reemplazamiento génico -----	157
4.	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES BoFuT4_P053120.1 Y BoFuT4_P059630.1 -----	159

a.	Descripción general de los genes BofuT4_P053120.1 y BofuT4_P059630.1-----	159
b.	Construcción de los plásmidos de transformación pDS13 y pDS90-----	162
c.	Transformación de <i>B. cinerea</i> con los plásmidos pDS13 y pDS90 -----	166
d.	Análisis genéticos de los transformantes de <i>B. cinerea</i> B05.10 obtenidos con pDS13 y pDS90 e identificación de mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta Bcmd1$ -----	166
e.	Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta Bcmd1$ .-----	171
i.	Análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico -----	172
ii.	Sensibilidad a diferentes tipos de estrés -----	174
1.	Estrés nitrosativo y oxidativo -----	174
2.	Estrés osmótico y salino-----	176
5.	Sobreexpresión del gen de la flavohemoglobina -----	182
a.	Construcción del plásmido pBcfhg1OV -----	182
b.	Transformación de <i>B. cinerea</i> con el plásmido pBcfhg1OV -----	183
c.	Análisis genético de los transformantes obtenidos con pBcfhg1OV e identificación de distintos eventos de integración del plásmido en el genoma de <i>B. cinerea</i> -----	184
	<b>DISCUSIÓN</b> -----	189
1.	ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN <i>B. cinerea</i> y <i>C. graminicola</i> -----	191
2.	EFFECTOS FISIOLÓGICOS DEL NO EN <i>B. cinerea</i> y <i>C. graminicola</i> -----	197
3.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN RESPUESTA A NO EN <i>B. cinerea</i> ---	199
4.	ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES <i>BcNor2</i> y <i>Bcmd1</i> -----	210
5.	SOBREEXPRESIÓN DEL GEN <i>Bcfhg1</i> EN <i>B.cinerea</i> -----	214
	<b>CONCLUSIONES</b> -----	217
	<b>ANEXOS</b> -----	221
	<b>Anexo 1.</b> Listado de los 207 genes cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO en esporas en germinación de la cepa $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 5vs6vs7. Los genes resaltados en verde son aquellos relacionados con la regulación de la utilización de nitrógeno y los resaltados en turquesa son los relacionados con actividad oxidoreductasa. -----	223
	<b>Anexo 2.</b> Listado de los 215 genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO en esporas en germinación de la cepa $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ (5vs6) obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 5vs6vs7. Los genes resaltados en amarillo son aquellos que pertenecen al cluster MCM (genes expresados en la transición de las fases M/G1 de ciclo celular), los resaltados en rojo participan en la replicación de ADN, aquellos en morado están relacionados con ciclo celular, los resaltados en rosa se encuentran dentro de la categoría funcional de Nucleolo y los resaltados en gris que codifican para proteínas de checkpoint. -----	233

**Anexo 3.** Listado de los 26 genes obtenidos del análisis diferencial de la comparación 7vs5 cuya expresión se ve alterada al eliminar el gen de la enzima flavohemoglobina en ausencia de NO exógeno. ----- 245

**Anexo 4.** Listado de los 104 genes de la cepa silvestre B05.10 cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 3vs4. Los genes resaltados en rosa codifican factores de transcripción. ----- 247

**Anexo 5.** Listado de los 103 genes de la cepa silvestre B05.10 cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 3vs4. Los genes resaltados en amarillo son aquellos que pertenecen a la categoría GO denominada como Mycelium development, los resaltados en verde participan en procesos de división celular y aquellos en gris están relacionados con reparación de ADN. ----- 253

**BIBLIOGRAFÍA** ----- 259

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ciclo de vida de <i>B. cinerea</i> y <i>S. sclerotiorum</i> con los diferentes estadios de desarrollo (sexual y asexual)-----	12
<b>FIGURA 2.</b> Química del óxido nítrico en sistemas biológicos-----	20
<b>FIGURA 3.</b> Reacción enzimática de conversión de la L-Arginina a NO y citrulina mediada por la enzima NOS.-----	26
<b>FIGURA 4.</b> El destino de un cromosoma parental está descrito a lo largo del ciclo celular-----	36
<b>FIGURA 5.</b> Mapa circular del plásmido pGEM®-T easy.-----	65
<b>FIGURA 6.</b> Mapa circular del plásmido pBluescript II SK.-----	66
<b>FIGURA 7.</b> Mapa circular del vector pDONR-A-Hyg .-----	66
<b>FIGURA 8.</b> Distribución de las cepas en las placas microtiter para cada experimento (DAF 5, 6, 7 y 8)-----	88
<b>FIGURA 9.</b> Fluorescencia (en Unidades de Fluorescencia, UF) detectada con el fluorímetro para cuantificar autofluorescencia y fluorescencia emitida cuando el NO producido por las esporas del hongo reaccionan con el agente colorante DAF-2DA en las condiciones indicadas (cepa y medio de cultivo)-----	97
<b>FIGURA 10.</b> Comparación de la cantidad de NO (en UF/mg de peso seco) producida por las cepas mutantes de <i>B. cinerea</i> que participan en las dos principales rutas de producción de NO y medida por la fluorescencia emitida cuando el colorante DAF-2DA reacciona con el NO producido por las esporas del hongo-----	99
<b>FIGURA 11.</b> Fluorescencia (en Unidades de Fluorescencia, UF) detectada con el fluorímetro para cuantificar autofluorescencia y fluorescencia emitida cuando el NO producido por las esporas de <i>C. graminicola</i> reaccionan con el agente colorante DAF-2DA en las condiciones indicadas (cepa y medio de cultivo)-----	102
<b>FIGURA 12.</b> Tinción con el agente colorante DAF-2DA de esporas de <i>C. graminicola</i> incubadas durante 4 horas en medio PDB y observadas al microscopio de fluorescencia-----	103
<b>FIGURA 13.</b> Árbol filogenético del gen NOS de especies pertenecientes al reino Fungi (en azul), al reino Animal (en rojo) y al reino Bacteria (en verde)-----	104
<b>FIGURA 14.</b> Dominios funcionales de la enzima NOS de <i>H. sapiens</i> -----	105
<b>FIGURA 15.</b> Esquema de la estrategia de construcción del plásmido pCgNOS utilizando la tecnología DelsGate.-----	107
<b>FIGURA 16.</b> Estrategia de reemplazamiento génico del gen NOS mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen NOS y del alelo mutante construido artificialmente-----	109
<b>FIGURA 17.</b> Efecto del NO en la germinación de <i>C. graminicola</i> M1.001 en cultivo estático -	112
<b>FIGURA 18.</b> Efecto del NO en la germinación de <i>C. graminicola</i> M.1001 en cultivo en agitación-----	113
<b>FIGURA 19.</b> Efecto del NO en la germinación de <i>B. cinerea</i> B05.10 en cultivo estático-----	115
<b>FIGURA 20.</b> Efecto del NO en la germinación de los mutantes $\Delta Bc fhg1 \alpha 7.2$ y $\beta 16.7$ y de la cepa silvestre Wt-----	118
<b>FIGURA 21.</b> Efecto del NO en la germinación de <i>B. cinerea</i> B05.10 en cultivo en agitación---	119

<b>FIGURA 22.</b> Condiciones experimentales objeto de estudio en nuestro análisis de expresión génica diferencial de <i>B. cinerea</i> en respuesta a un donador de NO (DETA 125 $\mu$ M) y un secuestrador de NO (cPTIO 500 $\mu$ M). -----	122
<b>FIGURA 23.</b> Esquema de los experimentos llevados a cabo de las 8 condiciones propuestas en el análisis de expresión génica diferencial en respuesta a donadores de NO exógeno y secuestradores de NO endógeno. -----	124
<b>FIGURA 24.</b> Scatter plots de las 3 réplicas biológicas (A, B y C) de las condiciones 5, 6 y 7. En cada gráfico XY se representa la comparación de 2 de las 3 réplicas de cada condición y su respectivo valor de R <sup>2</sup> . -----	127
<b>FIGURA 25.</b> Heatmap de genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO exógeno (down regulated, 5vs6) y genes cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO exógeno (up regulated, 6vs5) en la comparación 5vs6vs7-----	129
<b>FIGURA 26.</b> Número de genes identificados en cada una de las comparaciones de las condiciones 5vs6vs7 -----	130
<b>FIGURA 27.</b> Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 9 genes seleccionados para su validación por PCR Cuantitativa-----	134
<b>FIGURA 28.</b> Heat map de todos los genes del genoma anotado de <i>B. cinerea</i> que incluyen en su anotación el término GO “Regulación de la utilización del nitrógeno” -----	136
<b>FIGURA 29.</b> Histogramas que representan el cambio en los niveles de expresión de los genes diferencialmente expresados: BoFuT4_P026640.1, BoFuT4_P089950.1, BoFuT4_P055410.1, BoFuT4_P076160.1 y BoFuT4_P161830.1, cuya expresión se ve inducida por NO en la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . -----	137
<b>FIGURA 30.</b> Heat map de todos los genes del genoma anotado de <i>B. cinerea</i> que incluyen en su anotación el término GO “Replicación de ADN”, “Ciclo celular” y “Nucleolo” -----	140
<b>FIGURA 31.</b> Regulación de los programas transcripcionales por CDK1 durante el ciclo celular (Modificado de Enserink y Kolodner, 2010)-----	142
<b>FIGURA 32.</b> Cdk1 y la regulación de la replicación del ADN -----	143
<b>FIGURA 33.</b> Representación del cambio en los niveles de expresión del gen BoFuT4_P118300.1 -----	144
<b>FIGURA 34.</b> División nuclear de las esporas de <i>B. cinerea</i> durante la germinación-----	146
<b>FIGURA 35.</b> Tinción con DAPI de esporas de la cepa silvestre VeE2.1 y de la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ -----	149
<b>FIGURA 36.</b> Western de Cdc2 fosforilada detectada en la cepa silvestre VeE2.1 y en la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ -----	151
<b>FIGURA 37.</b> Heatmap de los genes cuya expresión aumenta (up regulated) o disminuye (down regulated) en respuesta a la exposición a NO en la comparación 3vs4. -----	153
<b>FIGURA 38.</b> Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 2 genes escogidos para su validación por PCR Cuantitativa -----	155
<b>FIGURA 39.</b> Secuencia de nucleótidos del gen BoFuT4_P053120.1-----	160
<b>FIGURA 40.</b> Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen BoFuT4_P053120.1 e identificada como un factor de transcripción tipo Zn(II) <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub> -----	161
<b>FIGURA 41.</b> Secuencia de nucleótidos del gen BoFuT4_P059630.1-----	161
<b>FIGURA 42.</b> Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen BoFuT4_P059630.1. -----	161
<b>FIGURA 43.</b> Secuencia genómica del gen BoFuT4_P053120.1 -----	162



<b>FIGURA 44.</b> Secuencia genómica del gen BoFuT4_P059630.1 -----	163
<b>FIGURA 45.</b> Esqueleto del plásmido p47-13 -----	164
<b>FIGURA 46.</b> Esqueleto del plásmido pDS13 y pDS90 -----	165
<b>FIGURA 47.</b> Estrategia de reemplazamiento génico de BoFuT4_P053120.1 mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen y del alelo mutante construido artificialmente y clonado en el plásmido pDS13-----	168
<b>FIGURA 48.</b> Estrategia de reemplazamiento génico de BoFuT4_P059360.1 mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen y del alelo mutante construido artificialmente y clonado en el plásmido pDS90-----	169
<b>FIGURA 49.</b> Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes candidatos de <i>B. cinerea</i> a ser auténticos mutantes $\Delta BcNor2$ -----	170
<b>FIGURA 50.</b> Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes candidatos de <i>B. cinerea</i> a ser auténticos mutantes $\Delta Bcmd1$ -----	171
<b>FIGURA 51.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta BcNor2$ y de la cepa Control 1 a las 72, 96 y 120 horas de crecimiento en medio MEA-----	172
<b>FIGURA 52.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta Bcmd1$ y de la cepa Control 1 a las 72, 96 y 120 horas de crecimiento en medio MEA-----	173
<b>FIGURA 53.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta BcNor2$ (56 y 82) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con SNP 1 mM, Menadiona 500 $\mu$ M y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2.5 mM-----	175
<b>FIGURA 54.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta Bcmd1$ (14 y 19) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con SNP 1 mM, Menadiona 500 $\mu$ M y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2.5 mM -----	175
<b>FIGURA 55.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta BcNor2$ (56 y 82) y de la cepa Control 1 en medio de cultivo MEA suplementado con 0,7 M de Sorbitol y 0,7 M de NaCl -----	177
<b>FIGURA 56.</b> Crecimiento radial de las cepas mutantes $\Delta Bcmd1$ (14 y 19) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con 0,7 M de Sorbitol y 0,7 M de NaCl -----	177
<b>FIGURA 57.</b> Imágenes representativas de hojas de judía infectadas con los mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta Bcmd1$ y la cepa Control 1. Las imágenes fueron tomadas a las 96 h.p.i.-----	179
<b>FIGURA 58.</b> Diámetro de la lesión producida en hojas de judía por los mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta Bcmd1$ -----	180
<b>FIGURA 59.</b> Mapa del plásmido pBcfhg1OV -----	183
<b>FIGURA 60.</b> Análisis mediante hibridación tipo Southern de 6 transformantes de <i>B. cinerea</i> , representantes de los distintos eventos de integración del plásmido pBcfhg1OV-----	184
<b>FIGURA 61.</b> Esquema de la integración del plásmido pBcfhg1OV en el gen <i>Bcfhg1</i> -----	186
<b>FIGURA 62.</b> Esquema de la integración del plásmido pBcfhg1OV en el gen <i>BcActA</i> -----	187

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Funciones del NO en los tejidos animales.-----	21
<b>Tabla 2.</b> Funciones del NO en plantas. -----	22
<b>Tabla 3.</b> Funciones del NO en hongos. -----	23
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.-----	75
<b>Tabla 5.</b> Cebadores utilizados para amplificar los genes de interés por PCR Cuantitativa. -----	77
<b>Tabla 6.</b> Descripción de los tratamientos llevados a cabo en el análisis de expresión diferencial. -----	83
<b>Tabla 7.</b> Cepas y tratamientos utilizados en los experimentos de detección de NO mediante fluorimetría. -----	86
<b>Tabla 8.</b> Parámetros utilizados en la medición de NO con el fluorímetro. -----	88
<b>Tabla 9.</b> Genes escogidos para su validación mediante PCR Cuantitativa que pertenecen a la comparación 5vs6vs7. Se indican los códigos de los genes, su función y categoría GO y el valor log2 de su nivel de inducción (+) o represión (-).-----	131
<b>Tabla 10.</b> Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión aumenta en respuesta a NO en la cepa $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ (6 vs 5). -----	135
<b>Tabla 11.</b> Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO en la cepa $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ (5 vs 6).-----	138
<b>Tabla 12.</b> Genes escogidos para su validación mediante PCR Cuantitativa que pertenecen a la comparación 3vs4. -----	154
<b>Tabla 13.</b> Categorías funcionales relevantes derivadas del análisis manual de los genes reprimidos por NO en esporas en germinación en la cepa silvestre de <i>B. cinerea</i> . -----	156
<b>Tabla 14.</b> Tipos de factores de transcripción encontrados entre los genes inducidos por NO en esporas en germinación en la cepa silvestre de <i>B. cinerea</i> .-----	157
<b>Tabla 15.</b> Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 a las 72, 96 y 120 horas. -----	173
<b>Tabla 16.</b> Porcentajes de la reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 frente a condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo. -	176
<b>Tabla 17.</b> Porcentajes de la reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 frente a condiciones de estrés osmótico y salino. -----	178
<b>Tabla 18.</b> Porcentajes de la reducción del diámetro de lesión producida por cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1.-----	181

# RESUMEN

---



*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno que infecta a más de 200 especies de plantas y es considerado un organismo necrótrofo “modelo” que crece preferentemente en tejido muerto o senescente pero que también puede infectar a los tejidos sanos de la planta. Las enormes pérdidas económicas que causa a nivel mundial y su relevancia científica le han dado la categoría de segundo hongo fitopatógeno más importante dentro de la patología molecular de plantas.

Durante la interacción planta-patógeno la planta huésped produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y óxido nítrico (NO), moléculas muy reactivas con importantes funciones señalizadoras que activan la muerte celular programada y que producen la respuesta de hipersensibilidad (HR). Esta respuesta determina el confinamiento del patógeno al punto de infección inicial, permitiendo a la planta combatir el ataque del patógeno y evitar su progreso a los tejidos circundantes. Además de su papel en la respuesta de hipersensibilidad, el  $H_2O_2$  y el NO son altamente tóxicos para los microorganismos y las condiciones hostiles que generan impiden el avance de los mismos en la planta huésped. Estos mecanismos resultan efectivos frente a patógenos biótrofos, que necesitan tejidos vegetales vivos para su supervivencia. Evidencias experimentales recientes indican que *B. cinerea*, como patógeno necrótrofo, se beneficia de esta muerte celular programada y es capaz de sobrevivir en estas condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo utilizando mecanismos de detoxificación tanto de las formas activas de oxígeno como de las formas activas de nitrógeno que le permiten infectar y colonizar de manera más efectiva a sus hospedadores. Adicionalmente se ha observado que *B. cinerea* produce NO, y las evidencias obtenidas sugieren que éste puede contribuir a acentuar la HR de la planta, lo que le conferiría una ventaja añadida a la hora de infectar y colonizar los tejidos adyacentes.

*B. cinerea* posee un eficiente sistema de detoxificación de NO basado en la enzima flavohemoglobina BCFHG1. Se ha comprobado que dicha enzima no constituye un factor esencial en la capacidad del hongo para infectar a la planta y que su función parece más bien estar relacionada con la modulación de los niveles de NO endógeno producido por el hongo durante el crecimiento saprofito.

El hecho de que *B. cinerea* produzca NO por sí mismo, conlleva importantes interrogantes de gran interés teórico. Dos de las cuestiones más importantes en este contexto son, primera, la relacionada con la naturaleza del mecanismo por medio del cual *B. cinerea* produce NO y, segunda, aquella que plantea cuáles son las funciones fisiológicas en las que participa el NO en este hongo fitopatógeno. Ambas cuestiones son los temas de investigación principales planteados en la presente tesis doctoral.

En bacterias, animales, plantas e incluso en otros hongos filamentosos, existen sistemas enzimáticos como la nitrato reductasa (NR) o la óxido nítrico sintasa (NOS) responsables de la producción de NO. Mediante un análisis bioinformático detallado ha sido posible descartar la presencia de un gen codificador de una enzima tipo NOS convencional en el genoma de *B. cinerea*. Sin embargo, sí se ha identificado un gen de estas características en el genoma del hongo hemibiotrofo *C. graminicola*. En *B. cinerea*, las evidencias previas de tipo bioquímico indicaban que ni el sistema enzimático de la NR, ni el sistema enzimático dependiente de una enzima NOS constituyen los sistemas mayoritarios responsables de la

producción de NO en este sistema. La aproximación genética propuesta en este trabajo, basada en la utilización de mutantes deficientes en etapas clave de una y otra ruta, no ha permitido generar información adicional a este respecto. En *C. graminicola* los intentos para generar un mutante nulo en el gen codificador de una enzima de tipo NOS convencional, y que ha supuesto el análisis de más de 200 transformantes obtenidos con un plásmido diseñado para determinar el reemplazamiento del alelo silvestre del gen identificado, han resultado infructuosos, lo que interpretamos que es consecuencia bien de la baja eficiencia de integración homóloga en este organismo, en particular de la ocurrencia de un doble evento de recombinación homóloga en regiones próximas, bien del carácter esencial de este gen.

En ambos organismos la exposición a donadores de NO exógeno determinó un retraso en la germinación. Por su parte, la eliminación de NO endógeno mediante tratamiento con secuestradores de NO, produjo el efecto contrario, es decir, una aceleración en la germinación de las esporas. Además, en el caso de *B. cinerea*, la exposición a NO de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ , incapaz de detoxificar NO, determinó no un retraso, sino un bloqueo en la germinación. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que la modulación de los niveles de NO a los que el microorganismo resulta expuesto afecta a la germinación y, por lo tanto, que el NO juega un importante papel en desarrollo y morfogénesis en ambos sistemas.

Con estas observaciones nos planteamos un análisis de expresión génica global en *B. cinerea* tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ , en respuesta a donadores de NO y a secuestradores de NO endógeno. Ha resultado particularmente informativo el estudio de la información generada con la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ . El análisis transcriptómico llevado a cabo permitió identificar grupos de genes que responden a NO de forma muy intensa. Entre los genes cuya expresión se ve reprimida por exposición a NO en la cepa mutante desprovista de su sistema de detoxificación de NO destacan genes relacionados con procesos de ciclo celular, síntesis de ADN y actividad del nucléolo. Estos resultados, considerados conjuntamente con nuestras observaciones sobre el bloqueo en germinación que determina la exposición a NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ , nos lleva a considerar que existe una relación entre exposición a NO exógeno y regulación de ciclo celular en *B. cinerea*. Las evidencias obtenidas sugieren en particular que la exposición a NO en esta cepa mutante inhibe la síntesis de ADN. Esta inhibición explica el bloqueo observado en división nuclear y germinación. Este bloqueo en la síntesis de ADN y en la división nuclear no parece ser dependiente de la actividad de cdk1, a pesar de que la expresión del gen *cdc25*, codificador de la fosfatasa de cuya actividad depende la activación y, por lo tanto, la funcionalidad de cdk1, resulta también reprimida por la exposición a NO exógeno en la cepa mutante

Por su parte, el análisis de las listas de genes reprimidos por exposición a NO en los experimentos llevados a cabo con la cepa  $\Delta Bcfhg1$  demuestran que está enriquecida la categoría funcional "regulación de la utilización de nitrógeno". Es interesante destacar que entre los genes que muestran un mayor nivel de inducción se encuentran genes codificadores de factores transcripcionales que regulan de forma negativa la expresión de genes de metabolismo del nitrógeno.

El análisis transcriptómico llevado a cabo con la cepa silvestre de *B. cinerea* determinó la identificación de un número de genes que responden a NO mucho menor que en el caso de la cepa  $\Delta Bcfhg1$ . Además, los genes que responden a NO lo hacen con niveles de inducción o represión más bajos. Todo ello supone que la enzima flavohemoglobina ejerce un papel protector frente a estrés nitrosativo muy notable y que limita de forma importante su efecto sobre expresión génica. Ni entre los genes que se inducen ni entre los genes que se reprimen se detecta enriquecimiento funcional. No obstante del estudio de los listados de genes obtenidos se derivan consideraciones importantes. Entre los genes inducidos en respuesta a NO se encuentra una proporción elevada de genes codificadores de factores de transcripción. Uno de ellos, el gen BoFuT4\_P053120.1, denominado en el curso de este estudio *BcNor2*, que codifica un factor de transcripción tipo Zn(II)/Cys<sub>6</sub>, fue seleccionado para su análisis funcional. Esta caracterización funcional demostró que *BcNor2* participa en la respuesta de *B. cinerea* al estrés oxidativo mediado por el radical superóxido, al estrés salino mediado por NaCl y al estrés osmótico mediado por Sorbitol. Además, el mutante  $\Delta BcNor2$  manifiesta una reducción en su capacidad de crecimiento saprofito en relación con la cepa Control 1 y exhibe una reducción en su agresividad en plantas de judía.

Por otra parte, dentro de los genes reprimidos por NO en la cepa silvestre fue posible identificar una fracción importante de genes relacionados con procesos de desarrollo y diferenciación en eucariotas. Entre ellos destacamos el gen BoFuT4\_P059630.1, denominado en el curso de este estudio *Bcmd1*, codificador de una proteína de función desconocida que aparece asociada al término GO “mycelium development”. Este gen fue seleccionado para llevar a cabo su análisis funcional. En dicho análisis, curiosamente, las cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$  presentaron el mismo fenotipo que las cepas mutantes,  $\Delta BcNor2$ , es decir, una menor capacidad de crecimiento saprofito, una disminución de su capacidad de infectar a la planta huésped y una mayor sensibilidad a estrés oxidativo mediado por menadiona, a estrés salino y a estrés osmótico. Teniendo en cuenta estas observaciones es tentador proponer que ambos genes son importantes en relación con la capacidad de crecimiento y desarrollo del hongo y que *Bcmd1*, relacionado con desarrollo, pueda estar bajo el control del factor de transcripción *BcNor2*.

Como aproximación experimental complementaria dentro de este trabajo de tesis doctoral, se planteó el estudio de los efectos fenotípicos que pudieran derivarse de la sobreexpresión del gen *Bcfhg1*. Con este objeto se construyó el plásmido *pBcfhg1OV*, portador de una fusión génica que permite la expresión del gen codificador de la enzima flavohemoglobina bajo el control del promotor del gen *BcActA*, construcción que fue introducida en *B. cinerea* mediante transformación. Se han seleccionado varios transformantes derivados de distintos tipos de procesos de recombinación sobre los que llevar a cabo un análisis de expresión y de función, en particular en relación con alteraciones en germinación, que permita valorar las consecuencias derivadas de una mayor tasa de eliminación de NO endógeno en *B. cinerea*. Lamentablemente, en el marco temporal de este trabajo sólo fue posible progresar en esta aproximación hasta la fase de selección de transformantes. Nuestro grupo de investigación trabajará en un futuro inmediato en la caracterización detallada de los mismos.

En nuestro intento por descubrir el mecanismo de producción de NO y las funciones fisiológicas que éste puede tener en hongos filamentosos en general y en *B. cinerea* y *C. graminicola*, en particular, se han llevado a cabo diversas estrategias de carácter farmacológico y genómico que, hasta el momento, apuntan a un efecto regulador del NO en la germinación de ambos microorganismos. El análisis transcriptómico aplicado en *B. cinerea* ha proporcionado información sobre los procesos y los factores genéticos que median la respuesta a NO en este hongo fitopatógeno necrotrofo.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. *Botrytis cinerea*

### a. Descripción general

*B. cinerea* es un hongo filamentoso responsable de la enfermedad conocida como podredumbre gris. La enfermedad ha recibido este nombre por el aspecto aterciopelado y la coloración grisácea que adquieren los tejidos a los que afecta y sobre los cuales esporula abundantemente.

Es un hongo de características muy particulares que puede vivir como saprófito sobre tejidos muertos pero también tiene un carácter polífago sobre plantas vivas. Se conoce que infecta a más de 200 especies de plantas y es considerado un organismo necrótrofo “modelo” (Van Kan, 2006), es decir que primero mata a las células de la planta huésped para luego colonizar el tejido muerto. Se sabe que, además, puede infectar tejidos sanos cuyas respuestas defensivas puede incluso modular en su propio beneficio (Van Kan, 2006; Williamson *et al.*, 2007).

Dentro del amplísimo rango de especies a las cuales *B. cinerea* infecta encontramos a cultivos de dicotiledóneas de gran interés económico a nivel mundial. Por las cuantiosas pérdidas económicas en estos cultivos y por su relevancia científica, *B. cinerea* ha sido considerado el segundo hongo fitopatógeno más importante en la patología molecular de plantas (Dean *et al.*, 2012).

*B. cinerea* es un hongo difícil de controlar porque posee una amplia variedad de factores y mecanismos de patogenicidad que le permiten atacar a la planta huésped de formas diferentes. Por otra parte, pudiendo infectar a tantos huéspedes diferentes, las fuentes de inóculo pueden ser muy diversas. Además, puede sobrevivir tanto en estadio de spora como de micelio y por largos periodos en forma de esclerocios en desechos de cultivos (Williamson *et al.*, 2007). Puede desarrollarse en casi todos los climas, por lo cual es considerado un hongo ubicuo.

### b. Descripción biológica

*B. cinerea* Pers.Fr. es un hongo descrito por Anton de Bary en 1886 y clasificado como ascomicete debido a que exhibe la estructura típica descrita para éste taxón.

Los conidióforos miden de 1 a 3 mm de largo y se dividen en numerosas ramas para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios, estructuras con forma redondeada pero ligeramente elíptica que presentan un cuello corto y miden 10x8,5 µm (Pezel and Pont, 1990). El micelio que se forma a partir de ellas es de color marrón oliva formado por hifas con un diámetro de entre 11 a 22 µm.

Los esclerocios son estructuras que se forman a partir de micelio en condiciones ambientales o climáticas desfavorables. Tienen forma discoidal o esférica y son estructuras melanizadas de color negro formada por hifas fuertemente entrelazadas que pueden medir entre 2-4 ×1-3 mm. Son generalmente consideradas como un medio fundamental para la supervivencia de *B. cinerea*.

### c. Sistemática y descripción

*B. cinerea* pertenece al phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae.

Dentro del género *Botrytis* existen casi 30 especies descritas. La mayor parte son específicas de un solo huésped. La excepción es *B. cinerea*, que posee un amplio rango de especies a las cuales infecta (Plesken *et al.*, 2014). 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 (Tudzynski and Kokkelink, 2009)

En el trabajo realizado por Staats y colaboradores (2005) basándose en la información derivada del análisis de la secuencia de 3 genes nucleares seleccionados tanto por codificar enzimas que participan en procesos celulares básicos como por presentar tasas de evolución moderadas (los genes codificadores de la enzima gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (*G3DPH*), de la proteína Heat-Shock 60 (*HSP60*) y de la subunidad II de la ARN polimerasa dependiente de ADN (*RPB2*)), se determinó que el género *Botrytis* se subdivide en 2 clados. El clado 1 incluye las especies *B. cinerea*, *B. pelargonii*, *B. fabae*, *B. calthae* y *B. pseudocinerea* (Walker *et al.*, 2011). El clado 2 es significativamente más diverso e incluye la mayoría de especies del género *Botrytis*.

### d. Ciclo de vida

La capacidad de *B. cinerea* para infectar diferentes tipos de plantas y tejidos bajo diversas condiciones ambientales, así como su habilidad de sobrevivir en el suelo por mucho tiempo mediante la formación de esclerocios, contribuyen a su amplia y persistente presencia en la naturaleza (Amselem *et al.*, 2011).

*B. cinerea* es un hongo cuyo ciclo de vida posee dos fases: una sexual, representada por el teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* y cuya presencia en la mayoría de los cultivos ha sido muy raramente reportada (Beever and Weeds, 2004); y una fase asexual que es la que encontramos en la naturaleza y que es la que manejamos habitualmente en todos los experimentos de laboratorio.

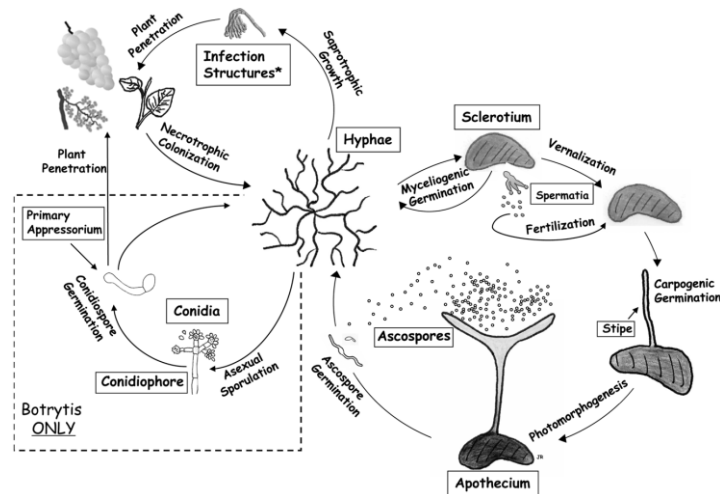
*B. cinerea* presenta un micelio tabicado e incoloro cuando crece en el interior de la planta huésped, y de color marrón oliva y de aspecto algodonoso de hifas de 11-23  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando crece sobre el tejido vegetal o en placas con medios sintéticos. Para dar inicio a la fase asexual, este micelio genera hifas aéreas las cuales poseen en sus extremos los conidióforos en los que se producen los macroconidios o esporas asexuales, que son fácilmente transportadas por el aire, el agua e incluso por los insectos y que constituyen el principal medio de dispersión del hongo. Estos conidios (con un tamaño de 10-12 x 8-10  $\mu\text{m}$ ) son ovoides o globulosos, lisos, unicelulares y ligeramente grisáceos, que tienen en su interior entre 5 y 10 núcleos normalmente. Se ha reportado que longitudes de onda específicas estimulan la formación de conidios, por lo que comúnmente se suele exponer el micelio del hongo sembrado en medios sintéticos a las longitudes de onda del ultravioleta cercano (Epton and Richmond, 1980).

Cuando las esporas germinan, sea sobre los restos de vegetales muertos o sobre tejidos sanos, desarrollan un tubo germinativo y penetran en el tejido vegetal causando una nueva lesión para de ésta manera volver a iniciar el ciclo. Por lo que podemos decir entonces que las esporas asexuales son el principal medio de dispersión del hongo. *B. cinerea* puede además producir un segundo tipo de conidio de menor tamaño (2-3  $\mu\text{m}$ ) a partir de micelio viejo. Son los denominados microconidios y son estructura unicelulares y de forma esférica.

Dentro de su ciclo de vida, los esclerocios juegan un papel central mediante su germinación tanto de forma carpogénica como vegetativa para dar inicio a la fase sexual que incluye la formación de apotecios, en cuyo interior se encuentran las ascosporas que son liberadas al ambiente. Estos se forman cuando las condiciones ambientales son desfavorables y son estructuras de resistencia que se sujetan fuertemente al sustrato. Están formados por una masa compacta de micelio agregado cubierta de células corticales melanizadas que protegen al micelio interno de agresiones externas como la desecación, la radiación ultravioleta y el ataque de microorganismos durante largos periodos de tiempo (Backhouse and Willetts, 1984). Una vez que las condiciones ambientales han mejorado, el esclerocio germina y se desarrolla produciendo más micelio. En cultivo *in vitro* sobre medios sintéticos el micelio se desarrolla muy rápidamente pasando de un color blanco inicial a un color marrón oliva que esporula abundantemente a temperaturas superiores a 15°C. Los esclerocios se producen a temperatura inferiores a 15°C.

En el campo, *B. cinerea* presenta mayormente aislados de tipo heterotálico, es decir, que pertenecen a una de las dos formas sexuales alternativas caracterizadas cada una de ellas por la presencia de una u otra forma alélica del gen responsable del tipo sexual: el alelo MAT1-1 o el MAT1-2 (Faretra *et al.*, 1988). Cuando aislados de tipo sexual diferente coinciden y las condiciones ambientales son las adecuadas es posible iniciar el ciclo sexual. Los microconidios tienen la función de espermatización (actúan como parental masculino en el cruzamiento) de los esclerocios de cepas de sexo diferente (que actúan como parental femenino). La fecundación de estos esclerocios desencadena el ciclo sexual, produciéndose apotecios con ascas que contienen 8 ascosporas binucleadas derivadas de una meiosis. Las ascosporas germinan originando un micelio que reinicia el ciclo asexual (o sexual) y que puede también infectar a la planta huésped.

En la Figura 1 se presenta el ciclo de vida y de infección de *B. cinerea* y de su pariente cercano *Sclerotinia sclerotiorum* (Amselem *et al.*, 2011). Ambos son necrótrofos y presentan un amplio rango de huéspedes por lo que son considerados modelos para el entendimiento de la complejidad de este tipo de patógenos. Además, comparten muchos aspectos fisiológicos y de desarrollo; así como difieren en su forma de apareamiento y en su habilidad de producir esporas asexuales.



**FIGURA 1.** Ciclo de vida de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* con los diferentes estadios de desarrollo (sexual y asexual) (Tomado de Amselem *et al.*, 2011).

### e. Ciclo de infección y epidemiología

De manera general, el ciclo de infección de *B. cinerea* sobre la planta huésped comienza cuando los conidios alcanzan su superficie. Si las condiciones son las adecuadas, éstos germinan adhiriéndose fuertemente a la superficie de las células vegetales mediante los apresorios. Se ha reportado que aunque los apresorios en *B. cinerea* son necesarios para que la penetración en el tejido del hospedador tenga éxito, no parecen ser suficientes por sí solos (Gourgues *et al.*, 2004).

En plantas de frutos pequeños, las flores son sitios importantes para el inicio de la infección. Sus pétalos infectados son vehículos del inóculo que, si se hallan en condiciones de humedad relativa alta, al ser dispersados por el viento infectan otras flores cuyos pétalos se convertirán a su vez en una nueva fuente de inóculo, lo que conllevaría una serie sucesiva de ciclos de infección y esporulación que tiene como resultado una pérdida total del cultivo.

Los insectos son agentes importantes de dispersión de inóculo de *B. cinerea* pero además también son causantes de lesiones en los tejidos vegetales que son aprovechadas por el hongo como medio de penetración en la planta huésped.

Superada la barrera de la penetración en el tejido vegetal se produce el establecimiento del hongo que conlleva la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y la formación de una lesión primaria como consecuencia de la respuesta de defensa de la planta. Se inicia entonces una fase de latencia en donde dichos mecanismos parecen controlar al patógeno y permanece localizado en áreas de necrosis que se corresponden con las lesiones primarias. En algunos casos, pasado un tiempo el hongo es capaz de superar las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación por el tejido vegetal circundante. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que inician nuevamente un ciclo de infección.

Como hemos mencionado en el apartado anterior, en condiciones desfavorables, como durante el invierno, el hongo se conserva en forma de esclerocios y lo hace sobre los tejidos senescentes del hospedador o bien como micelio sobre restos de tejido vegetal o semillas. Una vez llegada la primavera, el hongo empieza a crecer y producir los conidióforos en cuyo interior están los conidios multinucleados que serán dispersados por el viento o los insectos para depositarse sobre nuevos huéspedes, germinarán sobre ellos y se iniciará nuevamente la infección y propagación de la enfermedad. Así se genera nuevo micelio con capacidad para esporular, completándose el ciclo de propagación vegetativa.

Cuando no existen las condiciones ambientales favorables para que *B. cinerea* se desarrolle, se produce un estado de latencia en el cual, aunque el hongo esté en contacto con los tejidos del huésped, no se desarrolla la enfermedad y no presenta síntoma alguno. El hongo puede permanecer en ese estado por periodos de tiempo prolongados que suelen iniciarse durante la floración, continuar durante la fase de desarrollo y la maduración de los frutos e incluso después de la recolección. Al reiniciar su actividad durante la fase de postcosecha, se alimenta de los tejidos ricos en nutrientes de los frutos, con efectos devastadores.

En el apartado 1.a destacamos el hecho de que *B. cinerea* es un hongo con un rango muy amplio de huéspedes, lo que sumado a su capacidad de infectar prácticamente todo tipo de tejidos y órganos de la planta, su ubicuidad, su facilidad para ser transportado y su enorme capacidad de multiplicación, convierte a los métodos de control del patógeno en una tarea muy difícil de realizar.

#### f. Diversidad genética

*B. cinerea* es la especie del género *Botrytis spp.* que presenta mayor variación genética y fenotípica. Su gran variabilidad fenotípica resulta de la expresión de su variabilidad genética subyacente en la cual la mutación tiene un papel protagónico. Existen también otros mecanismos implicados en la generación de variabilidad genética como la naturaleza heterocarionte que presentan con frecuencia los aislados de campo, una ploidía compleja, la presencia y actividad de una gran variedad de elementos génicos extracromosómicos, la existencia de compatibilidad somática y la ocurrencia de una fase sexual en su ciclo de vida. La

contribución de alguno de estos mecanismos a la diversidad genética de *B. cinerea* se describe a continuación.

En relación al número de núcleos, los macroconidios poseen varios núcleos (esporas multinucleadas) y las microconidias poseen un solo núcleo (células uninucleadas). Shirane *et al.* (1988) reportaron un promedio de 3 a 6 núcleos por espora en los macroconidios. En este trabajo también se detectaron 16 cromosomas. A pesar de que otros autores (Faretra and Grindle, 1992) reportaron el mismo número de cromosomas, existen evidencias de que hay variación en cuanto al número y tamaño de los cromosomas, en especial en cepas de campo (Vallejo *et al.*, 2002).

Distintos estudios han revelado que cepas de *B. cinerea* originadas de ascosporas son inicialmente haploides pero conforme crecen, pueden dar lugar a colonias heteroploides. Existen autores que sugirieron que esta situación puede ser debida a que el proceso de cruzamiento sexual actúa restringiendo la participación de núcleos haploides, mientras que las células somáticas estimulan la heteroploidía (Beever and Weeds, 2004). Estos resultados conjuntamente con observaciones realizadas mediante microscopía de fluorescencia para determinar la ploidía de diferentes cepas de *B. cinerea*, apuntan a que existe cruzamiento sexual. Estas observaciones cobran relevancia si tenemos en cuenta que la recombinación meiótica que tiene lugar precisamente durante la reproducción sexual es considerada la fuente cuantitativamente más importante de variabilidad genética en poblaciones naturales. A pesar de que las estructuras sexuales de *B. cinerea* son raramente vistas en la naturaleza, se han realizado ensayos de cruzamientos en laboratorio con cepas recogidas en campo que han probado ser heterotálicas, es decir, que tienen una u otra de las alternativas alélicas del gen que determina el tipo sexual y que por lo tanto se pueden cruzar de manera efectiva. Así se podría sugerir a la reproducción sexual como uno de los mecanismos generadores de variabilidad genética de este hongo en condiciones naturales. Los estudios basados en el análisis de ligamiento proporcionan evidencias adicionales de la existencia de reproducción sexual en *B. cinerea*. Son pocos los estudios realizados en esta área pero los datos de segregación basados en los cruzamientos de cepas demuestran que, efectivamente, la reproducción sexual tiene lugar en *B. cinerea*.

Los elementos genéticos extracromosomales presentes en *B. cinerea* no son solamente portadores de genes implicados en su mantenimiento sino que además estos elementos pueden contribuir a la gran variabilidad genética observada en este hongo. Formando parte de este grupo de elementos están las mitocondrias, los transposones y los micovirus. El ADN mitocondrial ofrece una fuente de variación genética particular y distinta de la nuclear y ha demostrado ser muy útil en el estudio de la variación intraespecífica en hongos (Typas *et al.*, 1998). Los transposones son elementos genéticos ubicuos descritos en todos los eucariotas y procariotas investigados y fueron identificados en hongos filamentosos en la década de los 90 (Oliver, 1992; Dobinson and Hamer, 1993; Daboussi, 1997). En las cepas T4 y B05.10 de *B. cinerea* se ha determinado que los transposones representan el 0,6% y el 0,9%, respectivamente, de su genoma (Amselem *et al.*, 2011). Hasta el momento se han descrito 2 transposones: *Boty* (Diolez *et al.*, 1995) y *Flipper* (Levis *et al.*, 1997). En los trabajos de Giraud y colaboradores (1997, 1999) se describe que la presencia/ausencia de estos transposones permite establecer 2 especies simpátricas en este hongo: *Transposa* y *Vacuma*. Los aislados



incluidos en el grupo *Transposa* son aquellos que contienen los elementos *Boty* y *Flipper*, o uno de los dos, y aquellos incluidos en el grupo *Vacuma* no contienen transposones. Los autores proponen que las 2 especies simpátricas identificadas tienen diferencias significativas en cuanto a su rango de huéspedes y a sus características de patogenicidad, lo que contradice la idea tradicional de que *B. cinerea* es una población clonal sin especialización.

Los micovirus, o virus de hongos, a diferencia de lo que sucede en virus de otros grupos de especies, no causan “infección” con síntomas evidentes en el huésped. La mayor parte de ellos tienen un genoma constituido por ARN de doble cadena (ARNds) y son éstos los más comunes en *B. cinerea*. Las infecciones por los virus ARNds muestran perfiles muy diversos en términos de número de bandas y tamaño de las mismas, lo que sugiere la ocurrencia de infecciones mixtas o la existencia de virus satélites o de ARNds defectivos (Howitt *et al.*, 1995). Además de los virus ARNds se han descrito 2 virus ARN de cadena sencilla (ARNss) en *B. cinerea* que han sido caracterizados y secuenciados completamente (Howitt, 1998; Howitt *et al.*, 2001).

La compatibilidad somática es la capacidad que poseen determinadas cepas de numerosas especies de hongos para fusionar sus hifas durante el desarrollo vegetativo dando lugar a heterocariones, entidades biológicas en las que coexisten núcleos de tipos diferentes. En base a la compatibilidad somática se han caracterizado y subdividido especies de hongos en grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs, por sus siglas en inglés “Vegetative compatibility groups”). El gran número de VCGs detectados en *B. cinerea*, junto con el reducido número de cepas identificadas en cada uno, son consideradas evidencias de que la reproducción sexual juega un papel importante en las poblaciones naturales del patógeno como mecanismo generador de variabilidad genética. Como mencionamos en un inicio, la compatibilidad somática puede determinar la formación de heterocariones. En *B. cinerea*, la formación de estas entidades ha sido reportada en muy pocas ocasiones en la naturaleza pero en el laboratorio se ha logrado establecer en distintos grupos de investigación. Por tales razones es posible afirmar que la heterocariosis en *B. cinerea* se produce también en la naturaleza y lo verdaderamente relevante es determinar si este mecanismo contribuye a generar variabilidad con relevancia biológica en las poblaciones naturales del patógeno.

#### g. Métodos de control de la enfermedad

El control del hongo *B. cinerea* es una tarea difícil por diversas razones entre las que podemos mencionar la gran variedad de modos de ataque de los cuales puede hacer uso, el gran número de huéspedes que puede infectar y su enorme capacidad para sobrevivir y dispersarse eficientemente en forma de micelio, conidio o esclerocio en el caso de que las condiciones climáticas no sean óptimas para su desarrollo.

Varios autores afirman que el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de hongos fitopatógenos es esencial para comprender mejor las estrategias de control de los hongos de manera general (Bruns *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1993; Milgroom *et al.*, 1996). Los estudios de las poblaciones de *B. cinerea* hasta fechas recientes eran escasos

(Muñoz et al., 2002). En los últimos años han ido aumentando y se espera que con ellos podamos aspirar a diseñar estrategias de control efectivas. Un problema añadido es la complejidad y variabilidad de las poblaciones de *B. cinerea* detectada en varios de los estudios llevados a cabo.

Hasta el momento las estrategias utilizadas para el control de la podredumbre gris se pueden agrupar en 5 categorías: control químico, control biológico, prácticas y métodos culturales, métodos de estimulación de las respuestas de defensa de la planta y la mejora genética de la resistencia a la enfermedad. A continuación hablaremos un poco de cada una de ellas.

Dentro del control químico de *B. cinerea* tenemos el uso profiláctico de fungicidas como una de las prácticas más comunes, en particular sobre vid. El último fungicida antibotrytis desarrollado es la hydroxylanilida fenhexamida, que inhibe el enzima 3-ketoreductasa del complejo enzimático responsable de la C-4 demetilación durante la biosíntesis del ergosterol (Fillinger et al., 2008). Existen también productos utilizados en la "viticultura orgánica" que contienen cobre en su composición. Entre ellos tenemos el "caldo Bordeles" (mezcla de sulfato de cobre y cal hidratada) y el sulfato de cobre. La mayoría de viticultores tratan de evitar este tipo de productos por razones de tipo medioambiental y por la afectación de la calidad del vino que conlleva su uso (Jackson, 2008a).

Una alternativa al uso del control químico lo constituye el control biológico con el uso de agentes antagonistas como los hongos filamentosos del género *Trichoderma*, *Ulocladium* y *Gliocladium*; bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*; y levaduras del género *Pichia* y *Candida* (Elmer and Michailides, 2004). Cabe resaltar que debido a la amplia distribución del patógeno, su alta tasa de crecimiento y los bajos niveles de parasitismo observados en *B. cinerea*, no se ha trabajado muy intensamente en la utilización de agentes de control biológico en este hongo (BCA, por sus siglas en inglés- Biological Control Agents) (Elad and Stewart, 2004). La utilización de aceites esenciales extraídos de plantas así como de aceite mineral (blanco o parafina) para combatir a *B. cinerea* ha sido estudiada por varios autores. Sus estudios afirman que las cantidades necesarias para combatir al hongo son fitotóxicas para las plantas y además tienen efectos negativos sobre la calidad del vino. Por ello su uso no se considera una alternativa efectiva a los convencionales botryticidas (Jacometti et al., 2010).

La manipulación del hábitat, o también conocida como control biológico reconstituyente, es una técnica que trata de regular la plaga a través de la limitación de los recursos disponibles, como comida y refugio (Gurr et al., 2000). Dentro del manejo de *B. cinerea* en la vid, existen dos tipos de estrategias: una directa, que ayuda a disminuir los efectos de la podredumbre gris cuando existen condiciones ambientales favorables para su desarrollo (alta humedad, baja luminosidad y temperaturas moderadas) mediante la reducción de la cubierta vegetal y el aumento de la aireación para así minimizar los parámetros que favorecen el desarrollo del hongo, y una indirecta, mediante el uso por ejemplo de túneles de plástico o el uso de la ventilación en cultivos bajo cubierta, con el fin de reducir la humedad relativa. En post cosecha la práctica más efectiva es la utilización de la cadena de frío continuada en frutos no madurados para evitar que el hongo pueda reactivarse y afectar a todo el cargamento. Un manejo integrado del cultivo que incluya la predicción de la

enfermedad en combinación con datos meteorológicos precisos, ha resultado ser muy eficaz en la reducción de los daños producidos por *B. cinerea* (Berrie *et al.*, 2000)

La estimulación de la respuesta defensiva de la planta ha demostrado ser una práctica altamente efectiva en el combate a *B. cinerea* en uvas. Los compuestos utilizados son de dos tipos: uno biótico, como hormonas de plantas, entre las que destacan el ácido salicílico y el ácido  $\beta$ -amino butírico que pueden suprimir al hongo (Reglinski *et al.*, 1997), o extractos de plantas y microorganismos no patógenos o patógenos que pueden activar ya sea la resistencia inducida sistémica (ISR) o la resistencia adquirida sistémica (SAR), respectivamente. El otro es de tipo abiótico, como fertilizantes que contienen nitrógeno (Mundy, 2008), formas solubles de silicio que proporcionan fortaleza a las paredes celulares y mejoran la resistencia a *B. cinerea* (Miceli *et al.*, 1999; Jacometti *et al.*, 2007) o cobre que puede suprimir el ataque del patógeno elicitando la acumulación de peroxidasa, fenoles, resveratrol y antocianinas (Coulomb *et al.*, 1998).

De acuerdo a lo expuesto en apartados anteriores, *B. cinerea* presenta una gran diversidad genética, lo que sumado a su gran diversidad de mecanismos de infección, convierte a la búsqueda de genes de resistencia en especies vegetales una estrategia difícil de abordar. A pesar de contar con este panorama, se ha obtenido resultados parciales en especies silvestres del género *Solanum* en las que se ha identificado cierto nivel de resistencia en hojas y tallos a *B. cinerea* (Guimarães *et al.*, 2004; ten Have *et al.*, 2007). Así, ha sido posible identificar varios QTLs para resistencia frente al patógeno en la especie *Solanum habrochaites* (Finkers *et al.*, 2007a; Finkers *et al.*, 2007b), lo que hace aumentar las perspectivas de control en especies de tomate. El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a *B. cinerea* en estas especies permitiría desarrollar técnicas de transferencia genética para mejorar y aumentar la respuesta defensiva de los huéspedes frente al ataque del patógeno. Hasta el momento no se ha encontrado ningún fungicida que actúe a nivel molecular con efectos notables aún contando con los enormes avances realizados en el campo molecular. Además, la experimentación con cultivos transgénicos en Europa se dificulta debido a la gran controversia generada en torno a su aplicación en la agricultura, situación que ralentiza la experimentación con plantas transgénicas.

#### h. Importancia en el cultivo de vid

De entre la gran cantidad de plantas a las cuales infecta *B. cinerea* encontramos a la vid, un cultivo muy importante a nivel mundial y cuyos efectos devastadores generados alrededor del mundo son una de las principales preocupaciones de los viticultores por la grave incidencia que tiene sobre la calidad de los vinos. Más aún en España, considerado el país con el viñedo más extenso del mundo con una extensión de 1,16 millones de hectáreas destinadas a su cultivo, de las cuales el 97,4% se destina a vinificación. Cabe resaltar que la vid es uno de los principales cultivos en España, solamente por detrás de los cereales y el olivar.

Dentro del territorio español existe una amplia variedad de uvas autóctonas de reconocida calidad que producen vinos con grandes cualidades, las cuales se encuentran

agrupadas en lo que se conoce como Denominaciones de Origen (D.O). En España existen 69 D. O. de vino, lo que muestra una clara tendencia hacia la producción y consumo de vinos con ésta distinción. Este hecho ha llevado al país a ocupar el tercer lugar a nivel mundial en producción de vino, solamente por detrás de Francia e Italia.

## 2. El óxido nítrico

### a. Aspectos generales

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, simple y altamente tóxica, que posee una amplia gama de formas redox interrelacionadas con diferentes características reactivas que le permiten participar en un sinnúmero de vías de señalización (Lancaster, 1997).

La historia del NO puede remontarse a comienzos del siglo XVII, con la identificación por parte de Van Helmont (1577 – 1644) de esta molécula gaseosa, incolora e inodora como un compuesto químico como tal.

Su importancia radica en el hecho de haber sido la primera sustancia química gaseosa que ha demostrado ser producida por células vivas para enviar señales intercelulares (de Berrazuela, 1999). El descubrimiento de su papel como molécula mensajera en el aparato cardiovascular les valió el premio Nobel en el año de 1998 a tres científicos norteamericanos: Robert Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad. A raíz de este descubrimiento las investigaciones en cuanto a sus funciones biológicas le han valido al NO la denominación de “molécula del año” por la revista Science en 1992 (Koshland, 1992) así como la creación de una revista científica dedicada solamente a su estudio y la fundación por parte de Louis Ignarro de la Sociedad del Óxido nítrico en el año de 1996.

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

Como contaminante, el NO es producido durante la combustión de combustibles fósiles, como en el caso de la utilización de automóviles o en el mantenimiento de la actividad de fábricas, lo que lo determina que se encuentre en altas concentraciones en el ambiente. La humedad ambiental al entrar en contacto con el NO da lugar a la formación de lo que se conoce como lluvia ácida, cuyos efectos negativos en la acidificación de ríos y lagos y en cultivos e infraestructuras son uno de los grandes problemas que acarrea la era de la industrialización.

El NO, además, es un potente gas de efecto invernadero y es responsable de la pérdida de la capa de ozono debido a su reacción con el O<sub>3</sub>.

## b. Aspectos químicos y señalización

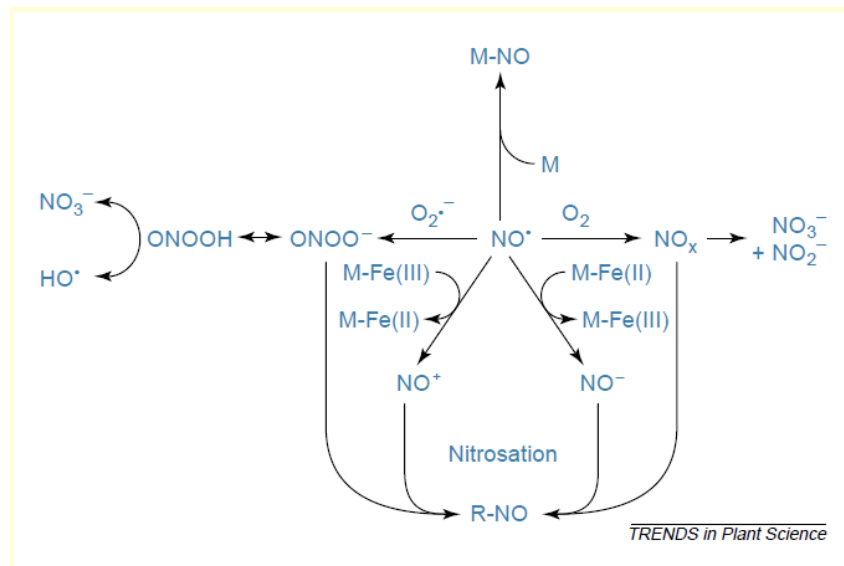
El NO es uno de los pocos compuestos estables que contienen un número impar de electrones, característica que lo convierte en una molécula altamente reactiva ya que puede ganar o perder un electrón para convertirse en un anión o catión.

La química del NO implica la interacción entre sus 3 formas redox: el radical óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), el catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ) y el anión nitrosilo ( $\text{NO}^-$ ) (Figura 2) (Wendehenne *et al.*, 2001).

Varios efectos del NO se encuentran asociados al daño oxidativo mediado por la reacción del NO con el  $\text{O}_2^-$  para formar el potente antioxidante peroxinitrito  $\text{ONOO}^-$ . El peroxinitrito puede protonarse bajo condiciones fisiológicas para formar el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) y éste a su vez descomponerse en radical hidroxilo y radical dióxido de nitrógeno. Estas moléculas químicamente derivadas del nitrógeno son las que se conocen como especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés).

Otros efectos están determinados por el ataque electrofílico del NO a grupos tioles, particularmente los de residuos de cisteína, que resultan en una nitrosilación del tripéptido glutatión (g-glutamyl-cisteinil-glicina) o de muy distintas proteínas. Adicionalmente, el NO puede modificar proteínas mediante la nitración, particularmente de los residuos de tirosina.

El NO puede asociarse a metales de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  para formar complejos hierro-nitrosil y de esta manera regular actividades biológicas.



**FIGURA 2.** Química del óxido nítrico en sistemas biológicos. Abreviaturas: M-NO=complejos hierro-nitrosil; M=proteínas que contienen hierro o el grupo hemo; M-Fe(II)/Fe(III)=metaloproteínas que contienen Fe(II)/Fe(III);  $\text{NO}_x=\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  y  $\text{N}_2\text{O}_4$ ; R-NO=proteínas nitrosiladas (tomado de Wendehenne *et al.*, 2001).

### c. Funciones fisiológicas

#### i. En animales

Desde su descubrimiento, el NO se ha visto involucrado en la regulación de un sinnúmero de funciones en las células animales. Sus efectos diversos han sido atribuidos a su habilidad para reaccionar químicamente con el O<sub>2</sub> (oxígeno molecular) y sus formas redox y con proteínas específicas que contienen hierro y radicales tiol.

Inicialmente este radical altamente reactivo fue identificado en animales como un potente vasodilatador endógeno (Schmidt and Walter, 1994) denominado factor relajante derivado del endotelio (FRDE). Pero a medida que las investigaciones han ido avanzando, se puede argumentar que virtualmente todas las células animales están bajo la influencia del NO.

Sus propiedades como efector multifuncional se ven reflejadas en su participación en una amplia variedad de procesos que se describen de forma resumida en la tabla 1.

**Tabla 1.** Funciones del NO en los tejidos animales.

TEJIDO	FUNCIÓN DEL NO
Vasos sanguíneos	FRDE, Antitrombótico , Protección Isquémica, Antiaterosclerótico, Relajación del músculo liso, Antiadhesivo, Migración y Proliferación
Corazón	Perfusión coronaria, Isquemia, Inotropía negativa
Pulmón	Perfusión/ventilación, Movilidad de los cilios bronquiales, Secreción de moco, Respuesta inmune
Riñón	Retroalimentación tubuloglomerular, Perfusión glomerular, Secreción de renina
Sistema Nervioso Central	Sinaptogénesis, Plasticidad sináptica, Formación de memoria, Flujo de sangre cerebral e isquemia, Secreción neuroendócrina, Transducción visual, Olfato
Páncreas	Secreción endócrina/exócrina
Intestinos	Flujo de sangre, Peristalsis, Secreción exócrina, Protección de la mucosa, Antimicrobiano
Sistema inmune	Antimicrobiano, Antitumor

## ii. En plantas

El NO es una molécula cuya producción ha sido descrita no solamente en animales sino también en plantas. Su habilidad para acumular y metabolizar el NO atmosférico, así como para producirlo, ha sido descrita por varios autores desde el siglo pasado (Klepper *et al.*, 1979; Nishimura *et al.*, 1986).

El NO participa en funciones fisiológicas de la planta tan importantes como el desarrollo y su respuesta frente al estrés. Las primeras observaciones acerca de una posible función del NO como molécula señalizadora en animales se dieron a finales de los años 80, pero en plantas no llegaron a describirse sino hasta 1998 (Delledone *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998).

Cabe destacar que en relación con dichas funciones, su papel señalizador tiene cierta similitud con el presentado en animales, haciendo de ésta molécula una clave maestra en gran parte de los seres vivos (Wendehenne *et al.*, 2001). A raíz de la identificación de ésta importante característica asociada al NO, se llevaron a cabo muchas investigaciones para desentrañar el mecanismo de esta señalización. Una recopilación de las funciones del NO en la fisiología de las plantas descritas por algunos autores se detalla en la tabla 2.

**Tabla 2.** Funciones del NO en plantas.

<b>FUNCIÓN</b>	<b>AUTORES</b>
<b>Regulación de la defensa de la planta</b>	Delledonne <i>et al.</i> (1998) Durner <i>et al.</i> (1998) Noritake <i>et al.</i> (1996)
<b>Simbiosis</b>	Denaire <i>et al.</i> (1992) Baudouin <i>et al.</i> (2006) Calcagno <i>et al.</i> (2012)
<b>Desarrollo de nódulos</b>	del Giudice <i>et al.</i> (2011)
<b>Desarrollo de raíz</b>	Correa-Aragunde <i>et al.</i> (2004, 2006, 2008) Fernandez-Marcos <i>et al.</i> (2011) Pagnussat <i>et al.</i> (2002, 2003, 2004)
<b>Apertura de estomas</b>	Hancock <i>et al.</i> (2011) Neill <i>et al.</i> (2002) Bright <i>et al.</i> (2006)
<b>Promoción de la respuesta de hipersensibilidad (HR)</b>	Palmieri <i>et al.</i> (2008)
<b>Germinación de semillas</b>	Beligni and Lamattina (2000) Giba <i>et al.</i> (1998)
<b>Regulación de la lignificación</b>	Ferrer <i>et al.</i> (1999)
<b>Inducción de la muerte celular programada</b>	Delledonne <i>et al.</i> (1998)



<b>Respuesta a estrés biótico</b>	Hong <i>et al.</i> (2008) Astier <i>et al.</i> (2012b) Yun <i>et al.</i> (2012)
<b>Respuesta a estrés abiótico</b>	Cantrel <i>et al.</i> (2011) Camejo <i>et al.</i> (2013)
<b>Desarrollo de flores</b>	Lee <i>et al.</i> (2008); Kwon <i>et al.</i> (2012)
<b>Floración</b>	He <i>et al.</i> (2004); Kwon <i>et al.</i> (2012)
<b>Dominancia apical</b>	Lee <i>et al.</i> (2008); Kwon <i>et al.</i> (2012)
<b>Diferenciación celular</b>	Lombardo <i>et al.</i> (2006)
<b>Formación de vesículas</b>	Lombardo and Lamattina (2012)
<b>Homeostasis</b>	Vanin <i>et al.</i> (2004); Graziano and Lamattina (2005)

### iii. En hongos

El rol señalizador del NO tanto en animales como en plantas ha sido respaldado por innumerables estudios, muchos de los cuales se mencionan en los párrafos anteriores. En cuanto a los hongos, las investigaciones acerca de la presencia y función del NO son escasas, si bien han ido aumentando en los últimos años principalmente en el contexto de las observaciones iniciales llevadas a cabo en hongos fitopatógenos en relación con sus posibles mecanismos de patogenicidad, en particular en sistemas en los que se puede apreciar que éstos han desarrollado estrategias de infección altamente eficaces en las que el NO parece estar implicado (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2014). Estas investigaciones muestran con claridad que el NO producido por varias especies de hongos, principalmente fitopatógenos, tiene un papel en la regulación de importantes funciones como el desarrollo, virulencia y supervivencia en la planta huésped (Tabla 3).

**Tabla 3.** Funciones del NO en hongos.

<b>FUNCIÓN</b>	<b>HONGO</b>	<b>AUTORES</b>
<b>Desarrollo</b>	<i>Botrytis cinerea</i>	Van Baarlen <i>et al.</i> (2004)
	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Wang and Higgins (2005)
	<i>Cryphonectria parasítica</i>	Gong <i>et al.</i> (2007)
	<i>Blumeria graminis</i>	Prats <i>et al.</i> (2008)
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Samalova <i>et al.</i> (2013)
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	Maier <i>et al.</i> (2001)
	<i>Neurospora crassa</i>	Ninnemann and Maier (1996)
	<i>Coniothyrium minitans</i>	Gong <i>et al.</i> (2007)
	<i>Drechslerella stenobrocha</i>	Xu <i>et al.</i> (2010)
	<i>Cryphonectria parasítica</i>	Gong <i>et al.</i> (2007)
	<i>Blastocladiella emersonii</i>	Vieira <i>et al.</i> (2009)
<b>Interacción planta-patógeno</b>	<i>Botrytis cinerea</i>	Conrath <i>et al.</i> (2004); Floryszak-Wieczorek <i>et al.</i> (2007); Turrión-

		Gómez and Benito (2011)
	<i>Blumeria graminis</i>	Prats <i>et al.</i> (2008)
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Samalova <i>et al.</i> (2013)
<b>Control del desarrollo sexual y asexual</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Baidya <i>et al.</i> (2011)
<b>Producción de micotoxinas</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Baidya <i>et al.</i> (2011)
<b>Formación de cuerpos fructíferos</b>	<i>Flammulina velutipes</i>	Song <i>et al.</i> (2000)
<b>Respuesta a estrés abiótico</b>	<i>Inonotus obliquus</i>	Zheng <i>et al.</i> (2011)
	<i>Pleurotus eryngii</i> var <i>tuoliensis</i>	Kong <i>et al.</i> (2012a, 2012b)

#### d. Mecanismos de producción de NO

El NO puede ser producido a través de diversos mecanismos. Se resumen éstos a continuación.

##### i. No enzimáticos

##### 1. Reducción de nitrito a óxido nítrico

Es un hecho ampliamente aceptado por la comunidad científica que el óxido nítrico se produce de manera enzimática exclusivamente en los tejidos vivos. Pero existen reportes de la generación no enzimática de NO bajo condiciones ácidas, mediante la reducción de nitrito a ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) y finalmente a óxido nítrico. Este caso se ha reportado al estudiar los efectos del NO en la función cardiaca, en donde en situaciones de isquemia miocárdica experimental se han observado valores de NO aumentados incluso cuando las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) han sido inhibidas (Tamargo *et al.*, 2006). Se ha observado además que la formación no enzimática de NO en situaciones de isquemia prolongada predomina cuando existe éste bloqueo (Zweier *et al.*, 1995).

En el reino vegetal también existen citas que describen este tipo de producción. Así, se ha descrito la progresión de este tipo de formación de NO exclusivamente bajo condiciones ácidas en el apoplasto de la aleurona de cebada (Bethke *et al.*, 2004).

## ii. Enzimáticos

Las rutas biosintéticas del NO se pueden clasificar de forma sencilla en dos categorías: de tipo reductiva o de tipo oxidativa. Existen otras rutas identificadas principalmente en plantas, de las cuales se tiene alguna evidencia experimental pero cuyas bases moleculares e incluso enzimáticas aún se desconoce (Gupta *et al.*, 2011a).

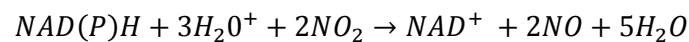
La ruta reductiva es la descrita para la enzima nitrato reductasa, fuente mejor caracterizada de producción de NO en plantas que no se encuentra en animales pero sí en hongos.

La ruta oxidativa es aquella catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa, sistema identificado exclusivamente en animales debido a que hasta el momento no se han encontrado enzimas similares en función y estructura en plantas y en hongos.

A continuación se describe de forma resumida cada ruta.

### 1. Sistema dependiente de la enzima nitrato reductasa (NR)

Este sistema se encuentra localizado en el citosol y cataliza la reducción del nitrato a nitrito utilizando el NADH como el donador de electrones (Yamasaki and Sakiyama, 2000). Seguidamente la nitrato reductasa cataliza la reducción del nitrito a NO mediante la reacción:



De forma general, para que ésta reacción se lleve a cabo se requieren altas concentraciones de nitrito y relativamente bajas concentraciones de nitrato, lo que supone que la producción de NO necesita de una acumulación de nitrito; además de un descenso en el pH del medio celular.

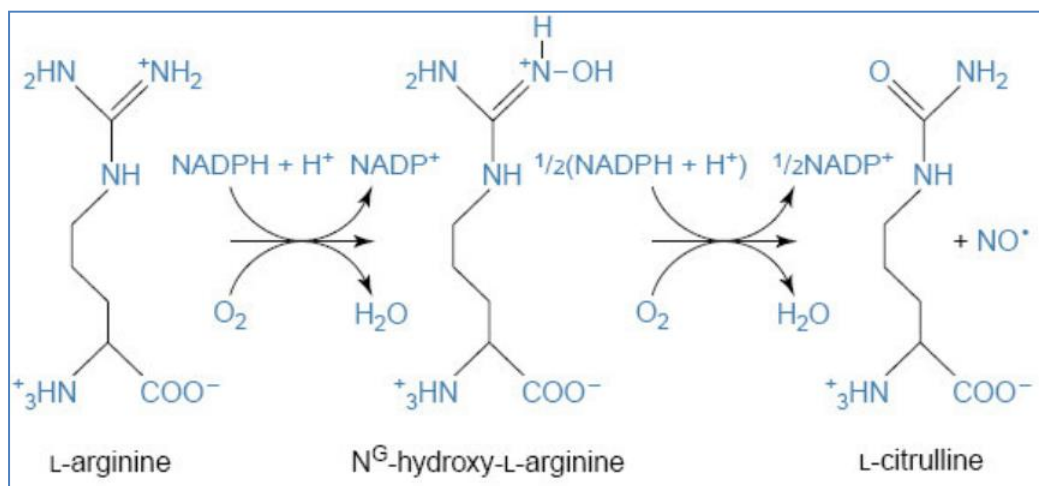
A pesar de ser un sistema enzimático *in vivo* importante en plantas, en condiciones normales de crecimiento solamente constituye el 1% de la capacidad reductora del nitrato (Rockel *et al.*, 2002).

En todos los genomas de hongos filamentosos de los que se disponen en la actualidad se han encontrado genes que codifican para enzimas nitrato reductasa, aunque su papel en la producción de NO aún no está del todo claro (Samalova *et al.*, 2012).

## 2. Sistema dependiente de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS)

En mamíferos, la biosíntesis del NO está catalizada por la enzima NOS. De ella se han identificado 3 isoformas que han tomado su nombre en función del tejido de donde fueron originalmente extraídas: la NOS neuronal (nNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible en macrófagos (iNOS) (Nathan and Xie, 1994). Estudios posteriores identificaron la existencia de una cuarta isoforma hallada en la mitocondria: mtNOS, muy similar a iNOS (Tatoyan and Giulivi, 1998). Las dos primeras provienen de genes con expresión constitutiva y, como su nombre lo indica, la tercera proviene de un gen cuya expresión es inducible en macrófagos y en otros tipos celulares en respuesta a agentes inflamatorios y a citoquinas. La nNOS la encontramos en tejido nervioso y músculo esquelético y participa principalmente en procesos de comunicación celular. La eNOS se encuentra confinada al endotelio y se encarga de la vasodilatación (FRDE, mencionado en el apartado 2.c.i).

Todas las NOS son homodímeros activos que catalizan la oxidación dependiente de NADPH de la L-arginina a L-citrulina y NO (Moncada *et al.*, 1991) (Figura 3). La actividad de las NOS constitutivas está estrictamente ligada a la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en contraste, la actividad de la iNOS es independiente de este elemento químico.



**FIGURA 3.** Reacción enzimática de conversión de la L-Arginina a NO y citrulina mediada por la enzima NOS.

Las 3 isoformas de la NOS poseen dos dominios funcionales fusionados en un solo polipéptido. El dominio oxigenasa N-terminal se une tanto al grupo prostético hemo como al cofactor redox tetrahidrobioterina (H<sub>4</sub>B). El dominio C-terminal reductasa tiene los sitios de unión para la flavina mononucleótido (FMN), la flavina dinucleótido (FAD) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Cabe destacar la similitud en la arquitectura de la NOS con aquella descrita para el citocromo P450BM3 (Li and Poulos, 2005).

En plantas no se ha podido identificar hasta el momento un gen que codifique una enzima estructuralmente parecida a la NOS de mamíferos a pesar de la gran cantidad de genomas de plantas completos de los que se dispone actualmente. Guo *et al.* (2003) anunciaron la identificación de una enzima tipo NOS en *Arabidopsis*, *AtNOS1*; pero unos años más tarde, Moreau *et al.* (2008) determinaron que ésta enzima no estaba directamente involucrada en la producción de NO y que se trata más bien de una enzima GTPasa cíclica asociada a éste proceso. Por este descubrimiento *AtNOS1* fue rebautizada como *AtNOA1* (Nitric Oxide Associated1) (Zemojtel *et al.*, 2006).

Existen evidencias experimentales de que, a pesar de la presunta ausencia de una enzima tipo NOS, debe existir algún mecanismo de producción de NO y citrulina a partir de la L-Arginina en plantas. Respaldando esta teoría, se ha observado una disminución en la producción de NO mediante el uso de inhibidores de la NOS de animales (Durner *et al.*, 1998; Delledonne *et al.*, 2001, Corpas *et al.*, 2006).

Además, se ha acumulado evidencia indirecta de la generación de NO dependiente de L-Arginina, particularmente de peroxisomas y plastidios (Corpas *et al.*, 2004, 2009; Gas *et al.*, 2009).

En hongos, mediante la aplicación de técnicas bioinformáticas se ha determinado la existencia de una enzima tipo NOS similar a la de mamíferos en especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae* y *A. niger*) y en *Glomerella graminicola* (Turrión-Gómez and Benito, 2011).

Cabe mencionar la existencia de una enzima tipo NOS en bacterias: bNOS. Se distingue de la de mamíferos porque la enzima bacteriana no posee el dominio C-terminal flavoproteína reductasa, hecho que ha puesto en duda la habilidad de las bacterias para producir NO aunque algunos autores como Johnson *et al.* (2008) han descrito la producción de NO por ésta enzima en bacterias del género *Streptomyces*.

#### e. NO y estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente, el NO se puede combinar con el radical superóxido para formar el compuesto estable peroxinitrito. Cuando esto ocurre disminuye su biodisponibilidad para realizar las numerosas funciones que desempeña. Además, el peroxinitrito contribuye a la inactivación de diferentes proteínas, entre las que se encuentra la enzima mitocondrial Mn-SOD (Van der Loo B. *et al.*, 2000), que como mencionaremos más adelante, tiene un papel clave en la protección contra el estrés oxidativo. Cabe mencionar que se cree que varios efectos fisiológicos del NO, como la apoptosis en animales, son mediados por el peroxinitrito (Stamler, 1994).

El radical superóxido forma parte de un grupo de radicales libres derivados de oxígeno denominados RLO (Reactive Oxygen Species, ROS, por sus siglas en inglés), que inactivan de forma rápida el NO. Así, una de las principales causas de la atenuación en la respuesta vasodilatadora presente en el envejecimiento se debe al mayor estrés oxidativo que acompaña a este proceso (Mingorance *et al.*, 2009). Las diferentes isoenzimas de la enzima superóxido

dismutasa (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y SOD-EC), preservan el equilibrio entre la producción de NO y de  $O_2^-$ .

Enzimas como la xantina oxidasa y la nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, y la cadena respiratoria son algunas de las fuentes identificadas por algunos autores como responsables de la producción de  $O_2^-$  durante el envejecimiento (Brandes RP *et al.*, 2005; Newaz *et al.*, 2006).

La acción perjudicial del radical peroxinitrito asociada al envejecimiento no sólo reside en la inactivación de la enzima Mn-SOD. También puede actuar sobre toda proteína susceptible de experimentar la nitrosilación de sus residuos de tirosina y cisteína. Así, por ejemplo, a mayor concentración de este radical, existe una mayor alteración de la actividad de la arginasa I, isoenzima responsable de la degradación de la L-arginina, sustrato de la enzima eNOS para producir NO (Santhanam *et al.*, 2007).

Cabe destacar la complicada relación que existe entre la actividad de la arginasa I y la producción de NO, dado que de forma contraria a la descrita anteriormente, una concentración elevada de NO procedente de la enzima NOS es capaz de activar la arginasa I por la nitrosilación de residuos de cisteína (Santhanam *et al.*, 2007).

La relación del NO y las ROS, como moléculas mediadoras de estrés oxidativo en plantas es un tema ampliamente estudiado y muy complejo. El NO en las plantas puede actuar conjuntamente con las ROS como un agente tóxico y dañino pero también puede suprimir los efectos tóxicos de las ROS. Un ejemplo claro de esta aseveración se ve representada en la activación de la respuesta de defensa de la planta, donde la inducción de la muerte celular es resultado de la acción sinérgica del NO y de las ROS.

#### f. NO y estrés nitrosativo

El estrés nitrosativo se define como un estado caracterizado por niveles altamente tóxicos de RNS provocado por una sobreproducción de NO como resultado de la acumulación del NO producido por parte de la planta como un mecanismo de defensa ante el ataque del patógeno, y de las moléculas derivadas del NO. Dichas moléculas son principalmente las 3 isoformas del NO mencionadas anteriormente: el radical óxido nítrico, el catión nitrosonio y el anión nitrosilo.

Los hongos patógenos son relativamente resistentes a este tipo de estrés y existen autores que proponen que su habilidad para combatir los mecanismos de defensa del huésped evolucionó debido a la interacción de los hongos con las amebas fagocíticas (Steebergen *et al.*, 2001).

La exposición continuada de los patógenos a estos niveles elevados de RNS, les ha llevado a desarrollar múltiples estrategias para detoxificar dichas moléculas, superar esa barrera y así conseguir su objetivo: colonizar al huésped.

Una de las estrategias más eficientes implicadas en la resistencia al estrés nitrosativo desarrollada tanto por bacterias como por hongos es el sistema basado en enzimas de tipo flavohemoglobina. Esta enzima es la encargada de metabolizar el NO y su actividad ha sido descrita en una serie de microorganismos como en la levadura *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2000) y en los hongos *Candida albicans* (Ullmann *et al.*, 2004), *Cryptococcus neoformans* (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003), *A. oryzae* (Zhou *et al.*, 2011), *A. nidulans* (Zhou *et al.*, 2012) y *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). En apartados posteriores se describirán los detalles acerca de la flavohemoglobina en *B. cinerea* y sus implicaciones en los mecanismos de supervivencia de este hongo necrótrofo.

Existe evidencia de que las flavohemoglobinas protegen contra estrés nitrosativo derivado tanto de fuentes endógenas como exógenas en varios hongos patógenos (Jesús-Berrios *et al.*, 2003; Ullmann *et al.*, 2004; Cassanova *et al.*, 2005), pero además se describen otros mecanismos de protección de tipo antioxidante, como el empleado por las levaduras, para contrarrestar los efectos del estrés nitrosativo que incluyen la s-nitrosoglutation peroxidasa (GSNOR), las metaloporfirinas y la trehalosa (Tillman *et al.*, 2011).

### 3. NO en la interacción planta-patógeno

Las plantas y los patógenos están en una constante lucha por la supervivencia, el segundo por colonizar y el primero por no ser colonizado. Aquel que cumpla con mayor rapidez su objetivo es el que gana la batalla. En animales y en plantas el NO tiene un papel central como molécula señalizadora en numerosos procesos fisiológicos, pero es en la respuesta de la planta a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico en donde los estudios se han centrado en las últimas dos décadas (Arasimowicz *et al.*, 2014).

En el contexto de las interacciones planta-patógeno el NO actúa de una manera curiosa: puede favorecer tanto a la planta como al patógeno. Yamasaki (2005) plantea que el papel dual del NO en la interacción planta-patógeno puede derivarse de la forma que han desarrollado los patógenos para tolerar e incluso incorporar en su metabolismo al NO, molécula tóxica producida por las plantas como parte de su arsenal de defensa. Se conoce que la acumulación de NO y de ROS, principalmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), activa la muerte celular programada de la planta que culmina con la Respuesta de Hipersensibilidad (HR) (Delledonne *et al.*, 1998). Este sistema de señalización induce no sólo la muerte celular localizada, sino además la activación de genes de defensa y el establecimiento de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Durner *et al.*, 1998).

No sólo las ROS están involucradas en la interacción planta-patógeno, también las RNS toman parte en esta batalla. Los patógenos han sido capaces de regular de manera precisa el balance entre el NO y las RNS como consecuencia de su adaptación al medio hostil que le presenta la planta cuando se ve atacada. Cabe destacar que los patógenos no solo han desarrollado mecanismos para utilizar el NO como parte de la modulación del sistema inmune de la planta sino que además puede que esté involucrado en virulencia (Arasimowicz *et al.*, 2014).

En relación con los patógenos, debemos reflexionar sobre el hecho de que el tipo de ciclo de vida de cada patógeno en particular constituye un aspecto de suma importancia en el entendimiento de los mecanismos inherentes a su interacción con la planta, y que éste condiciona de manera fundamental el posible resultado de la interacción. La mayoría de los estudios sobre los mecanismos moleculares del establecimiento de la interacción entre la planta y el patógeno, centrados clásicamente en la caracterización de los mecanismos que participan en la respuesta de defensa de la planta, se han llevado a cabo en interacciones en las que participan patógenos biotrofos. En estos sistemas, el reconocimiento por parte de la planta de un patógeno avirulento desencadena la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno, y de óxido nítrico, para culminar en la respuesta de hipersensibilidad que determina la activación de la muerte celular programada de las células del huésped que entran en contacto con el patógeno. Dada su dependencia de células vivas para hacer posible el progreso del patógeno y la invasión de los tejidos adyacentes, la muerte celular programada y la respuesta de hipersensibilidad constituyen un mecanismo de defensa eficaz frente a este tipo de patógenos biotrofos.



Como hemos indicado anteriormente, en la activación de la muerte celular programada y de la respuesta de hipersensibilidad participan tanto las ROS como las RNS. Es más, la activación de estos procesos depende de la modulación fina en el tiempo y en el espacio de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de NO (Delledonne *et al.*, 1998; Delledonne *et al.*, 2001). La producción de ROS y NO en las células y tejidos que el patógeno trata de colonizar determinan, además, unas condiciones de estrés oxidativo y de estrés nitrosativo que generan un ambiente ciertamente hostil para el patógeno que contribuyen a limitar su desarrollo.

Estos mecanismos basados en la activación de los mecanismos de defensa de la planta y en la toxicidad frente a los microorganismos patógenos de las ROS y de las RNS, efectivos frente a patógenos biótrofos, tienen una utilidad limitada frente a patógenos necrótrofos, que colonizan eficientemente tejidos muertos o senescentes. Este es el caso de *B. cinerea*, patógeno en el que las evidencias experimentales acumuladas en los últimos años sugieren que incluso es capaz de modular y de explotar la respuesta de hipersensibilidad de la planta en su propio beneficio para facilitar la infección y colonización de los tejidos atacados (Govrin and Levine, 2000). Numerosas observaciones llevadas a cabo en los últimos años indican claramente que existen diferencias mecanísticas muy importantes en entre patógenos biótrofos y necrótrofos. En la actualidad es un campo de intensa actividad investigadora el de la determinación de las diferencias en los mecanismos de patogenicidad de patógenos biótrofos y necrótrofos y el estudio de las diferencias en las respuestas y mecanismos de defensa que unos y otros activan en la planta.

#### 4. La detoxificación de NO por microorganismos: función de la enzima flavohemoglobina

El hecho de que los microorganismos puedan sobrevivir en condiciones de estrés nitrosativo supone que éstos deben disponer de mecanismos de detoxificación del NO. Efectivamente, los microorganismos han desarrollado mecanismos tanto constitutivos como inducibles que le permiten combatir los efectos adversos del NO. Entre los mecanismos inducibles destaca la detoxificación llevada a cabo por las enzimas de tipo flavohemoglobina. Estas enzimas fueron descritas inicialmente en *E. coli* y posteriormente en numerosas especies bacterianas y en hongos. Son globinas quiméricas con un dominio globina N-terminal y un dominio redox adyacente próximo al extremo carboxilo, las cuales presentan actividad NO dioxigenasa y requieren NADPH, FAD y O<sub>2</sub> para producir NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Hausladen *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 1998). En *E. coli* la flavohemoglobina detoxifica NO y confiere protección frente a condiciones de estrés nitrosativo (Gardner *et al.*, 1998). En *Salmonella typhimurium* la eliminación del gen codificador de la flavohemoglobina determina hipersensibilidad frente a estrés nitrosativo (Crawford and Goldberg, 1998). Es interesante destacar que este efecto protector ha sido descrito también en la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysantemy*. En este sistema, la eliminación del gen codificador de la enzima flavohemoglobina genera mutantes incapaces de infectar a la planta huésped (Boccaro *et al.*, 2005). En apartados anteriores hemos mencionado el papel protector de las flavohemoglobinas frente a estrés nitrosativo en hongos, concretamente en las levaduras *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2000) y *C. albicans* (Ullmann *et al.*, 2004) y en el hongo patógeno humano *C. neoformans* (de Jesús-Berrios *et al.*, 2003). Tanto en la levadura patógena de humanos, *C. albicans*, como en *C. neoformans*, la eliminación de la flavohemoglobina determina una reducción de la virulencia.

Estos antecedentes descritos en distintos tipos de microorganismos, incluidos microorganismos patógenos de humanos y de plantas, motivaron nuestro interés por estudiar en *B. cinerea* los mecanismos de detoxificación del NO en general y del papel de la enzima flavohemoglobina entre estos en particular. Como necrótrofo que es, *B. cinerea* es capaz de desarrollarse en presencia de las condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo que la activación de la respuesta de hipersensibilidad impone, lo que implica que el patógeno debe disponer de mecanismos que le permitan limitar los efectos tóxicos de este tipo de sustancias durante su desarrollo. Es posible asumir en este contexto que cualquier mecanismo que contribuya a detoxificar las formas reactivas de oxígeno y las formas reactivas de nitrógeno con las que el patógeno pueda encontrarse le conferirán una ventaja durante el establecimiento de la interacción, pudiendo ser considerado el sistema correspondiente como un factor de patogenicidad.

Numerosos estudios han permitido demostrar que *B. cinerea* dispone de varios sistemas enzimáticos que contribuyen a proteger al patógeno frente a los efectos tóxicos de las formas activas de oxígeno, y en los mismos se ha tratado de determinar el papel de distintos componentes de estos sistemas en la fisiología del patógeno tanto durante el crecimiento saprofítico como durante su interacción con la planta (Lyon *et al.*, 2004). Los trabajos en relación a la existencia de mecanismos implicados en la detoxificación de las

formas activas de nitrógeno son mucho más reducidos, limitándose a los trabajos llevados a cabo en los últimos años por nuestro grupo de investigación centrados en la caracterización del sistema basado en una enzima de tipo flavohemoglobina (Turrión-Gómez *et al.*, 2010; Turrión-Gómez and Benito, 2011).

## 5. La Flavohemoglobina en *B. cinerea*

En *B. cinerea*, el gen *Bcfhg1* es el único gen codificador de enzimas de tipo flavohemoglobina identificado en su genoma. Se trata, por lo tanto, de un gen de copia única. Éste cuenta con 1239 nucleótidos y no posee intrones. La proteína deducida tiene 412 aminoácidos y presenta 3 dominios funcionales: un dominio globina, un dominio oxidoreductasa de unión a FAD y un dominio oxidoreductasa de unión a NAD. Estos 3 dominios son los responsables de la actividad dioxigenasa que determina la detoxificación del NO.

La flavohemoglobina BCFHG1 constituye el principal, si no el único, mecanismo detoxificador de NO exógeno de *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010), como demuestra el hecho de que los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  sean incapaces completamente de detoxificar NO. Es un sistema de detoxificación muy eficiente basado en una enzima con una alta afinidad por el NO (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). La expresión de *Bcfhg1* es inducible por NO exógeno, respondiendo a concentraciones fisiológicas de NO, y muestra un patrón de expresión *in planta* que puede conferir ventajas adaptativas a un patógeno necrótrofo para su crecimiento durante la interacción con el huésped. Sin embargo, y a pesar de conferir protección frente a condiciones, BCFHG1 no puede ser considerada como un factor de patogenicidad de *B. cinerea*, ya que los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  no presentan alteraciones en su capacidad para infectar a la planta huésped (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

El hecho de que los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  no muestren una reducción en su capacidad de infección, aún siendo deficientes en el principal sistema responsable de la detoxificación de NO en *B. cinerea*, sugiere que el hongo en realidad, y contrariamente a lo considerado en un principio, no experimenta una situación de estrés nitrosativo notable *in planta*. Turrión-Gómez *et al.* (2010) proponen que las funciones fisiológicas en las que BCFHG1 puede participar probablemente estén más relacionadas con la regulación de los niveles de NO endógeno que el patógeno pueda producir en fases concretas del ciclo de desarrollo del hongo. En este sentido apuntan las observaciones derivadas del estudio de su patrón de expresión durante el desarrollo saprofito. El gen *Bcfhg1* no se expresa en absoluto 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). En el análisis de la participación del NO y de la enzima BCFHG1 en el proceso de germinación en *B. cinerea* trabaja activamente nuestro grupo de investigación en la actualidad y los trabajos en curso en este contexto en buena parte constituyen el trabajo experimental de esta tesis doctoral.

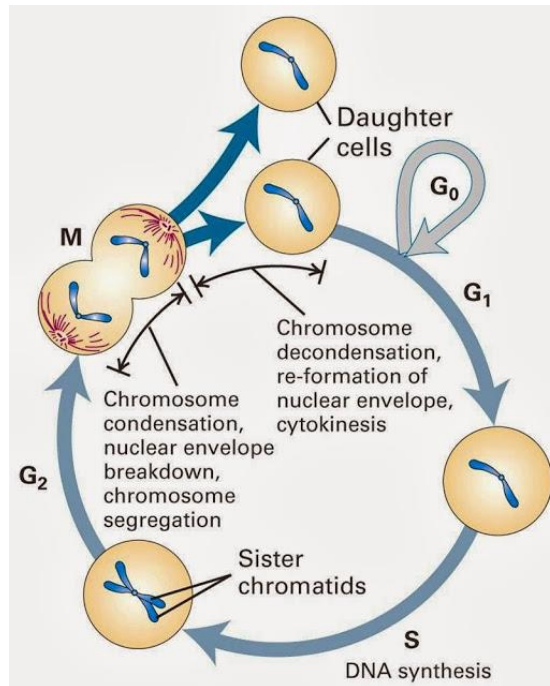
El hecho de que BCFHG1 pueda participar en la modulación de los niveles de NO endógeno supone que *B. cinerea* puede producir NO por sí mismo. Es esta una observación clave derivada en buena medida de trabajos previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación (Turrión-Gómez and Benito, 2011). En el curso de los mismos ha sido posible demostrar que *B. cinerea* produce, efectivamente, NO, que lo hace tanto en la fase de esporas en germinación como en la fase de desarrollo de micelio, y que este NO producido por el hongo difunde al medio circundante (Turrión-Gómez and Benito, 2011). Esta producción de NO

por parte del hongo puede tener importantes implicaciones funcionales, ya que se trata de una producción regulada que depende en buena medida del huésped en particular y del estado de desarrollo de la infección. La producción de NO por *B. cinerea* es, además, estimulada por la adición de NO exógeno, pero sólo durante la fase de micelio en crecimiento, no durante las distintas etapas de desarrollo de las esporas, desde su activación y hasta la producción de micelio joven a partir de esporas germinadas (Turrión-Gómez and Benito, 2011). Esto supone que la sensibilidad de *B. cinerea* a NO exógeno depende también del estado de desarrollo, una cuestión de enorme interés teórico y práctico. Estas observaciones llevaron a sugerir 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 huésped y que la producción de NO por parte del patógeno es probablemente modulada por el propio patógeno para regular y facilitar su infección de los tejidos del huésped (Turrión-Gómez and Benito, 2011). El estudio de los mecanismos de producción de NO por parte de *B. cinerea* y de los efectos fisiológicos que este NO puede tener constituyen también objetivos del presente trabajo de tesis doctoral.

## 6. Ciclo celular en eucariotas

### a. Descripción general

Las células se dividen mediante la duplicación de sus cromosomas y la segregación de una copia de cada cromosoma duplicado, a cada célula hija (Figura 4).



**FIGURA 4.** El destino de un cromosoma parental está descrito a lo largo del ciclo celular. Después de la mitosis (M), las células hijas (daughter cells) contienen  $2n$  cromosomas en organismos diploides y  $1n$  cromosomas en organismos haploides. En células que se dividen continuamente (como las epiteliales)  $G_1$  es el periodo entre el nacimiento de una célula mediante mitosis y el inicio de la síntesis de ADN (S). Las células que raramente se dividen, como las neuronas, salen del ciclo celular en la fase  $G_1$ , entrando en un estado denominado  $G_0$ . Al finalizar la fase S las células contienen el doble del número de cromosomas que en  $G_1$  ( $4n$  en organismos diploides) y de ésta manera ingresan en  $G_2$ . El final de esta fase corresponde con el inicio de la mitosis, donde ocurre la división celular propiamente dicha (Tomado de Lodish *et al.*, 1995).

En células eucariotas, la duplicación del ADN está restringida a la fase S (síntesis) del ciclo celular, fase que está flanqueada por los periodos  $G_1$  y  $G_2$ . Colectivamente las 3 toman el nombre de interfase. Después del periodo  $G_2$  las células comienzan el complicado proceso de Mitosis, o conocida también como fase M. En ella, los cromosomas se condensan durante la profase. Las cromátidas hermanas, producidas por la duplicación del ADN durante la fase S, permanecen unidas por el centrómero y en varios puntos a lo largo de su longitud. Durante la anafase, las cromátidas se separan a polos opuestos del huso mitótico, segregando una de las

dos cromátidas hermanas a cada célula hija. En la mayoría de las células eucariotas, la membrana nuclear se rompe en múltiples vesículas pequeñas en los primeros estadios de la mitosis y se reconstituye alrededor de los cromosomas segregados, mientras ellos se desenrollan al final de la mitosis.

El Aparato de Golgi y el retículo endoplasmático también forman vesículas durante la mitosis y vuelven a su estado original en las dos células hijas después de la división celular.

En levaduras y hongos, la membrana nuclear no se rompe. En estos organismos, el huso mitótico se forma dentro de la membrana nuclear, luego se despega y forma dos núcleos al mismo tiempo en que ocurre la citocinesis (proceso físico de división celular).

### b. Regulación del ciclo celular

La regulación de la división celular es crítica para el normal desarrollo de organismos pluricelulares. Al final de los años 1980 se llegó a la conclusión de que los procesos que regulan la replicación de los cromosomas y la división celular son fundamentalmente los mismos en todas las células eucariotas, por lo que el conocimiento generado en relación a este tema a partir del estudio en organismos modelos como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Grallert *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 1995) es de gran ayuda para organismos como *B. cinerea*, de los cuales hay poco o nada descrito. En mamíferos, los estudios se han llevado a cabo principalmente en la rana *Xenopus laevis*, en donde la fertilización *in vitro* de huevos ha permitido obtener extractos para analizar proteínas y actividades enzimáticas que ocurren en puntos específicos del ciclo celular (Masui and Markert, 1971, Gerhart *et al.*, 1984, Swenson *et al.*, 1986).

Los estudios llevados a cabo en los microorganismos previamente mencionados, han revelado que el ciclo celular está principalmente controlado por la regulación del ritmo de dos eventos críticos: el inicio de la síntesis del ADN y el inicio de la mitosis.

Ambos eventos están regulados por proteínas quinasas heterodiméricas compuestas de una subunidad catalítica y una reguladora, que le confieren especificidad de sustrato. Las subunidades reguladoras son llamadas ciclinas (Evans *et al.*, 1983) debido a que su concentración es cíclica y va de acuerdo a las distintas fases del ciclo celular: alcanza picos de concentración durante fases específicas del ciclo en las cuales ellas participan y luego son rápidamente degradadas previa la entrada de la célula a la siguiente fase.

La actividad proteína quinasa de las subunidades catalíticas dependen de su asociación con una ciclina, dándoles el nombre de ciclinas dependientes de quinasas o CDKs (siglas en inglés, cyclin-dependent kinase). Las CDKs son proteínas quinasas de Ser/Thr. Cuando se activan, los heterodímeros Cdk-ciclinas fosforilan múltiples proteínas, activando algunas e inhibiendo otras, para controlar los varios eventos moleculares asociados con la duplicación del ADN y la mitosis. A su vez, la actividad de las Cdk-ciclinas está regulada por otras proteínas quinasas y fosfatasas cuyo papel es indispensable para asegurar que el ADN se replique una sola vez por ciclo, que cada célula hija contenga una copia completa del genoma y que la célula

entre en mitosis únicamente cuando el ADN se ha sintetizado correctamente y si es el caso, los errores encontrados hayan sido reparados.

Tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae*, el principal control de la síntesis de ADN se denomina START (Hartwell *et al.*, 1974; Reed and Wittenberg, 1990). En mamíferos éste se denomina punto de restricción (restriction point, en inglés) (Pardee, 1974). Los complejos de ciclinas G<sub>1</sub> y Cdk activan factores de transcripción presentes en la célula, los cuales a su vez estimulan la transcripción de una batería de genes que codifican para enzimas requeridas en la duplicación del ADN y la síntesis de desoxinucleótidos.

Como se ha mencionado anteriormente, las células entran en el periodo G<sub>2</sub> después de completar la duplicación del ADN. La siguiente etapa en el ciclo es la mitosis, cuya entrada por parte de las células depende de la activación del factor promotor de la mitosis (MPF, por sus siglas en inglés, Mitosis-Promoting Factor) (Masui and Clarke, 1979). Su subunidad catalítica es también una Cdk que fue originalmente identificada en mutantes de *S. pombe* denominada *cdc2* aunque de forma general se la llama Cdc2 (cell división cycle, siglas en inglés) (Nurse and Bissett, 1981; Beach *et al.*, 1982). La subunidad reguladora del MPF es una ciclina B, aunque existe evidencia de que la ciclina A también promueve la entrada en mitosis.

En *S. pombe* y en *S. cerevisiae* una sola CDK, Cdc2 y Cdk1, respectivamente, desencadenan tanto la transición G<sub>1</sub> – S y como la transición G<sub>2</sub> – M. En mamíferos la situación es distinta, en ellos existe una pequeña familia de CDKs relacionada para regular la progresión de las células a través del ciclo celular. Estas han sido nombradas en el orden en que fueron descubiertas: Cdk1, 2, 3 y 4.

### i. Procesos y targets controlados por Cdk1

Para que las células se desarrollen con normalidad es esencial que el ciclo celular ocurra en una sola dirección. La transgresión del movimiento unidireccional del mismo puede tener consecuencias devastadoras para la célula, incluyendo la inestabilidad del genoma (Enserink and Kolodner, 2010). Por esta razón, las células han desarrollado mecanismos para asegurar que el ciclo celular sea un proceso irreversible. Uno de los principales mecanismos utilizados con este objeto es la regulación de distintos programas transcripcionales durante las diferentes fases del ciclo celular. Normalmente, cada programa transcripcional se encarga de la expresión de sets de proteínas que llevan a cabo procesos importantes para la siguiente etapa del ciclo celular, lo que promueve la progresión del ciclo celular en una sola dirección (Enserink and Kolodner, 2010).

La regulación de los programas transcripcionales es extremadamente compleja por lo que nos centraremos en los aspectos relacionados con Cdk1, dado que se ha descrito que ésta es necesaria y suficiente para dirigir el ciclo celular en *S. cerevisiae* y su descripción, al tratarse de un organismo modelo, nos da un panorama general aplicable a la situación en otros organismos.



La activación de la transcripción en la fase G1 está supeditada a la actividad del complejo formado por la ciclina Cln3 y Cdk1 (Cln3-Cdk1) (Tyers *et al.*, 1993); aunque en ausencia de Cln3 pueden intervenir las ciclinas Cln1 o Cln2 (Cross and Tinkelenberg, 1991). Aproximadamente 200 genes se expresan durante la fase G1 y a todos ellos en conjunto se los conoce como “G1 cluster” (Spellman *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2001). Existen dos complejos que median la expresión del “G1 cluster”: el complejo MBF (Mlu1-box binding factor) formado por Mbp1 y Swi6, y el complejo SBF formado por Swi4 y Swi6. Aunque como podemos observar, existe solapamiento entre los genes que son controlados por los complejos MBF y SBF (como en el caso de Swi6), al parecer MBF induce la transcripción principalmente de genes involucrados en control o ejecución de la replicación de ADN y reparación (*POL2*, *CDC2*, *RNR1*, *CLB5* y *CLB6*) mientras que SBF regula la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, morfogénesis y la duplicación de huso acromático (*CLN1*, *CLN2*, *PCL1*, *PCL2*, *GIN4*, *FKS1* y *FKS2*) (Wittenberg and Reed, 2005). El complejo Cln3-Cdk1 depende del gen Swi6, el cual es controlado tanto por MBF como por SBF, lo que en un inicio parecía sugerir que Cdk1 controla ambos complejos y que posteriormente se confirmó.

En el inicio de G1, el complejo SBF permanece inactivo por la acción de Whi5 (Costanzo *et al.*, 2004). Este último también se encarga de reclutar a las histonas deacetilasas Hos3 y Rpd3 que contribuyen posteriormente a la represión de la transcripción de genes de la fase G1 (Huang *et al.*, 2009; Takahata *et al.*, 2009). Para que la célula entre en el ciclo celular se requiere la fosforilación de Whi5 por acción de Cdk1 y Pho85. Como consecuencia se produce la disociación del complejo SBF-Whi5-Hos3/Rpd3 y de esta manera SBF activa los genes que se encuentran a su cargo, los cuales fueron mencionados anteriormente (Takahata *et al.*, 2009).

Varios mecanismos han sido descritos en cuanto a la desactivación de los programas transcripcionales de G1 mientras la célula entra en la fase S. Los complejos ciclinas-Cdk1 pueden actuar directamente en los complejos SBF y MBF para “desconectar” dichos programas. El represor Nrm1 ha sido propuesto como el principal responsable de la desactivación de los programas transcripcionales de G1 al unirse e inhibir al complejo MBF y permitir la entrada de la célula en la fase S (de Bruin *et al.*, 2006).

En investigaciones recientes se ha descubierto que un grupo de aproximadamente 180 genes se induce durante el final de la fase S, la mitad de los cuales están relacionados con la organización de los cromosomas y el huso acromático, pero además, este grupo contiene genes que codifican factores de transcripción como *FKH1*, *FKH2* y *NDD1*, importantes en etapas posteriores del ciclo celular. Este grupo se denomina “Hcm1 cluster” debido que se está controlado por el factor de transcripción Hcm1 y su expresión está regulada durante la progresión del ciclo celular y presenta un pico de expresión al final de la fase G1 (Pramila *et al.*, 2006).

Desde el final de la fase S hasta la división nuclear en la fase M se expresan 35 genes, entre los cuales podemos mencionar a *CDC20*, *SWI5* y *ACE2*, denominados como “CLB2 cluster” porque se expresan de manera similar a *CLB2* (Wittenberg and Reed, 2005). Este cluster está controlado por el factor de transcripción SFF (SWI Five Factor).

Entre la fase M y la fase G1 se expresan 4 grupos de genes: el “MCM Cluster”, el “*SIC1* cluster”, el “MAT cluster” y el “PHO regulon” (Chot *et al.*, 2001; Spellman *et al.*, 1998). La

expresión del “MCM cluster” (que incluye los genes *MCM2-7*, *CDC6*, *SWI4* y *CLN3*) está controlada por factor de transcripción Mcm1, involucrado también en la expresión del “*CLB2* cluster”. La expresión del “*SIC1* cluster” está controlada por los factores de transcripción Swi5 y Ace2. El “MAT Cluster” incluye un grupo de genes que generalmente están relacionados con “mating feromone” pero que también se expresan en cierto grado durante la transición M-G1 aún en ausencia de feromonas. El cuarto grupo de genes, el “PHO regulon” es también conocido como el límite M-G1 (Chot *et al.*, 2001; Spellman *et al.*, 1998) e incluye genes involucrados en el secuestro y transporte de fosfato (Lenburg and O’Shea, 1996).

Como podemos observar a grandes pinceladas, Cdk1 regula muchos aspectos de la transcripción a lo largo del ciclo celular, pero es importante mencionar que existe evidencia de que existen programas transcripcionales que se ejecutan independientemente de Cdk1 (Haase and Reed, 1999). Se ha reportado que alrededor del 70% de los genes continúan expresándose periódicamente y al tiempo correcto (Orlando *et al.*, 2008).

### c. Mecanismos de parada de ciclo celular por daños en el ADN

Las células están bajo el ataque constante de agentes que dañan el ADN y que pueden interferir con la transmisión verídica de la información genética durante el proceso de división celular. La reparación de los daños causados al ADN llevan su tiempo, por lo que es importante que exista una parada o retraso en el ciclo celular para que dichas reparaciones puedan llevarse a cabo. Los mecanismos identificados en el proceso de parada de ciclo celular (Hartwell y Weinert, 1989; Sancar *et al.*, 2004) son conocidos en la actualidad como checkpoints y los 3 más importantes en mamíferos son: G1/S, intra-S y G2/M. Las levaduras como *S. pombe* y *S. cerevisiae* posee solamente 2: intra-S y G2/M. En ellos se pueden identificar 4 grupos de proteínas: sensores de daño, mediadores de señal, transductores de señal y efectores.

El descubrimiento de las Cdks como los reguladores por excelencia del ciclo celular desató investigaciones dirigidas a determinar cómo ocurre la parada del ciclo celular para reparar los daños en el ADN. Estas investigaciones culminaron con la identificación de la quinasa checkpoint Chk1, cuyo objetivo es Cdc25, la fosfatasa que activa Cdc2/Cdk1 (Sancar *et al.*, 2004). Cdk1 fosforila y por lo tanto inactiva a Cdc25, el cual es una fosfatasa que activa Cdc2. La inhibición de Cdc25 por Chk1 retrasa el inicio de la mitosis, lo que le da tiempo a la célula para reparar el daño identificado.

Se conoce que la transición de la fase G<sub>2</sub> a Mitosis depende de la activación de Cdc2 a través de su fosforilación por parte de Cdc25, paso clave en la progresión del ciclo celular en el que Cdk1 tiene un papel medular de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior.

#### d. Efectos en ciclo celular del estrés nitrosativo mediado por NO

El NO tiene efectos adversos en muchos aspectos, incluso a nivel molecular en procesos tan importantes como el ciclo celular. Varios grupos de investigación han reportado los efectos del NO y otros RNS en sus distintas fases. Se ha demostrado que compuestos derivados del NO y que producen NO inhiben la síntesis de ADN (fase S) e incluso se ha observado la concomitante activación de los mecanismos checkpoint en células de mamíferos (Guo *et al.*, 1998, Ranjan y Heintz, 2006). El proceso detallado por medio del cual las células se protegen frente a los efectos perjudiciales del NO al detenerse en la fase S, está aún a la espera de desvelarse.

Conjuntamente con la inhibición de la síntesis de ADN se ha observado la pérdida de función de Cdc25 en células de mamíferos (Tomko *et al.*, 2009). En *S. pombe*, se ha reportado que el bloqueo en el checkpoint G2/M se debe a la retención de la forma inactiva fosforilada de Cdc2 (Majumdar *et al.*, 2012), cuya defosforilación por parte de Cdc25 es la clave para su activación y es ahí donde radica la importancia de la pérdida de función de ésta última. Además, el estrés nitrosativo resultó en la inactivación de Cdc25 mediante S-nitrosilación, que como hemos mencionado, es la que en verdad conduce al paro en ciclo celular.



# OBJETIVOS

---



El estudio del papel del NO en la fisiología de los hongos filamentosos es un aspecto poco investigado de esta importante molécula señalizadora. Con la información obtenida en el presente trabajo pretendemos contribuir al conocimiento de los hongos patógenos de plantas para que, en el futuro, se puedan desarrollar estrategias eficaces para combatirlos.

Los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Analizar mediante diversas aproximaciones experimentales la producción de NO en los hongos filamentosos *B. cinerea* y *C. graminicola*.
2. Tratar de identificar los mecanismos implicados en esta producción.
3. Estudiar las funciones fisiológicas en las que participa y/o regula el NO en *B. cinerea* y en *C. graminicola*.
4. Identificar y caracterizar funcionalmente genes cuya expresión es regulada por NO en *B. cinerea*, en particular posibles genes codificadores de factores de transcripción.
5. Evaluar los efectos fisiológicos del NO exógeno sobre una cepa de *B. cinerea* mutante en el gen *Bcfhg1*, codificador de una enzima flavohemoglobina, y caracterizar los cambios en los patrones de expresión génica que dicha exposición determina.





# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. ORGANISMOS

### a. Plantas

Las plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas en este trabajo son plantas de la variedad Riñón.

### b. Hongos

La cepa tipo silvestre de *B. cinerea* 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.

La cepa “regenerante” VeE2.1 fue incluida en algunos ensayos realizados en el presente trabajo. Se trata de una cepa de laboratorio derivada de la cepa silvestre B05.10 obtenida a partir de un protoplasto individual que ha sido sometido a los mismos procedimientos y tratamientos experimentales que permitieron obtener los mutantes  $\Delta Bcfhg1$   $\alpha 7.2$  y  $\beta 16.7$  pero en un experimento de transformación llevado a cabo sin la adición de ADN transformante.

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 HispanoLuso de investigaciones Agrarias (CIALE) (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

Las cepas pLOB16.1 y pLOB14.3 son transformantes obtenidos mediante silenciamiento génico del gen codificador de la enzima argininosuccinato sintasa (*Bcass1*) de *B. cinerea*. Fueron generados mediante transformación de la cepa B05.10 de *B. cinerea* con una construcción derivada del plásmido pBSK+ (Stratagene) en cuyo polilinker se ha clonado una fusión génica que permite expresar el gen bacteriano de resistencia a la higromicina (1017 pb). Este casete de resistencia incluye la región estructural del gen que proporciona la resistencia a higromicina fusionada al promotor del gen *OliC* de *Aspergillus nidulans*. En cuanto a su terminador, en primera instancia se creyó haber incluido aguas debajo de la región codificante del gen de resistencia a higromicina un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* que incluía el terminador del gen *tubA*, codificador de la  $\beta$ -tubulina. Posteriormente se demostró que el vector pLOB1 en realidad incluía en su lugar un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* portador de 446 bp de la parte terminal de la región codificante del gen codificador de la enzima de la argininosuccinato sintasa seguido del terminador de este gen (Pate *et al.*, 2010). Este gen es esencial para la producción de L-arginina, y se ha demostrado que en algunos transformantes obtenidos con el plásmido pLOB1 se induce el silenciamiento génico del gen *Bcass1* mediado por la secuencia de la región correspondiente al extremo 3' de la región codificante del mismo gen, lo que determina auxotrofia para la arginina en estos

transformantes (Patel *et al.*, 2010). Dada la situación y teniendo en cuenta que el metabolismo de la L-arginina puede constituir una fuente de producción de NO, ambas cepas fueron incluidas en los experimentos de detección de la producción de óxido nítrico por parte de *B. cinerea*.

Las cepas mutantes deficientes en el gen que codifica la enzima nitrato reductasa,  $\Delta Bcni\alpha\Delta-3$  y  $\Delta Bcni\alpha\Delta-12$ , fueron cedidas por los Profesores Bettina y Paul Tudzynski, de la Universidad de Münster (Alemania). Ambas fueron incluidas en varios ensayos realizados en el presente trabajo.

Las cepas  $\Delta Bcass1-54$  y  $\Delta Bcass1-68$  son mutantes deficientes en el gen que codifica para la argininosuccinato sintasa (ASS) obtenidos mediante reemplazamiento génico en el laboratorio del Dr. Gary Foster de la Universidad de Bristol (Inglaterra) (Patel *et al.*, 2010).

La cepa M1.001 de *C. graminicola* fue cedida por Serenella Sukno y Mike Thon (Grupo *Colletotrichum*, Laboratorio 1 del CIALE) para estudios comparativos con *B. cinerea*.

### c. Bacterias

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

## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### a. Plantas

Las plantas de judía variedad Riñón fueron cultivadas en el invernadero. 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.

### b. Hongos

#### i. Cultivo en medio sólido de *B. cinerea*

Para la obtención de conidios se prepararon placas de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) suplementadas con 25% (p/v) de hojas de tomate trituradas (Benito *et al.*, 1998). Estas placas fueron inoculadas con 20  $\mu$ l de una suspensión de conidios e incubadas a 22°C durante 4 días aproximadamente. Transcurrido este tiempo fueron expuestas a luz ultravioleta de onda larga (280-420 nm) durante 16 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 saprofito se utilizaron placas de MEA (Malt Extract Agar, Difco).

Para la formación de esclerocios se utilizaron placas de medio B5 sólido compuesto por sales Gamborg's B5 (AppliChem) suplementado con Sacarosa 10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 6,5 y 2% de agar.

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

#### ii. Cultivo en medio sólido de *C. graminicola*

Para la obtención de esporas de *C. graminicola* se utilizaron placas Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar) en cuya superficie se dispensaron varias partículas de silica gel impregnadas con esporas del hongo. Se dejó crecer a 22°C en cajas de plástico cerradas para evitar contaminación durante 10 y 15 días.

### iii. Cultivo en medio líquido de *B. cinerea*

Para el crecimiento de *B. cinerea* en medio líquido se utilizó el medio sales Gamborg's B5 suplementado con Sacarosa 10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 6,5 (Gamborg's B5S). El medio fue inoculado con una suspensión de conidios a una concentración final de  $5 \times 10^5$  esporas/ml y seguidamente puesto a incubar en agitación a 22°C y 180 r.p.m.

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  $5 \times 10^5$  esporas/ml y los matraces incubados en agitación a 180 r.p.m. y 22°C durante 16 – 18 horas.

### iv. Cultivo en medio líquido de *C. graminicola*

Para el crecimiento de *C. graminicola* en medio líquido se utilizó el medio FRIES (Vaillancourt and Hanau, 1992) que contiene por cada litro: 30 g de Sacarosa, 5 g de tartrato de amonio, 1 g de nitrato de amonio, 1 g de fosfato de potasio (monobásico), 0,48 g de Sulfato de magnesio (heptahidratado), 1 g de cloruro de sodio, 0,13 g de cloruro de calcio, 1 g de extracto de levadura y agua Milli-Q hasta completar 1 litro.

### c. Bacterias

*E. coli* fue cultivada en medio LB (Luria-Bertani) líquido o sólido en los experimentos de transformación y para la obtención de ADN plasmídico. EL medio LB está compuesto de 0.5% de extracto de levadura (Bacto Yeast Extract, Difco), 1% de bactotriptona (Bacto Tryptone, Difco), 1% de NaCl y 2% de agar en caso de que sea medio sólido. La temperatura de incubación fue siempre de 37°C y en el caso de que se tratara de cultivo en medio líquido, los matraces fueron incubados en una agitación a 250 r.p.m.

Para la selección de colonias resistentes a ampicilina, se añadió ampicilina en una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  después de haber esterilizado el medio en la autoclave.

### 3. EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE *B. cinerea* y *C. graminicola*

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 10 ml de Tween 20  $5 \times 10^{-4}\%$ . 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 de Tween 20. A continuación la suspensión de esporas fue filtrada a través de un embudo que contenía lana de vidrio en su parte más estrecha para eliminar restos de micelio y para quedarnos solamente con las esporas, las cuales fueron recolectadas en un tubo Falcon de 50 ml. Se repitió de nuevo la operación pero ésta vez con agua destilada estéril. La suspensión de conidios recolectada se centrifugó a 800 r.p.m. por 7 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.

El proceso que se utilizó para la extracción de esporas en *C. graminicola* fue básicamente el mismo utilizado con *B. cinerea* salvo unas pequeñas diferencias. Concretamente, las placas que se utilizaron para el cultivo del hongo fueron placas de medio PDA sin extracto de tomate y para su conservación a largo plazo las esporas obtenidas fueron conservadas en tubos con tapa rosca. El grupo de *Colletotrichum* posee un stock de esporas dispuesto en tubos con tapa de rosca en forma de sílica gel impregnada con esporas del hongo.

## 4. ENSAYOS DE GERMINACIÓN

### a. Cultivo estático de *B. cinerea*

La germinación de *B. cinerea* fue evaluada en medio ½ PDB y en placas Petri de 45 mm. Para ello se prepararon diluciones de las distintas cepas analizadas a una concentración final de  $2 \times 10^4$  esporas/ml. En los tratamientos control, se colocó una gota de 100  $\mu$ l de la suspensión de esporas en el centro de la placa, conteniendo, por lo tanto, aproximadamente 2000 esporas. En los tratamientos con DETA 250  $\mu$ M (donador de NO), se utilizaron gotitas preparadas combinando 2.5  $\mu$ l de DETA 10 mM con 97.5  $\mu$ l de la dilución  $2 \times 10^4$  esporas/ml. Para el tratamiento con CPTIO 500  $\mu$ M (secuestrador de NO), se utilizaron 5  $\mu$ l de CPTIO 10 mM con 95  $\mu$ l de la dilución  $2 \times 10^4$  esporas/ml. Para el tratamiento con L-NNA 1 mM (inhibidor de enzimas de tipo óxido nítrico sintasa NOS de mamíferos), se utilizaron 10  $\mu$ l de L-NNA 10 mM con 90  $\mu$ l de la dilución  $2 \times 10^4$  esporas/ml.

El conteo del número de esporas germinadas se realizó a las 4, 6, 8 y 12 horas. Se colocó la placa en el microscopio óptico y se enfocó con el lente de 10X. 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 % de esporas germinadas en cada tratamiento. Se consideró que una espora ha germinado cuando ha emitido el tubo germinativo y éste tiene una longitud superior a la longitud del diámetro mayor de una espora no germinada.

### b. Cultivo estático de *C. graminicola*

La germinación de *C. graminicola* fue estimada mediante recuentos en suspensiones de esporas preparadas en agua y en placas Petri de 45 mm. Se utilizó una dilución de trabajo de  $10^4$  esporas/ml. A partir de aquí, el procedimiento es el mismo que se siguió con *B. cinerea*, descrito en el punto anterior.

En ese caso el conteo del número de esporas germinadas se realizó a las 17 y 24 horas, tomando en cuenta que la ventana de germinación de *C. graminicola*, aunque varía de acuerdo a cada autor, de forma general es entre las 17 y 24 horas de incubación. Teniendo en cuenta que según varios autores, a las 18 horas empiezan a formar apresorios, las 17 horas es una buena hora para encontrar esporas en proceso de germinación.



c. Cultivo en agitación de *B. cinerea*

Para estimar el porcentaje de germinación en medio líquido en agitación se utilizó el medio sales Gamborg's B5 suplementado con Sacarosa 10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 6,5, incubando los matraces con las suspensiones de esporas correspondientes a 180 rpm y 22°C. Se utilizó una concentración de trabajo de  $2 \times 10^5$  esporas/ml, tomando para su observación al microscopio alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  para efectuar los recuentos de esporas germinadas y no germinadas a los tiempos considerados. Los tratamientos utilizados fueron: DETA 250  $\mu\text{M}$  y L-NNA 1 mM. Se tomaron varias fotografías de cada tratamiento y se calculó el % de esporas germinadas.

d. Cultivo en agitación de *C. graminicola*

En los experimentos de determinación del porcentaje de germinación de *C. graminicola* en cultivo líquido en agitación se utilizó el medio Fries, descrito en el apartado 2.b.iv. Las condiciones de incubación fueron 180 r.p.m. a 22°C. De igual forma que para *B. cinerea*, se utilizó una concentración de esporas de trabajo de  $2 \times 10^5$  esporas/ml, los matraces fueron incubados en las condiciones indicadas y a los tiempos seleccionados se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  para su observación al microscopio. De las mismas se tomaron fotografías de varios campos que se almacenaron para su posterior estudio llevando a cabo los recuentos correspondientes. Los datos obtenidos se almacenaron y procesaron con ayuda del programa Excel.

## **5. ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO**

Una suspensión de  $1 \times 10^5$  esporas/ml de cada cepa fue utilizada como stock inicial. El medio de cultivo base fue MEA suplementado según las necesidades del experimento. En el centro de la placa se depositó una gota de  $5 \mu\text{l}$  de la suspensión de conidios (conteniendo 500 esporas). Por cada muestra se realizaron 3 réplicas. Las placas se dejaron crecer a  $22^\circ\text{C}$  y se midió el diámetro de la colonia a los 3, 4 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. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS

En todas las condiciones de estrés analizadas el crecimiento saprofito de las cepas de interés fue estimado siguiendo los procedimientos indicados en la sección anterior, utilizando en cada caso los medios de cultivo adecuados y que se describen a continuación.

### a. Estrés nitrosativo

Para la inducción de condiciones de estrés nitrosativo en medio sólido se utilizó el donador de NO, SNP (Nitroprusiato de sodio, Fluka) en dos concentraciones: 0.5 y 1 mM. Este reactivo se añadió al medio MEA una vez que éste fue autoclavado. Las placas de MEA+SNP fueron conservadas en oscuridad hasta su utilización para evitar la degradación del SNP por la luz. 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.

### b. Estrés oxidativo

Para la inducción de estrés oxidativo se utilizaron dos reactivos: Menadiona (Sigma), como fuente de radicales superóxido, a una concentración final de 125  $\mu$ M, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno), como fuente de radicales hidroxilo altamente reactivos, a una concentración de 2.5 mM. Ambos se añadieron al medio MEA una vez que éste había sido esterilizado en el autoclave para evitar su descomposición.

### c. Estrés salino

Para la inducción de estrés salino se utilizó NaCl (cloruro de sodio, Panreac) a una concentración final de 0.7 M (Schumacher *et al.*, 2014). Como en los casos anteriores, el NaCl fue añadido al medio de cultivo una vez que éste había sido esterilizado en el autoclave.

### d. Estrés osmótico

Para la evaluación de sensibilidad a condiciones de estrés osmótico el medio MEA fue suplementado con Sorbitol (Acros Organics) a una concentración de 0.7 M (Schumacher *et al.*, 2014).

## **7. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTAS DE JUDÍA (*P. vulgaris* variedad Riñón)**

Se preparó una suspensión de esporas  $1 \times 10^5$  esporas/ml de cada una de las cepas que se incluyeron en el experimento en medio PDB 1/2. Las plantas de judía deben tener aproximadamente 2 semanas de edad. Las inoculaciones se llevaron a cabo utilizando plantas intactas depositando gotitas de 5  $\mu$ l (500 esporas) de la suspensión correspondiente sobre la superficie de las hojas. Normalmente sobre una hoja se depositaron 4 gotitas de una cepa dada, y para cada cepa se realizaron de 2 a 3 repeticiones para disponer de datos para el análisis estadístico posterior. Las plantas inoculadas fueron colocadas en el interior de cajas de plástico (generalmente 4 plantas por caja) de 32 cm x 36 cm x 42 cm. En el fondo de las cajas se depositó una pequeña cantidad de agua y éstas fueron selladas con cinta adhesiva para mantener en el interior unas condiciones de alta humedad relativa (HR>95%). Las cajas se dispusieron apiladas en un fitotrón a 22°C con el fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Transcurridas 72 horas se tomaron los datos. Para ello se recortaron las hojas y para cada lesión se midieron dos diámetros perpendiculares. El diámetro de cada lesión fue estimado como la media de los dos diámetros perpendiculares recogidos.

## 8. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### a. ADN genómico de *B. cinerea*

Se utilizaron dos métodos para extraer ADN genómico: uno más laborioso para obtener ADN de buena calidad y concentración, denominado “método TENSP”, y el otro mucho más rápido y sencillo para obtener ADN de calidad suficiente para hacer PCR.

#### i. Método TENSP

Se utilizó para obtener ADN genómico limpio y poco degradado para las digestiones con enzimas de restricción. El material de partida fue micelio obtenido de un cultivo líquido incubado durante 16 horas en agitación a 22°C, el cual fue recogido y conservado a -80°C hasta su utilización. Se tomaron unos 200 mg de micelio congelado que fue machacado con nitrógeno líquido en un mortero. Obtuvimos así un polvillo muy fino que fue recogido en tubos eppendorf de 1,5 ml. A continuación se añadieron 600 µl de la solución de lisis TENSP, compuesta por 100 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,5 M NaCl, 1% PVP (Polivinilpirrolidona) y 10 mM de β-mercaptoetanol. La suspensión resultante se mezcló mediante agitación al vórtex para homogenizar la suspensión y se incubó a 65°C durante 30 minutos. Se realizó una agitación de las muestras a los 15 minutos de iniciada la incubación.

Se añadieron 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclando cada muestra suavemente con la micropipeta. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 5 minutos y a 4°C. Se transfirió el sobrenadante (500 µl) a un tubo nuevo y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Se repitió éste último paso una vez más y al sobrenadante obtenido se le añadió 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se repitió la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

Se añadieron entonces 0,7 volúmenes de isopropanol y las muestras fueron mantenidas a -20°C durante al menos dos horas (en ocasiones toda la noche).

Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C para precipitar el ADN. Se lavó el pellet obtenido con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 2 minutos. Se secó el pellet en el SpeedVac de 3 a 5 minutos y se resuspendió en un volumen de 100 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. Finalmente se añadieron 2 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se conservaron las muestras a -20°C hasta su utilización.

## ii. Método rápido

En este método el material de partida es micelio crecido en medio sólido que fue recogido raspando la superficie de la placa de cultivo con un bisturí. Para extraer ADN genómico se depositaron unos 100-200 mg de micelio en un tubo de 1,5 ml conteniendo 300 mg de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro.

Se añadieron 500 µl del tampón de extracción compuesto por 100 mM de NaCl 10 mM, Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de EDTA y 3% de SDS. El micelio se molió entre bolas de vidrio con ayuda de una varilla de vidrio, se agitó fuertemente en el vórtex y se incubó a 60°C durante 5 minutos. Se perforó la base del tubo mediante una aguja caliente y se introdujo en un tubo nuevo de 1,5 ml, centrifugándose a 10.000 r.p.m. por 2 minutos.

El extracto recuperado se calentó a -80°C durante 10 minutos, se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml. Se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 10.000 r.p.m y a 4°C durante 10 minutos. Se extrajo la fase acuosa transfiriéndola cuidadosamente a un tubo nuevo de 1,5 ml.

El ADN fue precipitado añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol y centrifugando a 13.000 r.p.m. y 4°C durante 5 minutos. Después se lavó con etanol 70%, se centrifugó a 13.000 r.p.m. y 4°C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó en el speedvac. Se añadieron finalmente 25 µl de agua MiliQ para resuspender el precipitado de ácido nucleico y se almacenó la suspensión de ADN a -20°C.

## b. ADN Plasmídico

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

### i. 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. Para ello nos aseguramos de que el tampón de lavado A4 (Wash Buffer A4) hubiera sido preparado convenientemente añadiendo los 100 ml de etanol 96% con los que nos indica el manual que debe ser suplementado el preparado de este tampón proporcionado con el kit antes de iniciar el protocolo de extracción. 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.

*E. coli* transformada con un vector portador de resistencia a ampicilina fue cultivada en 5 ml de medio LB líquido con 100 µg/ml a 37°C y 200 r.p.m durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 500 µl de LB.

Seguidamente se centrifugó a 11.000 g por 30 segundos 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 o pipeteando arriba y abajo varias veces. 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 un momento 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 (no se debe utilizar el vórtex ni la micropipeta). Incubamos la mezcla durante 5 minutos 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 (tampoco en este caso se debe mezclar con el vórtex o con la micropipeta).

Se centrifugó la muestra durante 5 minutos 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 minuto. 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 minuto. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 600 µl de tampón A4 y se centrifugó a 11.000 g durante 1 minuto. La columna vacía fue sometida a centrifugación a 11.000 g durante 2 minutos 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 minutos. Se centrifugó la columna 11,000 g durante 1 minuto y el eluido se almacenó a -20°C.

## ii. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico

Para obtener mayor cantidad de ADN plasmídico se incubó *E. coli* en 20 ml de LB con 20 µl de Ampicilina 100 µg/ml a 37°C y 200 r.p.m. durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 3000 r.p.m durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 1 ml de solución de resuspensión compuesta por 50 mM Tris HCl pH 7,5, 10 mM EDTA y 100 µg/ml de RNAsa. El volumen resultante se repartió en 4 tubos de 250 µl, a cada uno se le agregaron 250 µl de solución de lisis compuesta por 0,2 M de NaOH y 1% de SDS y las suspensiones fueron mezcladas invirtiendo los tubos 10 veces. Se añadieron a cada tubo 250 µl de solución de neutralización, compuesta por 1,32 M de acetato de potasio pH 4,8, y los tubos fueron centrifugados a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se prepararon 4 tubos con 800 µl de

isopropanol cada uno a los cuales fueron transferidos los sobrenadantes resultantes de la centrifugación anterior. Se mezclaron muy bien las suspensiones mediante vórtex y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. Se desechó el isopropanol y el pellet se secó en el speedvac. Se añadieron 40 µl de agua MiliQ estéril en cada tubo y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos para que el ADN se resuspendiera totalmente (si fuera necesario la muestra puede ser calentada durante unos minutos a 65°C para disolver totalmente el pellet).

Se juntaron los 4 volúmenes en un solo tubo de 1,5 ml (160 µl en total) y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugo a 10.000 r.p.m y a 4°C durante 10 minutos. Se extrajo la fase acuosa transfiriéndola cuidadosamente a un tubo nuevo de 1,5 ml. El ADN fue precipitado añadiendo 2,2 volúmenes de etanol 96% y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y conservando la muestra a -80°C toda la noche. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 12.000 r.p.m. y 4°C durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de Etanol 70%. Se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se secó el pellet en el speedvac. Se resuspendió finalmente el precipitado en 160 µl de agua MiliQ y se almacenó a -20°C.

### c. ARN total de *B. cinerea*

Se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido 100 mg de pasta de micelio. Se añadió 1 ml de TRIzol® Reagent (Ambion RNA life technologies) y se recogió el homogenizado en dos tubos eppendorf de 1,5 ml (aproximadamente 600 µl cada uno). Se añadieron 100 µl de cloroformo a cada tubo, se agitó vigorosamente en el vórtex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo de 1,5 ml. Se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en el vórtex, se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 12.000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se repitió de nuevo la extracción.

El volumen final de la muestra, procesada desde un principio en dos tubos eppendorf, se unió en solo tubo y se añadieron 550 µl de isopropanol. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 r.p.m. y 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 1 ml de etanol 70% y centrifugación a 12.000 g y a 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el etanol residual se evaporó en el speedvac.

El ARN se resuspendió en 200 µl de agua MiliQ estéril con 1% DEPC y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente se mantuvo en hielo y se midió su concentración mediante un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-100).



## 9. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)

La extracción de proteínas se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio del Dr. Pedro San Segundo, que incluye la utilización del ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de las proteínas.

Como primer paso se realizó la recolección de las muestras y para ello se pesaron tantos tubos con tapa rosca de 1,5 ml como muestras se tenga en función del experimento propuesto. Esto se realiza para colocar la cantidad de buffer SB 2X y Tris 2M que debe llevar cada muestra en relación al peso del pellet obtenido. Las muestras de *B. cinerea* cultivadas a los tiempos determinados fueron recogidas en tubos de 50 ml mediante centrifugación a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se realizó este procedimiento hasta terminar con todo el cultivo. Se lavó el pellet con 45 ml de agua destilada enfriada a 4°C y las células fueron sedimentadas de nuevo mediante centrifugación a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 ml de TCA al 20% y el volumen resultante fue transferido al correspondiente tubo con tapa de rosca previamente pesado. Se mantuvieron los tubos en hielo hasta tener todos los pellets resuspendidos. Se centrifugaron a 13.200 r.p.m. durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante en cada caso con la micropipeta de 1 ml. Se volvió a centrifugar todos los tubos a 13.200 r.p.m. por 30 segundos y el sobrenadante se retiró con la micropipeta de 100 µl garantizando la eliminación completa del líquido. Se pesaron nuevamente los tubos, se calculó la diferencia con el tubo vacío correspondiente (con estos datos se determina el volumen de SB2X (Tris HCl 100 mM, SDS 4%, DTT 200 mM, Glicerol 20% y trazas de azul de bromofenol) y de Tris 2M que se deberá añadir en cada caso en fases posteriores de este procedimiento para resuspender el pellet obtenido en la extracción de proteínas y tener la concentración final de proteína adecuada - protocolo descrito a continuación) y se resuspendieron los pellets en 100 µl de TCA al 20%. Se guardaron así las muestras a -80°C.

Para continuar con la extracción de proteínas propiamente dicha, en primer lugar se encendió el termobloque a 99°C. A cada muestra se agregaron 0,5 ml de bolitas de vidrio las cuales se midieron en un tubo eppendorf vacío de 1,5 ml. Se llevaron las muestras al equipo de FastPrep para llevar a cabo la ruptura de las células mediante 3 repeticiones de 15 segundos a 5.0 M/s. Se mantuvieron los tubos en hielo durante 1 minuto después de las 2 primeras repeticiones. Se prepararon tubos eppendorf vacíos y sobre cada uno se colocó un tubo con la muestra perforado en la base con la punta de una aguja de insulina caliente. Se tuvo cuidado de no tocar la muestra con la punta de la aguja. Se centrifugaron a 2.000 r.p.m. durante 1 minuto a 4°C. Se lavaron las bolitas en cada tubo con 200 µl de TCA al 5% y fueron centrifugadas a 3.000 r.p.m. durante 2 minutos. Se tiró el sobrenadante y se les dio un spin a las muestras para a continuación retirar el líquido que quedó con una micropipeta de 200 µl. Se resuspendió el pellet de cada muestra en el volumen de SB2X y Tris 2 M correspondiente calculado a partir de la diferencia obtenida entre el tubo vacío y el mismo pero con el pellet correspondiente de cada muestra. Para determinar el volumen de SB2X que debemos poner en cada muestra, se multiplicó la diferencia obtenida previamente por 5000. Para determinar el volumen de Tris 2M se divide entre 2 el valor del volumen de SB2X calculado. Una vez que el pellet estuvo completamente resuspendido, se calentaron las muestras en el termobloque a

99°C durante 5 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13.200 r.p.m. durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante de cada tubo en un tubo eppendorf nuevo y éstos se guardaron a -80°C.

## 10. VECTORES DE CLONACIÓN

### a. pGEM<sup>®</sup>-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  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -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 5 se presenta la estructura del plásmido pGEM-T Easy.

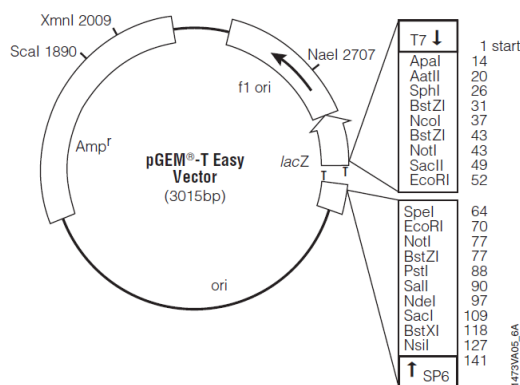


FIGURA 5. Mapa circular del plásmido pGEM<sup>®</sup>-T easy.

### b. pBluescript II SK (+)

Los plásmidos pBluescript son plásmidos de 2961 pares de nucleótidos derivados del plásmido pUC19. La designación SK indica que la orientación del polilinker en el sentido de la transcripción de *lacZ* procede del sitio de restricción *SacI* al sitio de restricción *KpnI* (la designación KS indicaría la orientación contraria). MCS es el sitio de multiclonaje donde se encuentra el polilinker que contiene las enzimas *KpnI*, *ApaI*, *XhoI*, *AccI*, *SalI*, *Clal*, *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *SmaI*, *BamHI*, *SpeI*, *XbaI*, *NotI*, *BstXI* y *SacI*. En la Figura 6 se presenta la estructura del plásmido pBluescript II SK (+/-).

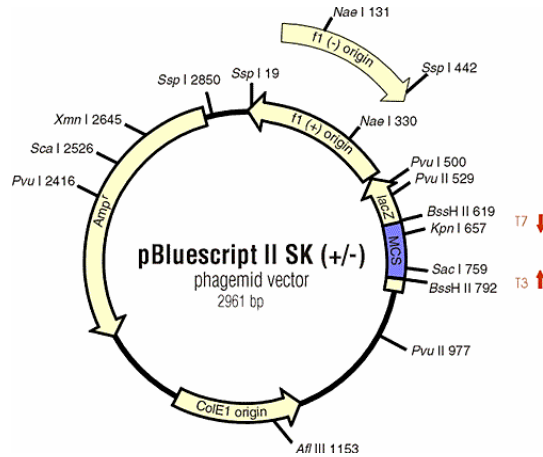


FIGURA 6. Mapa circular del plásmido pBluescript II SK.

### c. pDONR-A-Hyg

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 7 se presenta su estructura.

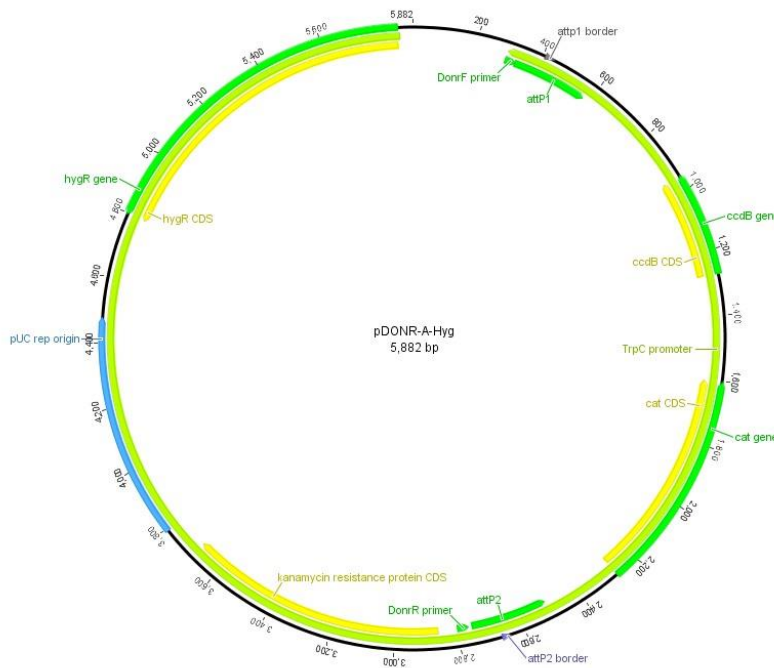


FIGURA 7. Mapa circular del vector pDONR-A-Hyg .

## 11. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN

### a. 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/ $\mu$ l ó 15 U/ $\mu$ l. Se define una unidad como la actividad de la enzima que digiere completamente 1  $\mu$ g de ADN en una hora a 37°C en un volumen total de 50  $\mu$ 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.

### b. 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 MgCl<sub>2</sub>, 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  $\mu$ l con las diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1  $\mu$ l de la enzima a una concentración de 1 U/ $\mu$ l.

## 12.ELECTROFORESIS

### a. 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). Se utilizaron cubetas horizontales de 15 o 30 cm de largo, utilizándose como tampón de electroforesis 1X TAE. 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 tamaños (1 kb plus, Invitrogen). Los geles se corrieron a una potencia de unos 6 V/cm, aunque ésta se redujo dependiendo del rango de tamaños a resolver y de la cantidad de ADN. Después de 45 a 60 minutos los geles se tiñeron en un baño de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio en 1X TAE durante 15 minutos. El ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta y se capturaron las imágenes en el equipo de visualización AlphaImager MINI (Protein Simple).

### b. 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 acetato sódico, 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 minutos 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 3V/cm durante 3 horas dentro de una campana de extracción. Debido a la poca conductividad eléctrica de tampón MOPS, cada 10 o 15 minutos se transfería tampón del ánodo al cátodo y viceversa, con ayuda de una pipeta de plástico. Después se comprobó la cantidad y calidad del ARN separado en el gel mediante exposición a la luz ultravioleta y la toma de las imágenes correspondientes con el aparato de adquisición de imágenes.

c. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Tanto la electroforesis en geles de poliacrilamida como la técnica de Western Blot se realizaron en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) en el laboratorio a cargo del Dr. Pedro San Segundo, dada la disponibilidad de equipamiento y reactivos.

Este tipo de electroforesis se realiza en condiciones desnaturalizantes para garantizar que la proteína pierda su estructura tridimensional y así que la migración sea proporcional a la carga y tamaño de la proteína, pero no a su forma.

Los extractos de proteínas obtenidos con la metodología descrita en el apartado 10, incluyen el tampón de carga (Sample Buffer 2X) por lo que éste no tiene que ser añadido ahora para su seguimiento durante la electroforesis. Fueron retiradas del ultracongelador a -80 °C y se dejaron descongelar sobre hielo. Una vez descongelados fueron agitados ligeramente para disolver el SDS que contienen. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% con una relación acrilamida:bisacrilamida de 37,5:1. Se cargaron las muestras y el marcador de proteínas de Biorad (Precision Plus Protein Standards) de forma que se tuviera clara la disposición de las mismas en el gel para evitar confusiones durante la transferencia y la inmunodetección.

La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) durante aproximadamente 2 horas, utilizando un tampón de carrera que contiene Tris Base 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0.1%.

### **13.RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN**

La muestra con el fragmento a recuperar se cargó generalmente en un gel de agarosa al 0,7%, pudiendo variar esta concentración en función del tamaño del fragmento que se deseaba purificar. Las condiciones de la electroforesis se seleccionaron garantizando la máxima resolución y separación del fragmento deseado. Se pesaron tantos tubos de 15 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.



## 14. TRANSFORMACIONES

### a. Transformaciones de *Escherichia coli*

Las transformaciones con *E. coli* con plásmidos se realizaron utilizando el método del choque térmico. En primer lugar se prepararon células competentes que se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Hanahan *et al.*, 1991). Para ello se incubaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  en 5 ml de LB a 200 r.p.m. y  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\text{MgSO}_4$  y ajustado el pH a 7,6 con 10 N KOH. El medio se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 r.p.m. hasta una OD550 de 0,48 y se centrifugó a 2,500 r.p.m. durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 150 ml de TFB1 a  $4^{\circ}\text{C}$ . La composición de la solución TFB1 es 12,1 g/l  $\text{RbCl}_2$ , 6,3 g/l  $\text{MnCl}_2$ , 2,9 g/l acetato potásico, 1,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 15% glicerol, con un pH ajustado a 5,8 con ácido acético y se esteriliza por filtración. Las células en TFB1 se incubaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 2.500 r.p.m. y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 ml de TBF2 a  $4^{\circ}\text{C}$ . La composición de la solución TBF2 es 2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l de  $\text{RbCl}_2$ , 8,3 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 15% de glicerol, con un pH ajustado a 7 con NaOH y se esteriliza por filtración. Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo durante 15 minutos y se repartieron en alícuotas para su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

Cuando se pretendía multiplicar un plásmido se recurrió a un procedimiento de transformación más rápido pero menos eficiente. Se mezclaron 10  $\mu\text{l}$  de células competentes con 1  $\mu\text{l}$  de plásmido (100 ng/ $\mu\text{l}$ ). Se incubó la mezcla por 1 minuto en hielo, 1 minuto a  $37^{\circ}\text{C}$  y otro minuto en hielo. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  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 40  $\mu\text{l}$  de una solución de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido). El gen *lacZ* codifica el péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

### b. 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  $1 \times 10^8$  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 horas a 22°C y 140 r.p.m. El cultivo se vertió en dos tubos de 50 ml, se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió éste procedimiento hasta que se recogió todo el cultivo. Se añadió agua MiliQ estéril hasta los 50 ml y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió solución KC (0,6 M KCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, esterilizado en autoclave) hasta 50 ml en los dos tubos, se resuspendió el micelio, se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos 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 r.p.m. durante 3 minutos 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 r.p.m. en un matraz estéril de 100 ml durante al menos dos horas. Pasado éste tiempo comprobamos 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 de tamaño de poro. Se añadió KC a 4°C hasta obtener un volumen de 50 ml, se centrifugó la suspensión a 1.200 r.p.m. durante 3 minutos 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 minutos. Se añadieron 100 µl de la suspensión de protoplastos a la suspensión de ADN y se incubó en hielo durante 5 minutos. Después se añadieron y mezclaron suavemente 100 µl de solución PEG, compuesta por 25% PEG 3350, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron otros 500 µl de solución PEG, la suspensión se mezcló suavemente y se prolongó la incubación durante 10 minutos 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 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 horas a 22°C. Se añadió entonces la cobertera de selección compuesta por SH agar líquido a 50°C con 70 µg/ml de higromicina. Después de dos días de incubación a 22°C empiezan a aparecer los transformantes resistentes al antibiótico que fueron transferidos individualmente a placas de medio MEA suplementado con Higromicina 100 µg/ml.

### c. Transformación de *C. graminicola*

El procedimiento para la transformación de *C. graminicola* se realizó utilizando el protocolo del Grupo de *Colletotrichum* perteneciente al laboratorio 1 del CIALE, el cual se basa también en la generación de protoplastos y el uso de PEG para la introducción en el hongo del plásmido que lleva la construcción de interés. Como primer paso se preparó una solución de PEG al 60% con KTC 3X (1,8 M KCl, 150 mM Tris HCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). Se colocaron los protoplastos en hielo (100 µl), los cuales fueron cedidos por nuestros compañeros del grupo de *Colletotrichum*. Se adicionaron 10 µl de plásmido linearizado y se mezcló lentamente con la punta de la pipeta pero sin pipetear. Se incubó en hielo por 20 minutos, se mantuvo a temperatura ambiente durante un par de minutos y luego se adicionó la solución de PEG preparada. Se mezcló con cuidado y se incubó nuevamente por 20 minutos. Mientras tanto, se adicionaron 200 µl de Higromicina (50 mg/ml) a un volumen de 40 ml de medio de regeneración (Sacarosa 1 M, Bacto Agar 1,5%, Extracto de Levadura 0,1%, hidrolizado enzimático de caseína 0,05% e hidrolizado ácido de caseína 0,05%). Posteriormente se añadieron los 40 ml del medio de regeneración equilibrado a 48°C y se mezcló por inversión varias veces. Se distribuyó la mezcla en placas Petri lo más uniformemente posible y se incubaron a 22°C entre 5 y 7 días. Pasado éste tiempo se transfirieron los transformantes que empezaron a crecer a placas individuales de medio PDA con higromicina (50mg/ml).

## 15. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### a. 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. De este modo, para reacciones en las que se necesitaba amplificar más de 3.000 pares de nucleótidos con alta fidelidad se utilizó la enzima PCR Extender Polymerase Mix (5 Prime) y para comprobaciones rutinarias como la verificación de fragmentos clonados en plásmidos recombinantes o para identificar transformantes positivos se utilizó la enzima Biotools DNA Polymerase. Estas ADN polimerasas son enzimas altamente termoestables producidas por organismos termófilos como *Thermus aquaticus* (5 Prime) o *Thermus thermophilus* (Biotools).

Las concentraciones de enzima utilizadas en cada caso fueron las recomendadas por la casa comercial, generalmente 1 unidad de enzima por cada 50 µl de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 o 50 µl que contenían 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada uno de los oligonucleótidos cebadores (primers) y 0,05 unidades de polimerasa por µl de reacción. Cada enzima tiene su tampón específico proporcionado a 10 veces la concentración final de reacción y suplementado con MgCl<sub>2</sub>.

La cantidad de molde de ADN usado varió según el tipo de ADN molde 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 se quiso comprobar la clonación de un fragmento de ADN en un vector de *E. coli* se utilizó como molde 1 µl de una suspensión de células preparada a partir de la colonia original diluida en 10 µl de agua MilliQ estéril.

El termociclador utilizado para llevar a cabo las reacciones de amplificación fue el modelo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems. En el perfil del programa de PCR se incluyó una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguida de 35 a 40 ciclos de amplificación consistentes cada uno de ellos en una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, una segunda fase de anillamiento de los cebadores a la temperatura óptima de anillamiento de cada par de cebadores considerados, entre 48°C y 68°C dependiendo del cebador, durante 30 segundos y una tercera fase de extensión de 72°C durante entre 1 y 3 minutos dependiendo del tamaño de fragmento que se quiso amplificar. Como pauta general se programó 1 minuto 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 minutos.

La descripción de los oligonucleótidos utilizados en este estudio se encuentra detallada en la tabla 4. Las letras en minúscula corresponden a los cambios respecto a la secuencia original y el subrayado es el sitio de restricción de la enzima correspondiente en cada caso, que se indica en el nombre del oligonucleótido.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	GEN	DESCRIPCIÓN
HphAc	CGGGCAGTTCGGTTTCAGGC	<i>Hph</i>	Amplificación del gen de la higromicina
HphBc	CGTCTGGACCGATGGCTGTG	<i>Hph</i>	Amplificación del gen de la higromicina
FH1A	CGTATCAGTGTGAAGCG	<i>Bcfhg1</i>	Amplificación del gen de la flavohemoglobina
FH1B	TCCATAAATCCTCCCGG	<i>Bcfhg1</i>	Amplificación del gen de la flavohemoglobina
oFHOVEXF	CAttaaTTAAGATGGCACTCACACCT	<i>Bcfhg1</i>	Amplificación del gen de la flavohemoglobina
oFHOVEXPR	GAaGcgCgCCTATCACTGCGCTTCTC	<i>Bcfhg1</i>	Amplificación del gen de la flavohemoglobina
pBcActAR	GATCGTGGTCGTAGTAAATGGG	<i>BcActA</i>	Amplificación del gen de la actina
pBcActAF	CCGGCATAGACGTAGCTGCCAC	<i>BcActA</i>	Amplificación del gen de la actina
53120FKpnl	CGgTACcGATCACATAATAAC	BoFuT4_P053120.1	Diseño del plásmido pDS13 (flanco 5')
53120RHindIII	CAAgCTTCATACTATCAACAC	BoFuT4_P053120.1	Diseño del plásmido pDS13 (flanco 5')
53120FXbal	GtCtAGACGAAGGTCTCTTC	BoFuT4_P053120.1	Diseño del plásmido pDS13 (flanco 3')
53120RNotI	GTTGCGgCcgCTAAAAAC	BoFuT4_P053120.1	Diseño del plásmido pDS13 (flanco 3')
53120F	CGCCAAATCCCAAATAAGGG	BoFuT4_P053120.1	Selección de transformantes positivos en el flanco 5'
53120R	CATCTACTAGTAAAAGGTGTCG	BoFuT4_P053120.1	Selección de transformantes positivos en el flanco 3'
09022FKpnl	CGGtACCCACCGAAAGTTCC	BoFuT4_P059630.1	Diseño del plásmido pDS12 (flanco 5')
09022RHindIII	CGAAGCtTCGTGCTAGTTGG	BoFuT4_P059630.1	Diseño del plásmido pDS90 (flanco 5')
09022FXbal	GTTTcTAGATATTTCCCGG	BoFuT4_P059630.1	Diseño del plásmido pDS90 (flanco 3')
09022RNotI	gCGgCcGCATAGAAGCAAAG	BoFuT4_P059630.1	Diseño del

			plásmido pDS90 (flanco 3')
<b>I-SceIF</b>	GACAATCTCTGCATCCAAATG	BoFuT4_P059630.1	Selección de transformantes positivos en el flanco 5'
<b>I-SceIR</b>	GGAATGGCGATATACCGGATAC	BoFuT4_P059630.1	Selección de transformantes positivos en el flanco 3'
<b>I-SceIF</b>	TAGGGATAACAGGGTAAT-CTACAGTCCCTCGCAGCCATGC	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Diseño del plásmido pDS2 (flanco 5')
<b>attB1</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TAA-GAATGGGACGGCCATGTCCGCG	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Diseño del plásmido pDS2 (flanco 5')
<b>attB2</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TA-CTAGGGAGGTGCTGGGCGACCGG	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Diseño del plásmido pDS2 (flanco 3')
<b>I-SceIR</b>	ATTACCCTGTTATCCCTA-AGCAGCTCATGGAGCCGCCGC	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Diseño del plásmido pDS2 (flanco 3')
<b>DonorR</b>	GTAACATCAGAGATTTTGAGACACGG	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Verificación de la construcción (flanco 3')
<b>DonorFH</b>	ATCAGTTAACGCTAGCATGGATCTC	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Verificación de la construcción (flanco 5')
<b>OGG3F</b>	CCATCTAGATTCATCCCGAAGG	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Verificación de la construcción (flanco 3')
<b>OGG5F(2)</b>	CACCCGATCGAAGTCTATGCC	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Verificación de la construcción (flanco 5')
<b>NOS1F</b>	CCGCGGCGGTTCTCCAACT	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Amplificación de la región codificante
<b>NOS1R</b>	GGGTTACTCCAGCGACCCGT	NOS ( <i>Colletotrichum graminicola</i> )	Amplificación de la región codificante

### b. RT-PCR

Para la síntesis de cDNA 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 minutos 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 minutos a temperatura ambiente, se agitó un par de veces durante la incubación y se centrifugó a 10.000 g durante 1,30 minutos. 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 ésta 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 ADN copia (cDNA) a partir del ARN total tratado se utilizó el kit PrimeScript™ Takara. Esta enzima genera moléculas de cDNA de cadena sencilla que podrían ser utilizadas en procedimientos tales como PCR cuantitativa, o que servirán como molde para sintetizar la cadena complementaria dando lugar a las correspondientes copias de cDNA bicatenario.

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. En base a ella se realizaron los cálculos para los volúmenes necesarios en cada experimento. Se colocó la reacción en el termociclador a 37°C durante 15 minutos, luego a 85°C durante 5 segundos 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 cDNA para realizar con ella una PCR estándar (puede ser con los mismos oligos con los que se realizó la comprobación de la eficacia del tratamiento con Turbo DNase) y ver si hay amplificación o no. La amplificación efectiva en este caso demuestra que la síntesis de cDNA ha tenido lugar de forma satisfactoria y que la muestra puede ser utilizada en procedimientos posteriores tales como la PCR en tiempo real.

### c. PCR Cuantitativa

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. En primer lugar se diseñaron los cebadores tanto de los genes cuya expresión queremos estudiar como del control endógeno, en nuestro caso es el gen *BcactA* de *B. cinerea*. Los cebadores utilizados se describen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para amplificar los genes de interés por PCR Cuantitativa.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	GEN O ANOTACIÓN	DIRECCIÓN
<b>BactA-62F</b>	TTGCACCATCGTCGATGAAG	<i>BcactA</i> (Actina)	Forward
<b>BactA-131R</b>	CCACCAATCCAGACGGAGTATT	<i>BcactA</i> (Actina)	Reverse
<b>90F</b>	GAGGACTGCTGGAAATGCTG	Hypothetical protein	Forward
<b>90R</b>	GAATTAAGTCAAGTTCTCCTCAG	Hypothetical protein	Reverse
<b>53120F</b>	CAACCGACATGCCCAAACCGGA	similar to transcription factor Cys6	Forward

<b>53120R</b>	TGGCGATGCCAAGCGCCTTT	similar to transcription factor Cys6	Reverse
<b>9649F</b>	CGGAATCTGTGCAATTAATGG	similar to HEC/Ndc80p family protein	Forward
<b>9649R</b>	CAAGATTCTTCTGAATGTGAAC	similar to HEC/Ndc80p family protein	Reverse
<b>11188F</b>	GAGACTTTACGTGGTGATCC	similar to gi 24987775 pdb 1ML9 A Chain A	Forward
<b>11188R</b>	GGTCGAATATCCTCAATCGC	similar to gi 24987775 pdb 1ML9 A Chain A	Reverse
<b>08127F</b>	GCTCTCAGGAGAATCATTAAAG	Hypothetical protein	Forward
<b>08127R</b>	CTGTCTTTGCTCTCACATC	Hypothetical protein	Reverse
<b>02767F</b>	GATGCTAAGGAACATGCTTAC	similar to M-phase inducer phosphatase	Forward
<b>02767R</b>	CGATTTTGATCGACTGGGTG	similar to M-phase inducer phosphatase	Reverse
<b>10073F</b>	GGCAGTTCAGAAACATCTCC	similar to glutathione-S-transferase	Forward
<b>10073R</b>	CATATTTCAACGCCTGTGTAC	similar to glutathione-S-transferase	Reverse
<b>02149F</b>	CGTAGCGAGCATAAGTCTAC	similar to SDA1 domain-containing protein	Forward
<b>02149R</b>	CAACGTCATCATGAAATCTTC	similar to SDA1 domain-containing protein	Reverse
<b>13608F</b>	GCGTGACGAGACTACAATAC	Hypothetical protein	Forward
<b>13608R</b>	GAGGTATACTCTGCGTATATG	Hypothetical protein	Reverse
<b>9976F</b>	GAAGATGGTATCTGAGATTAAG	similar to nmrA-like family protein	Forward
<b>9976R</b>	GACTTTCCATCTTTGATTCAC	similar to nmrA-like family protein	Reverse
<b>12880F</b>	CGTGTTTCGCAAAACCAAATC	similar to isoflavone reductase family protein	Forward
<b>12880R</b>	CTCCCTTCTCATCTTCTCG	similar to isoflavone reductase family protein	Reverse

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos especiales para la detección de la fluorescencia en el equipo de PCR cuantitativa. Para la amplificación se utilizó el kit de KAPA que incluye la enzima en el buffer y solamente hubo que añadirle los cebadores correspondientes y completar el volumen establecido con agua MiliQ.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 10 µl por reacción, utilizando como molde 1 µl del cDNA amplificado de la forma que se explicó en el punto anterior. Se optimizó el procedimiento preparando en primer lugar una máster mix con el buffer y el agua MiliQ necesarias para el número de reacciones que tenemos planificadas, en nuestro caso fueron 90 reacciones en total (15 genes en 2 condiciones con 3 repeticiones cada uno). El cálculo de la



cantidad de buffer y agua MiliQ de la máster mix se realizó añadiendo una reacción más (91 reacciones en total) para evitar errores por pipeteo. Preparamos un tubo eppendorf de 1,5 ml por cada gen y lo marcamos de manera que incluya el gen, la condición y la repetición; para así evitar confusiones al momento de distribuir las muestras en la placa. Para 10  $\mu$ l se utilizaron 5  $\mu$ l de buffer y 3  $\mu$ l de agua MiliQ por cada reacción, por lo que la máster mix contenía 728  $\mu$ l en total (455  $\mu$ l de Buffer y 273  $\mu$ l de agua MiliQ), y se repartió 48  $\mu$ l a cada uno de los 15 tubos preparados. Seguidamente se añadieron 3  $\mu$ l de cada oligo, diluidos a una concentración final de 4  $\mu$ M, a cada uno de los 15 tubos, teniendo en cuenta el gen que se amplificar en cada caso. La mezcla de 54  $\mu$ l (48  $\mu$ l + 3  $\mu$ l del oligo Forward + 3  $\mu$ l del oligo Reverse) que tiene cada uno de los 15 tubos, se separó colocando la mitad de la reacción (27  $\mu$ l) en un tubo nuevo marcado adecuadamente, para de esta manera obtener la amplificación del gen en una de las dos cada condiciones. Finalmente se añadieron 3,5  $\mu$ l del cDNA correspondiente a cada uno de los 30 tubos y se repartieron 10  $\mu$ l de cada uno en tres pocillos de la placa, para así obtener las tres repeticiones propuestas inicialmente para cada gen y condición.

La placa se selló, se colocó en el termociclador y tanto las condiciones de la reacción como el registro y la visualización de los datos se llevaron a cabo con el programa StepOne™ software v2.2.2. El perfil de PCR utilizado fue: fase inicial a 95°C durante 20 segundos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos.

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método comparativo de la  $C_T$ . El  $C_T$ , o ciclo umbral, es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral o threshold. El umbral puede ser fijado automática o manualmente en la región exponencial de la gráfica de amplificación, por encima de la línea base o ciclos iniciales de la PCR (fluorescencia basal).

El software StepOne™ mide la amplificación del gen objetivo y del gen endógeno tanto en las muestras experimentales como en la muestra tomada como referencia. Para ello utiliza el método del  $\Delta\Delta C_t$ , en el que se comparan directamente los  $C_t$ s del gen objetivo y del gen de referencia ( $\Delta C_t$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta C_t$  de la muestras experimental con respecto a la muestra control. Cabe mencionar que para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares, hecho que se confirmó mediante la observación directa de las curvas de  $C_T$  de cada muestra una vez finalizada la PCR.

## 16. HIBRIDACIONES

### a. Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron por un método no radioactivo 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.

### b. 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.* (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: 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 minutos a la luz ultravioleta. Posteriormente, el se sumergió en la solución de desnaturalización (1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH) durante 15 minutos. Este paso se repitió una vez más con solución fresca y se lavó el gel con agua destilada durante 5 minutos. 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 minutos, repitiéndose éste 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 minutos.

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 (10 cm de espesor) 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 horas, 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 bolsas de plástico selladas. 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 hora a 65°C.

Se desnaturalizó la sonda a 95°C durante 10 minutos y se añadió a la bolsa de prehibridación. El conjunto se hibridó durante 16 horas 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 minutos por cada lavado y a temperatura ambiente. Después se lavó otras dos veces en 0,5X SSC/0,1% SDS durante 15 minutos a 65°C (en caso de hibridación homóloga). Se incubó 2 minutos 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 minutos. Posteriormente la membrana se incubó en 1X "Blocking solution" con 0,75 U/ $\mu$ l de anticuerpo antidigoxigenina (Roche) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente en tampón de lavado y se incubó durante 3 minutos 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 cm<sup>2</sup> de membrana. Posteriormente, se incubó la misma durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se procedió a detectar la quimioluminiscencia en el equipo de detección Intelligent Dark Box II de Fujifilm.

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 ésta solución. Se dejó enfriar la solución y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre una pieza de papel Whatmann.

### c. Western Blot

La inmunodetección de proteínas por Western Blot se realizó en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) en el laboratorio a cargo del Dr. Pedro San Segundo, dada la disponibilidad de equipamiento y reactivos.

Los extractos de proteínas se separaron por SDS-PAGE como se indica en el apartado 13.c. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Whatman) mediante el método sumergido o húmedo utilizando el equipo de Western Blot de Biorad. Las membranas fueron bloqueadas durante 30 minutos mínimo, con una solución de BSA (Bovine Serum Albumin) al 5% en TBST 1X (50 mM Tris, 150 mM NaCl y 0,05 Tween 20) para aquellos ensayos que requerían inmunodetección por anticuerpos anti-cdk18 fosforilada. Como control de carga se escogió a la  $\alpha$ -tubulina y para su bloqueo se utilizó leche desnatada al 5% en TBST 1X.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:  $\alpha$ -tubulina mouse disuelto en leche en una concentración de 1:20000 y  $\alpha$ -cdc28 fosforilada rabbit disuelto en BSA en una concentración 1:1000. Cada membrana se incubó en con el anticuerpo respectivo durante toda la noche a 4°C. Previa la incubación de cada membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, se realizaron 3 lavados con TBST 1X durante 15 minutos, de cada una.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:  $\alpha$ -mouse Horseradish Peroxidase Linked (HRP), en una concentración 1:30000 preparada en leche al 5% y  $\alpha$ -rabbit Horseradish Linked (HRP) en una concentración 1:1000 preparada en BSA al 5%. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Las membranas se revelaron usando el kit de detección Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

## 17. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Para realizar el análisis de expresión diferencial, se solicitó los servicios de la casa comercial Nimblegen. Esta empresa, en colaboración con el Consorcio de laboratorios que participaron en la secuenciación y anotación de los genomas de las cepas de *B. cinerea* B05.10 y T4 y de la cepa 1980 de *Sclerotinia sclerotiorum*, diseñó el chip de ADN utilizado en este trabajo. Las características del mismo se describe en Anselem *et al.* (2011). La empresa Nimblegen llevó a cabo todos los procedimientos experimentales necesarios, en particular la síntesis del cDNA, los marcajes de las sondas, las hibridaciones y la normalización de los datos obtenidos, generando las tablas finales de expresión que son facilitadas para cada condición al usuario. Estas tablas constituyen el material de partida en nuestro análisis de expresión génica global llevado a cabo como se describe a continuación.

Se realizó la extracción de ARN como se indica en el apartado 9.c. Adicionalmente se realizó una purificación con las columnas de kit RNeasy® Plant Mini (50) de Qiagen para obtener ARNs de alta calidad.

Se midió la concentración de ARN, así como los ratios 260/280 y 260/230 mediante el espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-100). Nimblegen, como parte de sus requerimientos, solicitó una concentración de ARN de 1 µg/µl, así como unos ratios 260/280 y 260/230 ≥ 1,8.

Además se visualizaron los ARNs en geles de agarosa al 1% en condiciones denaturalizantes, para constatar que no presentaban degradación y que se observaban intactas las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos 18S y 28S.

### a. Diseño Experimental

Se propusieron 8 tratamientos en el análisis de expresión diferencial, descritas en la tabla 6.

**Tabla 6.** Descripción de los tratamientos llevados a cabo en el análisis de expresión diferencial.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
1	Micelio de la cepa B05.10 de 20 horas
2	Micelio de la cepa B05.10 de 20 horas expuesto a NO
3	Esporas de la cepa B05.10 de 6 horas
4	Esporas de la cepa B05.10 de 6 horas expuestas a NO
5	Esporas de la cepa mutante en la flavohemoglobina $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ de 6 horas
6	Esporas de la cepa mutante en la flavohemoglobina $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ de 6 horas expuestas a NO
7	Esporas de la cepa VeE2.1, control de la transformación de <i>B. cinerea</i> para obtener el mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , de 6 horas
8	Esporas de la cepa B05.10 de 6 horas expuestas a CPTIO

Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento (A, B, C). Tanto las esporas como los micelios guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  son los materiales biológicos que se utilizaron para las extracciones de ARN indicadas anteriormente.

#### b. Análisis de las comparaciones 3vs4 y 5vs6vs7

En esta investigación se realizó el análisis de 2 de las 8 comparaciones diseñadas en análisis de expresión génica diferencial descrito en el punto anterior. Se eligió la comparación 3vs4 (esporas de 6 horas de la cepa VeE2.1 expuestas y no expuestas a NO) dado que nos encontramos principalmente interesados en factores de transcripción que respondan a NO y que puedan estar implicados en los procesos de señalización mediados por NO principalmente en el estadio de esporas.

En cuanto a la comparación 5vs6vs7 (esporas de 6 horas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  expuestas y no expuestas a NO comparadas con esporas de 6 horas de la cepa VeE2.1), ésta fue seleccionada para su análisis para obtener información sobre el efecto del NO en un sistema desprotegido frente a dicho compuesto en los primeros estadios de crecimiento de *B. cinerea*.

Primeramente se realizó un chequeo de la calidad de los datos obtenidos a partir de las hibridaciones llevadas a cabo sobre las copias correspondientes del microarray preparado por la casa comercial Nimblegen con las sondas derivadas de las muestras de ARN obtenidas en las condiciones experimentales objeto de estudio.

Una vez comprobado que los datos facilitados por la empresa cumplían con los parámetros exigidos para que puedan ser procesados, se obtuvieron listas de genes diferencialmente expresados en ambos casos teniendo en cuenta los valores de p-value y fold change que describan mejor el panorama general que se nos presenta en cada comparación. Se determinaron, además, los genes que se encuentran infra regulados o sobre regulados de acuerdo a la condición que se determinó como base para la comparación.

A partir de estas listas se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional en categorías de Gene Ontology (GO) para determinar cuáles son aquellas categorías enriquecidas en nuestras series de datos. Adicionalmente, se realizaron varias representaciones gráficas de los genes diferencialmente expresados; a modo de heat map, diagramas de Venn o con polígonos para poder visualizar mejor las variaciones en los niveles de expresión encontradas en cada comparación. Los paquetes informáticos utilizados en cada fase de este análisis se presentan en la sección 21 de este capítulo.

Con genes representativos de las series de genes identificados como genes diferencialmente expresados, y en particular los genes seleccionados para análisis posteriores, se realizó una PCR cuantitativa con el objeto de comprobar sus niveles de expresión en ambas condiciones y constatar que efectivamente su expresión cambia en una condición con respecto a la otra de forma estadísticamente significativa.

## **18.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  $\mu$ l.

## 19. DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Para la detección de NO en los experimentos llevados a cabo con esporas y micelio de *B. cinerea* y *C. colletotrichum* se utilizaron dos métodos:

### a. Fluorimetría

Para detectar y cuantificar la cantidad de NO presente en determinadas muestras biológicas se hizo uso de procedimientos fluorimétricos. Para ello las muestras biológicas fueron tratadas con DAF-2DA (4,2-diamino fluoresceína diacetato), compuesto químico que reacciona con el NO dando lugar a la formación del compuesto altamente fluorescente triazolfluoresceína. La fluorescencia emitida fue cuantificada en un Fluorímetro TECAN modelo Spectra Fluor seleccionado una longitud de onda de emisión de 515 nm y una longitud de onda de detección de 495 nm.

Los tratamientos llevados a cabo son los descritos en la tabla 7.

**Tabla 7.** Cepas y tratamientos utilizados en los experimentos de detección de NO mediante fluorimetría.

NOMBRE	TRATAMIENTO	CEPAS UTILIZADAS
<b>DAF 5</b>	Medio PDB - Micelio 20 horas	VeE2.1 <i>ΔBcfhg1</i> - α7.2 pLOB 14.3 <i>ΔBcniΔ3</i> <i>ΔBcass1-54</i>
<b>DAF 6</b>	Medio Sales B5 Gamborg's suplementado con Sacarosa 10 mM y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH 6,5 - Esporas 5 horas	VeE2.1 <i>ΔBcfhg1</i> - α7.2 pLOB 14.3 <i>ΔBcniΔ3</i> <i>ΔBcass1-68</i>
<b>DAF 7</b>	Medio Sales B5 Gamborg's suplementado con Sacarosa 10 mM y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH 6,5 - Micelio 18 horas	VeE2.1 <i>ΔBcfhg1</i> - α7.2 pLOB 14.3 <i>ΔBcniΔ3</i> <i>ΔBcass1-68</i>
<b>DAF 8</b>	Medio Malt Extract Broth – Esporas 5 horas	VeE2.1 <i>ΔBcfhg1</i> - α7.2 pLOB 14.3 <i>ΔBcniΔ3</i>



En los experimentos DAF6 y DAF8, se incubaron las esporas de cada cepa de interés en una concentración de  $5 \times 10^5$  esporas/ml durante 5 horas a 22°C a 180 r.p.m en 100 ml del medio especificado en la tabla. Seguidamente se recogió 1 ml del cultivo en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 8.000 r.p.m. por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y se repitió el procedimiento 2 veces más en el mismo tubo. EL sedimento final se resuspendió en 600  $\mu$ l de Tris HCl 10 mM pH 7,5. Se añadieron 1,2  $\mu$ l de DAF-2DA 5 mM para obtener una concentración final de DAF-2DA de 10  $\mu$ M y las muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se dispuso en 3 alícuotas de 200  $\mu$ l cada una (D) en la placa microtiter negra de 96 pocillos. Paralelamente se colocaron 3 alícuotas del buffer Tris HCl pH 7,5 (B) como control así como 3 alícuotas de medio de cultivo con esporas no teñidas con DAF-2DA (E). La placa se llevó al fluorímetro Spectra Fluor (Tecan) para la lectura de la fluorescencia en cada pocillo, con mediciones cada 5 minutos durante 12 ciclos (1 hora). El resto del cultivo (94 ml aproximadamente) se centrifugó 2 veces a 3000 r.p.m. por 7 minutos en tubos de 50 ml, se desechó el sobrenadante y los sedimentos de micelio se secaron en la estufa a 65°C en los tubos de recogida sin la tapa durante 48 horas para estimar el peso seco.

En los experimentos DAF5 y DAF9, el día anterior a la medición se pusieron a incubar las esporas en una concentración de  $5 \times 10^5$  esporas/ml durante 20 horas a 22°C a 180 r.p.m. en 100 ml del medio especificado en la tabla. Se siguió el mismo procedimiento que en los experimentos DAF6 y DAF8 para la preparación de las alícuotas de 200  $\mu$ l de cada cepa, pero en este caso el control es micelio sin teñir con DAF-2DA. De la misma forma, las muestras se dispensaron en la placa microtiter de 96 pocillos y ésta fue colocada en el fluorímetro para realizar las mediciones durante 1 hora en las condiciones descritas en el párrafo anterior. Se procedió con el resto del cultivo como se indicó anteriormente.

La distribución de las cepas en la placa para cada tratamiento se realizó como se muestra en la Figura 8.

## ESQUEMA GENERAL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	E	D		B	E	D		B	E	D	
B												
C												
D												
E	B	E	D		B	E	D					
F												
G												
H												

## DAF 5

	VeE2.1
	$\Delta Bcass1-54$
	$\Delta Bcni\alpha\delta3$
	$\Delta Bcfhg1 - \alpha7.2$
	pLOB 14.3

## DAF 6 y 7

	VeE2.1
	$\Delta Bcass1-68$
	$\Delta Bcni\alpha\delta3$
	$\Delta Bcfhg1 - \alpha7.2$
	pLOB 14.3

## DAF 8

	VeE2.1
	pLOB 14.3
	$\Delta Bcni\alpha\delta3$
	$\Delta Bcfhg1 - \alpha7.2$

**FIGURA 8.** Distribución de las cepas en las placas microtiter para cada experimento (DAF 5, 6, 7 y 8). B=Buffer Tris HCl 7,5; E=Esporas/Micelio sin DAF; D=Esporas/Micelio teñidos con DAF.

El programa RdrOle Shell Setup and Service Tool for Tecan Reader V 4.5 fue utilizado para la lectura de las placas y para la recolección de los datos. Los parámetros utilizados se describen en la tabla 8.

**Tabla 8.** Parámetros utilizados en la medición de NO con el fluorímetro.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Plate definition file	GRE96fb.pdf
Measurement mode	Fluorescence
Read mode	Top
Excitation filter	485 nm
Emission filter	535 nm
Number of flashes	6
Gain (Optimal)	70
Shaking before measurement	10 s
Shaking between measurement	60 s

Una vez terminada la lectura, se lavó la placa y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos fueron exportados del programa en una plantilla Excel y las cantidades de fluorescencia fueron determinadas en base al peso seco, obteniendo el valor para cada cepa en Unidades de fluorescencia/miligramo de peso seco. Para ello, en primer lugar, se restó el

valor del control de esporas/micelio sin teñir con DAF-2DA (E) del valor de esporas/micelio teñidos con DAF-2DA (D). De ésta manera se obtuvo el valor de Unidades de fluorescencia/ ml de medio. En segundo lugar, se tomó el dato del peso seco en miligramos correspondiente a los 94 ml y se determinó su valor aproximado para 100 ml. Éste valor se dividió para 100 para obtener el peso seco en miligramos por ml de medio. Finalmente se dividió el valor de unidades de fluorescencia/ml de medio para el valor del peso seco/ml de medio (FLU/MG).

Con los datos así obtenidos se realizaron las gráficas por cada experimento, comparando los promedios de las 3 repeticiones de los valores FLU/MG de cada cepa con su respectiva desviación estándar.

### b. Microscopía de fluorescencia

Para detectar la presencia del NO mediante microscopía de fluorescencia se utilizó el DAF-2DA como agente de tinción. El análisis *in vitro* de la producción de NO se realizó sobre esporas o micelio de *B. cinerea* y *C. graminicola*. Para el primer hongo, se cultivaron esporas o micelio en 100 ml de medio Gamborg's B5 suplementado con Sacarosa 10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 6,5 a 22°C y a varios tiempos de incubación dependiendo del experimento. Para el segundo hongo, se cultivaron esporas o micelio en 100 ml de medio PDB a 22°C durante 4 horas. Para ambos microorganismos, se recogió 1 ml del cultivo en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadió 0,5 ml de Tris HCl pH 7,5 10 mM y 1  $\mu\text{l}$  de DAF-2DA 5 mM, y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las esporas tratadas se lavaron una vez en tampón 10 mM Tris HCl pH 7,5 y se hicieron preparaciones de la suspensión resultante para su observación al microscopio. El procedimiento fue el mismo en el caso de esporas en germinación de *C. graminicola*. En este sistema las esporas fueron cultivadas en agitación a 180 r.p.m. en medio PDB y las muestras fueron tomadas a las cuatro horas de cultivo.

La visualización de la fluorescencia del agente de tinción se realizó con el microscopio LEICA DMLB y las fotografías se tomaron con la cámara LEICA DC300F adaptada al equipo. El filtro utilizado para la excitación y detección fue el que permite detectar la GFP.

## 20. MICROSCOPIA

Para la tinción, y posterior recuento de núcleos en esporas de *B. cinerea*, se llevaron a cabo tinciones con el agente colorante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (NucBlue® Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent, Life Technologies). DAPI es un marcador fluorescente que puede pasar a través de la membrana celular y por ello se utiliza para teñir núcleos tanto en células vivas como fijadas.

Para fijar las esporas de *B. cinerea*, se cultivaron  $5 \times 10^5$  esporas/ml de la cepa VeE2.1 y de la cepa mutante en la flavohemoglobina  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en 15 ml de  $\frac{1}{2}$  PDB en una caja Petri. Para el tratamiento de exposición a NO exógeno, se utilizó el donador de NO DETA (Diethylenetriamine, Sigma) que fue añadido al cultivo a una concentración final de 250  $\mu$ M.

Se pusieron tantas cajas como tiempos de germinación se iban a analizar en cada experimento. Se utilizaron cajas Petri porque en cultivo líquido en agitación al germinar las esporas éstas se van agregando y es muy difícil observarlas de forma individualizada para poder contarlas. En cultivo estático es mucho más fácil obtenerlas separadas para que la tinción y la subsiguiente observación al microscopio sea óptima.

Pasado el tiempo de incubación, se recogieron los 15 ml de medio con centrifugaciones sucesivas de 3.000 r.p.m. por 5 minutos cada una. Se lavaron los tubos 2 veces con 1 ml de agua MiliQ y se realizó la misma centrifugación que en el paso anterior.

Se preparó la solución de fijación que consistió en etanol 100% y ácido acético en una proporción 3:1 en cantidad suficiente para cada una de las muestras que queremos fijar. Se eliminó el sobrenadante de la última centrifugación de lavado y se colocó 1 ml de la solución de fijación a cada tubo. Las muestras se conservaron así a 4°C durante toda la noche.

Después del proceso de fijación, se centrifugaron los tubos a 3.000 r.p.m. por 5 minutos, se lavaron 2 veces con 1 ml de agua MiliQ y la misma centrifugación. Finalmente se resuspendió en 1 ml de agua MiliQ.

Para la tinción de las esporas, se añadieron a cada tubo 2 gotas de la preparación comercial del colorante DAPI y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se lavó cada muestra con 1 ml de agua MiliQ y se sedimentaron las células mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. por 5 minutos. Se repitió el lavado y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron las esporas en 1 ml de glicerol al 25%.

Para la observación al microscopio de fluorescencia, se colocaron 10  $\mu$ l de la suspensión de esporas fijadas en glicerol en cada uno de los extremos de un portaobjetos. Cubrimos con un cubreobjetos y sellamos los bordes con esmalte de uñas transparente con el objeto de mantener las esporas a largo plazo.

Se esperó unos 15-20 minutos a que los portaobjetos se secan completamente, y éstos fueron colocados en microscopio de fluorescencia en el que se seleccionó el para la observación el filtro específico para DAPI. Se tomaron fotografías de aproximadamente 50 esporas por tratamiento, con varios planos de enfoques dado que determinar el número

exacto de núcleos en cada espora en *B. cinerea* es complicado por el hecho de ser estructuras multinucleadas. Se construyó una tabla con los datos obtenidos y se comparó el número de núcleos a los tiempos seleccionados para el análisis entre la cepa VeE2.1 y  $\Delta Bcfhg1 - \alpha 7.2$ .

## 21. ANÁLISIS DE LOS DATOS

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.

Las bases de datos de genomas y proteínas se utilizaron a través de páginas web. 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" (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative>). En cuanto a la secuencia del genoma de la cepa T4 de *B. cinerea*, se recurrió a la página del URGI (Unité de Recherche Génomique Info) perteneciente al INRA francés, en el apartado de Genome Report System.

El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con varios programas: DNASTAR'S ArrayStar 4.1 fue utilizado para la verificación de la reproducibilidad de las réplicas biológicas de cada condición del microarray, ArrayQualityMetrics 3.14.0 (Kauffmann *et al.*, 2009) fue utilizado para la verificación de la calidad de los datos, Limma (Smyth, 2005) fue utilizado para determinar los genes diferencialmente expresados en las comparaciones de interés y Voronto (Santamaria and Pierre, 2012) fue utilizado para visualizar estas listas de genes. Para identificar enriquecimiento funcional en categorías de Gene Ontology (GO) de los genes identificados como diferencialmente expresados se utilizó el paquete MGSA (Bauer and Gagneur, 2011).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Statistix 10. El manejo de la bibliografía se realizó utilizando el programa EndNote® X.0.2. El diseño gráfico y la edición de imágenes se llevaron a cabo con Adobe Photoshop 7.0 y Microsoft Office Picture Manager. El programa ImageJ 1.47V se utilizó para la edición de imágenes obtenidas para el conteo de núcleos en esporas de *B. cinerea*.

La visualización de imágenes de membranas marcadas con quimioluminiscencia se realizó con el aparato LAS-100 Plus (Fujifilm). En el caso de geles teñidos con bromuro de etidio se utilizó el programa AlphaImager Mini.

# RESULTADOS

---





## 1. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE NO EN *B. cinerea* Y EN *C. graminicola*

### a. Aproximación genética en *B. cinerea*

La producción de NO ha sido descrita en numerosos sistemas vivos pertenecientes a todos los grupos taxonómicos. Tradicionalmente la mayor parte de los estudios encaminados a la determinación de los mecanismos implicados en esta producción se han llevado a cabo en sistemas animales, en los cuales la producción de NO es consecuencia de la actividad de enzimas de tipo NOS perfectamente caracterizadas. Estas enzimas determinan la oxidación de la L-arginina a L-citrulina produciendo NO. Se ha descrito la producción de NO también en plantas. Sin embargo, y a pesar de las evidencias obtenidas inicialmente y de los esfuerzos dedicados a este tema, ha sido imposible identificar una enzima tipo NOS en el reino vegetal. Se ha comprobado, sin embargo, que la producción de NO en consecuencia, al menos en parte, de la actividad de la enzima NR que genera NO en el proceso de reducción del nitrato.

En los últimos años se han ido acumulando evidencias que indican que también los microorganismos pueden producir NO, concretamente los hongos. No obstante, los estudios en este grupo de organismos a este respecto son mucho más limitados. En el caso de *B. cinerea* la producción de NO ha sido descrita en los últimos años en varios trabajos, pero en ningún caso se han presentado datos que resulten concluyentes sobre el/los mecanismo/s implicado/s en esta producción. En nuestro grupo de investigación, y tratando de determinar el mecanismo de producción de NO en *B. cinerea*, hemos considerado la posible existencia y participación de ambos sistemas enzimáticos, el basado en enzimas de tipo NOS convencionales y el basado en la enzima NR. Trabajos recientes llevados a cabo en este contexto en el laboratorio de Genética del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias haciendo uso de procedimientos basados en la utilización de un electrodo de NO han indicado que en *B. cinerea* la capacidad de producción de NO de forma inducible no es dependiente de una enzima NOS de tipo convencional y que el posible sistema basado en una enzima NR no es el principal sistema responsable de la misma en este sistema (Turrión-Gómez *et al.*, 2011).

Los procedimientos basados en la utilización del electrodo de NO presentan ciertas limitaciones técnicas. Por esta razón, en este trabajo decidimos aplicar una estrategia genética basada en la utilización de mutantes de *B. cinerea* deficientes en genes que forman parte de las rutas implicadas en uno y otro sistemas enzimáticos en combinación con procedimientos que permiten la detección de NO mediante fluorimetría. Con este objeto se diseña una batería de experimentos centrados en la cuantificación de la cantidad de NO producido por esporas en germinación y por micelio en desarrollo de distintas cepas de *B. cinerea* de genotipos particulares. Para ello, estas unidades biológicas, bien las esporas, bien micelio en desarrollo, serían tratadas con DAF-2DA, agente químico que reacciona específicamente con el NO emitiendo fluorescencia cuando se excita con luz de longitud de onda adecuada (495 nm), fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada con un fluorímetro (longitud de onda de emisión: 515 nm).

Las cepas de *B. cinerea* seleccionadas para su utilización en este trabajo fueron las siguientes (el origen de las cepas se describe en la sección 1.b de Materiales y Métodos):

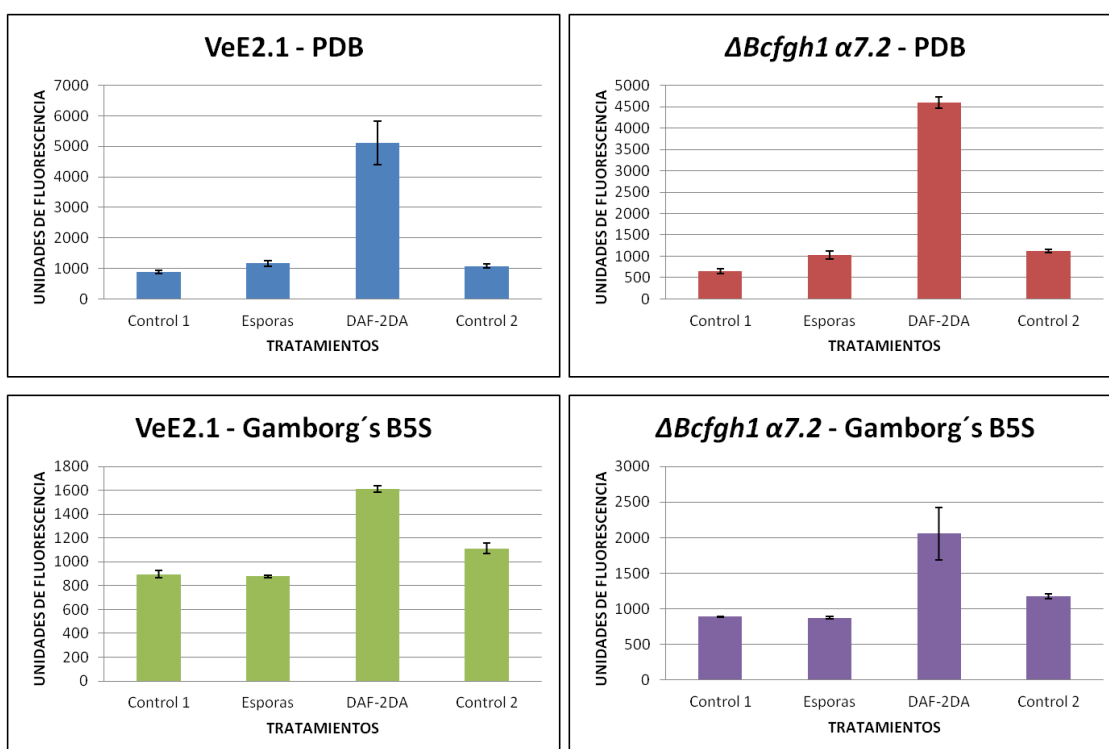
- VeE2.1: cepa de referencia
- $\Delta Bcni\Delta-3$ : Cepa mutante deficiente en el gen codificador de la enzima nitrato reductasa
- $\Delta Bcass1-54$  y  $\Delta Bcass1-68$ : 2 cepas mutantes independientes ambas deficientes en el gen codificador de la enzima argininosuccinato sintasa
- pLOB 14.3: cepa deficiente en la actividad de la enzima argininosuccinato sintasa obtenida mediante silenciamiento génico
- $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ : cepa mutante deficiente en el gen *Bcfhg1*, codificador de la enzima flavohemoglobina BCFHG1

Inicialmente se comprobó que con el fluorímetro es posible detectar la fluorescencia emitida por el DAF-2DA cuando éste reacciona con el NO producido, sea por esporas o por micelio en desarrollo. Con este objeto se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares (no descritos) para determinar la cantidad de material biológico necesario y los estadios de desarrollo más adecuados, así como la concentración de DAF-2DA apropiada, para obtener valores de fluorescencia detectables con el fluorímetro. Se determinó así que trabajando con cultivos de  $5 \times 10^5$  esporas/ml en medio de cultivo PDB o Gamborg's B5S, tomando muestras en la fase de germinación de esporas (5 horas de cultivo en agitación) o crecimiento activo de micelio (20 horas de cultivo) en volúmenes de 1 ml, y utilizando concentraciones de trabajo de 10  $\mu$ M de DAF-2DA es posible detectar fluorescencia con el fluorímetro en el rango de detección del equipo.

Establecidas estas condiciones experimentales de carácter básico, se realizaron entonces varios experimentos iniciales en donde pudimos comprobar que, efectivamente, es posible detectar la producción de NO utilizando el agente colorante mencionado. En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos en una serie de experimentos representativos llevados a cabo con este fin, en los cuales se incluyeron las cepas VeE2.1 y  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  que fueron analizadas en el estado de espора en germinación (5 horas de cultivo en agitación) en dos medios de cultivo diferentes, medio Gamborg's B5S y medio PDB (los mismos resultados, con variaciones menores, han sido obtenidos en repeticiones de esta serie de experimentos). En los histogramas de la figura 9 se presenta la fluorescencia detectada por el fluorímetro en los diferentes tratamientos de prueba propuestos: Control 1 = buffer Tris HCl 10 mM, Esporas = buffer Tris HCl 10 mM con esporas de 5 horas de cultivo líquido en medio PDB ó en medio Gamborg's B5S, DAF-2DA = esporas de 5 horas de cultivo líquido en medio PDB o medio Gamborg's B5S con DAF-2DA 10  $\mu$ M; y Control 2 = Buffer Tris HCl 10 mM con DAF-2DA 10  $\mu$ M. Se comprueba en primer lugar que el fluorímetro detecta una fluorescencia basal en el propio buffer utilizado para llevar a cabo las mediciones (Control 1) en todas las situaciones evaluadas, fluorescencia que tendría que ser sustraída, en su caso, de la fluorescencia detectada en las muestras biológicas analizadas para estimar la fluorescencia debida a la muestra biológica objeto de estudio en cada caso. La adición únicamente de esporas (Esporas) o del agente de detección específico de NO (Control 2) determina valores de fluorescencia similares a los de la situación Control 1, lo que indica que tanto las esporas como el agente de DAF-2DA por sí solos no emiten fluorescencia alguna. En las muestras en las que se incluye

simultáneamente esporas y DAF-2DA (DAF-2DA) se detectan valores de fluorescencia superiores a los correspondientes a la fluorescencia basal, observación indicativa de que las unidades biológicas que están siendo analizadas en nuestros experimentos producen NO y de que es posible detectar esta producción mediante fluorimetría.

Del estudio comparativo de las situaciones analizadas es posible deducir que en cada uno de los dos medios de cultivo, PDB o Gamborg's B5S, las esporas de una cepa y otra alcanzan un estado fisiológico en el que ambas producen cantidades muy similares de NO, puesto que las UF detectadas alcanzan valores muy parecidos. Así, en PDB la cepa VeE2.1 muestra valores de aproximadamente 5.000 UF con un valor de fluorescencia basal de 1.100 UF y la cepa  $\Delta Bcfgh1 \alpha 7.2$  muestra valores de aproximadamente 4.500 UF con un valor de fluorescencia basal de 1.000. Por su parte, en medio Gamborg's B5S la cepa VeE2.1 muestra valores de aproximadamente 1.600 UF sobre una fluorescencia basal de 900 UF y  $\Delta Bcfgh1 \alpha 7.2$  muestra valores de 2.000 UF aproximadamente sobre una fluorescencia basal de 900-1.100 UF. Es posible deducir que en cada medio en particular las dos cepas parecen producir niveles similares de NO.



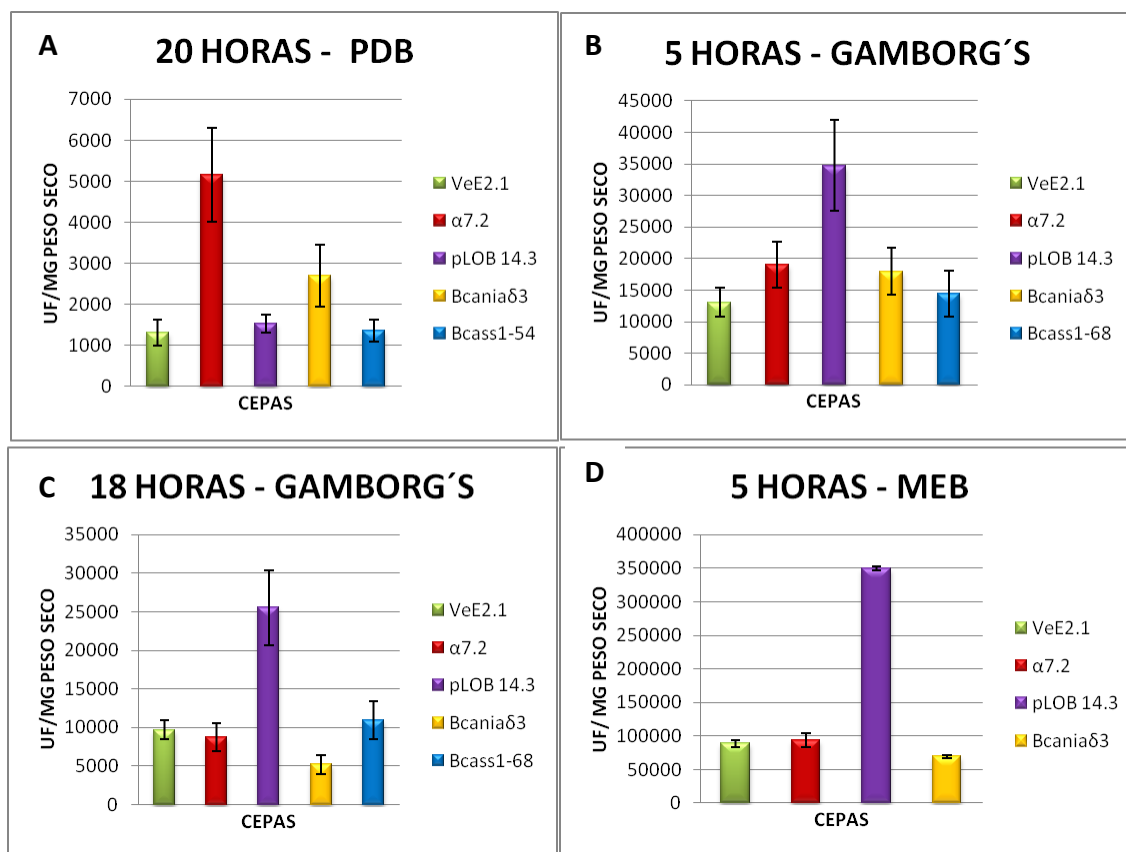
**FIGURA 9.** Fluorescencia (en Unidades de Fluorescencia, UF) detectada con el fluorímetro para cuantificar autofluorescencia y fluorescencia emitida cuando el NO producido por las esporas del hongo reaccionan con el agente colorante DAF-2DA en las condiciones indicadas (cepa y medio de cultivo). En cada histograma las muestras son: (Control 1), buffer Tris HCl 10 mM; (Esporas), buffer Tris HCl 10 mM con esporas de 5 horas de cultivo en agitación; (DAF-2DA), esporas de 5 horas con DAF-2DA 10  $\mu$ M; y (Control 2), buffer Tris HCl 10 mM con DAF-2DA 10  $\mu$ M.

No obstante es interesante destacar que los valores de fluorescencia que se detectan en muestras derivadas de cultivos de esporas en medio PDB son siempre mayores que los valores detectados en muestras derivadas de cultivos de esporas en medio Gamborg's B5S, lo que supone que el medio de cultivo en el que las esporas germinan influye en la cantidad de NO que producen.

Una vez comprobado que es posible detectar la producción de NO mediante fluorimetría, se decidió tratar de determinar la producción de NO en una colección de cepas mutantes de *B. cinerea* alteradas en genes que participan en las posibles rutas de producción de NO descritas en distintos grupos de organismos y, mencionadas en párrafos anteriores. Como paso previo a su utilización en los experimentos de detección de la producción de NO por parte de las mismas, se verificó el genotipo de todas las cepas mutantes utilizadas mediante su cultivo en medios selectivos.

Se diseñó entonces una batería de experimentos cuyo objetivo fundamental fue la detección de la existencia de diferencias significativas entre la cantidad de NO producido por las cepas mutantes seleccionadas en comparación con la cepa silvestre de referencia, producción de NO estimada mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por muestras biológicas derivadas de cultivos de cada cepa en presencia de DAF-2DA. Los procedimientos para llevar a cabo estos experimentos se describen en el apartado 20.a de Materiales y Métodos. Se escogieron 4 condiciones tomando en cuenta el tipo de medio de cultivo utilizado para cultivar las esporas y el tiempo de incubación de las mismas. En los experimentos DAF6 y DAF8, las esporas se incubaron durante 5 horas en cultivo en agitación utilizando para ello medio Gamborg's B5S en el primer caso, y medio MEB en el segundo caso. En los experimentos DAF5 y DAF7, las esporas se incubaron durante 20 horas en medio PDB y 18 horas en medio Gamborg's B5S, respectivamente. Las cepas analizadas en todos los casos fueron la cepa silvestre VeE2.1, la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , deficiente en la enzima flavohemoglobina, la cepa  $\Delta Bcni\Delta-3$ , cepa mutante deficiente en el gen codificador de la enzima nitrato reductasa, la cepa  $\Delta Bcass1-68$ , cepa mutante deficiente en el gen codificador de la enzima argininosuccinato sintasa (no probado en el experimento DAF8 presentado en el panel D) y el transformante pLOB 14.3, que representa una cepa deficiente en la actividad de la enzima argininosuccinato sintasa obtenida mediante silenciamiento génico.

En la Figura 10 se presentan 4 histogramas correspondientes a un experimento representativo de cada una de las condiciones previamente establecidas.



**FIGURA 10.** Comparación de la cantidad de NO (en UF/mg de peso seco) producida por las cepas mutantes de *B. cinerea* que participan en las dos principales rutas de producción de NO y medida por la fluorescencia emitida cuando el colorante DAF-2DA reacciona con el NO producido por las esporas del hongo. (A) Experimento DAF5, esporas de las cepas seleccionadas incubadas durante 20 horas en medio PDB; (B) Experimento DAF6, esporas de las cepas seleccionadas incubadas durante 5 horas en medio Gamborg's B5S; (C) Experimento DAF7, esporas de las cepas seleccionadas incubadas durante 18 horas en medio Gamborg's B5S; (D) Experimento DAF8, esporas de las cepas seleccionadas incubadas durante 5 horas en medio MEB.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos resulta ciertamente complicado interpretar la situación que se plantea y sugerir la participación o la implicación de forma principal de alguna de las dos rutas enzimáticas, representadas por las cepas mutantes de *B. cinerea* utilizadas en estos experimentos, en la producción de NO por parte del hongo. Debemos indicar que cada uno de los experimentos cuyos datos se presentan en la Figura 10 ha sido repetido al menos una vez más, y que, aunque la situación presentada muestra la tendencia observada en cada caso, es cierto que los resultados obtenidos no han sido realmente reproducibles. Dicho esto, la interpretación de los resultados en cualquier caso es difícil. Los paneles B y D corresponden a un mismo estado fisiológico, esporas en germinación (5 horas de cultivo en agitación). En los dos medios probados, Gamborg's B5S y MEB, no se observan diferencias significativas entre los niveles de producción de NO de la cepa silvestre VeE2.1 y las cepas mutantes analizadas, deficientes bien en el enzima flavohemoglobina ( $\Delta Bcfhg1$   $\alpha 7.2$ ), en la enzima argininosuccinato sintasa ( $\Delta Bcass-68$ ) (esta cepa no probada en el medio

MEB) o en la enzima NR ( $\Delta BcniA\Delta-3$ ). Cabría concluir que ni la ruta dependiente de la arginina ni la ruta dependiente de la enzima NR son responsables de la producción de NO en *B. cinerea* cuando el hongo se encuentra en fase de germinación. Una situación similar se observa con micelio de 18 horas en medio Gamborg's B5S. Pero llama la atención que en los tres casos se observe un aumento significativo de los niveles de fluorescencia detectada (NO producido) en la cepa pLOB 14.3, la cepa derivada del silenciamiento génico de la enzima codificada por el gen *Bcass1*. Sería esperable un comportamiento similar en el mutante  $\Delta Bcass1-68$  y en el transformante pLOB 14.3, puesto que en ambos casos la actividad argininosuccinato sintasa debe estar sensiblemente alterada (reducida). Y el comportamiento esperable en cualquier caso sería el de una reducción de la cantidad de fluorescencia detectada (NO producido), no un aumento importante. En el panel A la situación que se observa es diferente. En el micelio cultivado durante 20 horas en medio PDB, la cepa silvestre, la cepa silenciada en el gen *Bcass1* y la cepa  $\Delta Bcass1-68$  no muestra diferencias significativas en los niveles de fluorescencia detectados. Por su parte, la cepa  $\Delta BcniA\Delta-3$  produce mayores niveles de fluorescencia que las tres cepas mencionadas anteriormente y la cepa alterada en la enzima BCFHG1 es la que produce, con diferencia, más fluorescencia.

Es posible resumir estas observaciones indicando que el comportamiento de las distintas cepas en esta batería de experimentos se muestra muy variable en función del medio de cultivo y del estado de desarrollo. Parte de esta variación podría justificarse asumiendo que las distintas cepas pueden manifestar diferentes estados fisiológicos en los distintos medios de cultivo y en los distintos estadios de desarrollo. Pero sería esperable ciertamente un comportamiento general más homogéneo entre experimentos y, desde luego, un comportamiento similar para cepas alteradas o deficientes en la misma actividad enzimática. Todo ello, unido al hecho de que la reproducibilidad entre réplicas del mismo experimento no haya sido alta, nos hace pensar que las condiciones experimentales en las que se han desarrollado estos experimentos no han sido adecuadas y que no es posible derivar información biológica relevante de ellos. No es posible proponer ninguna conclusión en relación con la participación de una u otra ruta enzimática en la producción de NO en *B. cinerea*.

#### b. Aproximación bioinformática en *C. graminicola*

*C. graminicola* es el agente causal de la antracnosis en maíz. Es un hongo fitopatógeno interesante para nosotros en el contexto de este trabajo por varias razones. En primer lugar, se trata de un patógeno hemibiótrofo, que muestra similitudes, pero también diferencias notables con nuestro sistema principal de trabajo, *B. cinerea*, patógeno necrótrofo, en relación con los mecanismos y los procesos implicados en el establecimiento de la interacción con la planta. Su utilización nos permite considerar un análisis comparativo muy interesante. En segundo lugar, en algunas especies de *Colletotrichum* se ha descrito un efecto del NO sobre la germinación, si bien no se ha trabajado nada sobre los posibles mecanismos implicados en su producción. En tercer lugar, un análisis bioinformático de posibles genes ortólogos de los genes codificadores de enzimas tipos NOS de mamíferos ha revelado la presencia de

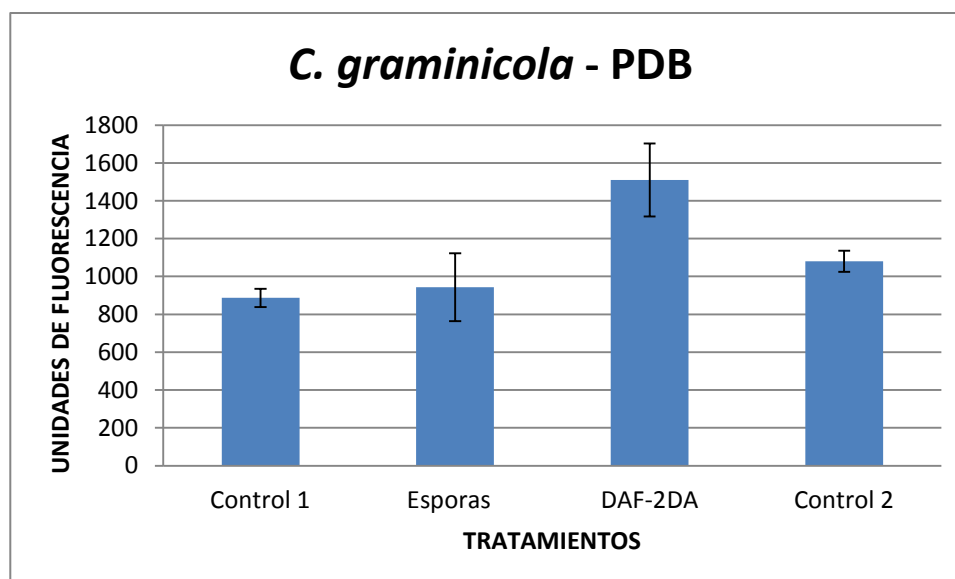
secuencias relacionadas en varias especies del género *Colletotrichum* (Turrión-Gómez and Benito, 2011). Y finalmente, en nuestro grupo de investigación nuestros colaboradores, los Drs. Mike Thon y Serenella Sukno, poseen amplia experiencia en el manejo de este sistema. Por todas estas razones decidimos iniciar un estudio de la posible producción de NO en *C. graminicola* de forma comparada con el estudio en *B. cinerea*.

#### i. Detección de la producción de NO en *C. graminicola* mediante fluorimetría

En el apartado anterior se ha indicado que en *C. graminicola* ha sido posible identificar un gen codificador de una enzima estructuralmente muy similar a las enzimas de tipo NOS de mamíferos (su secuencia y su estructura se describen en las secciones siguientes). Siendo así, es posible asumir que probablemente *C. graminicola* pueda producir NO y que, al menos en parte, esta producción de NO tenga su origen en la actividad de esta enzima tipo NOS de mamíferos.

Con el objeto de determinar si *C. graminicola* puede producir NO, se consideraron varias aproximaciones experimentales. En primer lugar se planteó la utilización de procedimientos basados en fluorimetría y en la cuantificación de la fluorescencia emitida con ayuda de un fluorímetro, como los descritos en las secciones anteriores y utilizados con *B. cinerea*.

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos en una serie de experimentos representativos llevados a cabo con este fin. En los histogramas se presenta la fluorescencia detectada con el fluorímetro en los diferentes tratamientos propuestos de la misma manera que se realizó con *B. cinerea* en apartados anteriores pero con algunas diferencias: Control 1 = buffer Tris HCl 10 mM, Esporas = buffer Tris HCl 10 mM con esporas de 4 horas de cultivo líquido en medio PDB, DAF-2DA = esporas de 4 horas de cultivo líquido en medio PDB con DAF-2DA 10  $\mu$ M; y Control 2 = Buffer Tris HCl 10 mM con DAF-2DA 10  $\mu$ M. Al igual que con los experimentos llevados a cabo con *B. cinerea*, se observa la fluorescencia basal del propio buffer utilizado para llevar a cabo las mediciones (Control 1) en todas las situaciones evaluadas, fluorescencia que tendría que ser sustraída, de la fluorescencia detectada en esporas de *C. graminicola*, cuya fluorescencia es la que queremos detectar y cuantificar. La adición únicamente de esporas (Esporas) o del agente de detección específico de NO (Control 2) determina valores de fluorescencia similares a los de la situación Control 1, lo que indica que tanto las esporas como el agente de DAF-2DA por sí solos no emiten fluorescencia alguna. En las muestras en las que se incluye simultáneamente esporas y DAF-2DA (DAF-2DA) se detectan valores de fluorescencia superiores a los correspondientes a la fluorescencia basal, observación indicativa de que las unidades biológicas que están siendo analizadas en nuestros experimentos producen NO y de que es posible detectar esta producción mediante fluorimetría.



**FIGURA 11.** Fluorescencia (en Unidades de Fluorescencia, UF) detectada con el fluorímetro para cuantificar autofluorescencia y fluorescencia emitida cuando el NO producido por las esporas de *C. graminicola* reaccionan con el agente colorante DAF-2DA en las condiciones indicadas (cepa y medio de cultivo). En el histograma las muestras son: (Control 1), buffer Tris HCl 10 mM; (Esporas), buffer Tris HCl 10 mM con esporas de 4 horas de cultivo en agitación; (DAF-2DA), esporas de 4 horas con DAF-2DA 10  $\mu$ M; y (Control 2), buffer Tris HCl 10 mM con DAF-2DA 10  $\mu$ M.

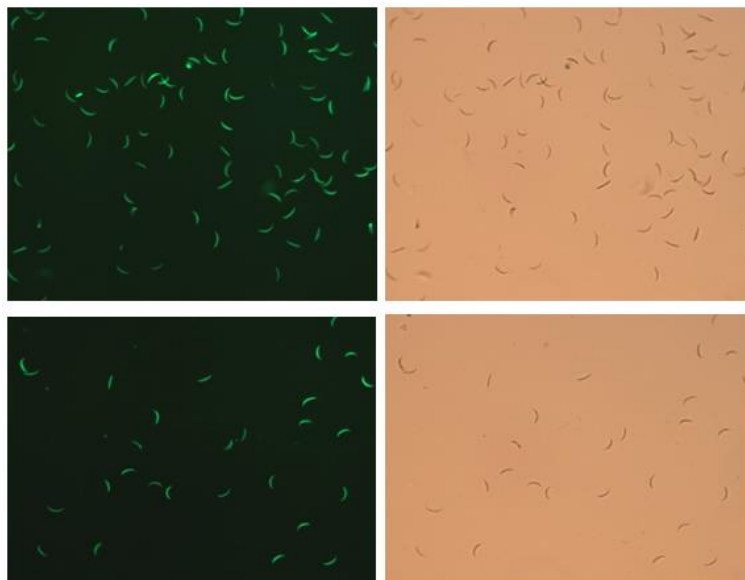
Teniendo en cuenta lo observado en los experimentos llevados a cabo con el fluorímetro descritos en párrafos anteriores y cuyos resultados se presentan en la figura 11, podemos decir que efectivamente, *C. graminicola* produce NO y que dicha producción es detectada mediante la fluorescencia emitida por las esporas del hongo teñidas con el agente colorante DAF-2DA.

## ii. Detección de la producción de NO en *C. graminicola* mediante microscopía de fluorescencia

Como aproximación complementaria a la aproximación basada en la cuantificación de la fluorescencia emitida en presencia del agente DAF-2DA decidimos tratar de detectar la fluorescencia emitida por las unidades biológicas tratadas con el agente de tinción mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, utilizando los cultivos preparados para llevar a cabo la cuantificación de la fluorescencia mediante la utilización del fluorímetro, se tomaron varias muestras adicionales de esporas en germinación (incubadas durante 4 horas en medio PDB en agitación) y se llevaron a cabo las tinciones correspondientes siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 19.b de Materiales y Métodos. Alícuotas derivadas de las muestras sometidas al tratamiento de tinción fueron depositadas sobre un portaobjetos y utilizadas para la observación al microscopio de fluorescencia (las mismas preparaciones se observaron en el



espectro visible). La Figura 12 muestra imágenes representativas. En las mismas se aprecia con claridad la fluorescencia emitida por esporas de *C. graminicola* tratadas con DAF-2DA cuando la muestra es irradiada con luz de longitud de onda de 395 nm y la detección se realiza utilizando el filtro de 509 nm. En estas preparaciones todas las esporas de *C. graminicola* emiten fluorescencia indicativa de la producción de NO.



**FIGURA 12.** Tinción con el agente colorante DAF-2DA de esporas de *C. graminicola* incubadas durante 4 horas en medio PDB y observadas al microscopio de fluorescencia. En la parte izquierda de la figura se presentan las imágenes de fluorescencia. En la parte derecha se presentan las correspondientes imágenes tomadas en el espectro visible.

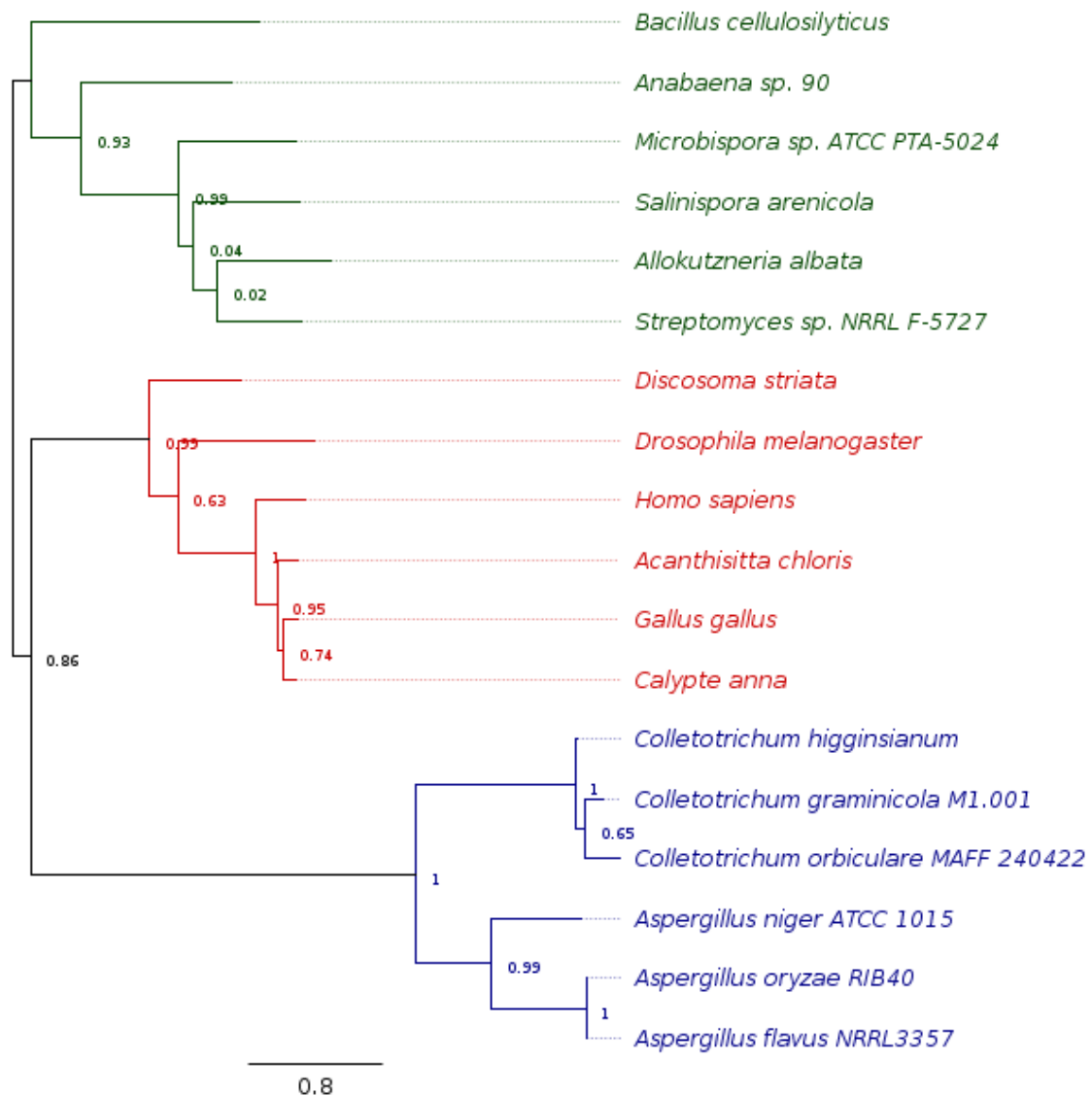
### iii. NOS de *C. graminicola*

Mediante un amplio análisis bioinformático llevado a cabo por Turrión-Gómez y Benito (2011) los autores determinaron que en el genoma de *B. cinerea* no existe un gen codificador de una enzima similar a la NOS de animales. Sí detectaron, sin embargo, secuencias relacionadas con los genes codificantes de este tipo de enzimas en el genoma de algunas especies del género *Aspergillus* y del género *Colletotrichum*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y con la ayuda de Vinicio Armijos (grupo *Colletotrichum*, Laboratorio 1 del Ciale), se realizó una reconstrucción filogenética del gen que codifica para la enzima NOS con los genomas de especies representantes de los distintos grupos taxonómicos que poseen este gen y cuyas secuencias están disponibles en el Genebank. Para generar el árbol filogenético presentado en la Figura 13 se utilizó el programa Geneious<sup>®</sup> Pro 5.6.5 (Drummond *et al.*, 2011) y el plugin PhyML (Guindon *et al.*, 2010)). Se

eligió el modelo LG para reconstruir el árbol de Máxima Verosimilitud y como medida de soporte se utilizó el valor SH-like (Anisimova and Gascuel, 2006).

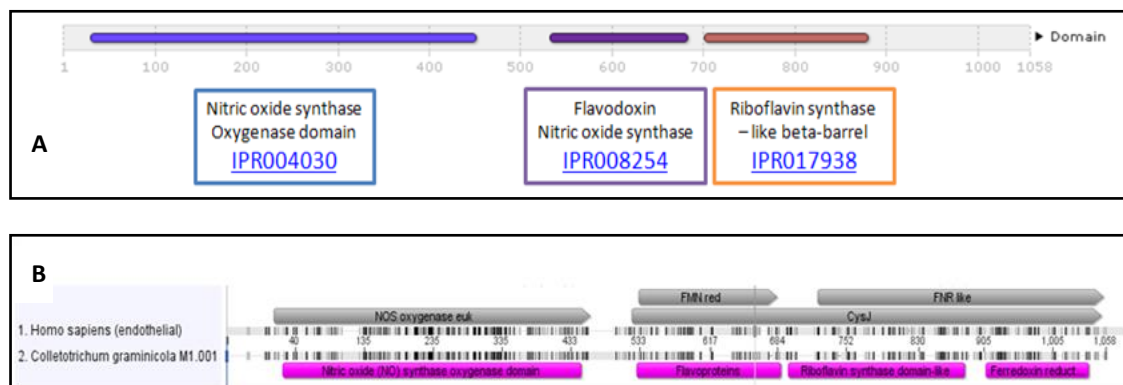
En el árbol que se presenta se puede observar que en hongos, especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae* y *A. niger*) y del género *Colletotrichum* (*C. graminicola*, *C. orbiculare* y *C. higginsianum*) poseen un gen codificador de una enzima tipo NOS homóloga a la NOS convencional de animales (*H. sapiens*). En bacterias, especies como *B. cellulosilyticus* y *Streptomyces sp.*, también poseen un gen que presenta similitud con el gen NOS de animales.



**FIGURA 13.** Árbol filogenético del gen NOS de especies pertenecientes al reino Fungi (en azul), al reino Animal (en rojo) y al reino Bacteria (en verde). Los números que se encuentran en los nodos del árbol corresponden al valor SH-like.

Efectivamente en el genoma de *C. graminicola* se identifica un gen (gi|310800806) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta una homología muy notable con la secuencia de la NOS de animales.

Mediante un alineamiento de proteínas de la enzima NOS de humanos (*Homo sapiens*)(sp|P35228) con la de *C. graminicola* se pudo apreciar el grado de similitud que presenta ésta última con respecto a la NOS convencional y además que posee los dominios funcionales característicos de este tipo de enzima (Figura 14).



**FIGURA 14.** (A) Dominios funcionales de la enzima NOS de *H. sapiens*. Se indican las posiciones relativas de los tres dominios funcionales identificados. (B) Alineamiento de proteínas de las enzimas tipo NOS de *H. sapiens* y *C. graminicola*. Se destacan los dominios característicos de este tipo de enzima: el dominio oxigenasa N-terminal y el dominio C-terminal reductasa que tiene los sitios de unión para la flavina mononucleótido (FMN), la flavina dinucleótido (FAD) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Los residuos de aminoácidos conservados aparecen destacados en negro.

Como hemos mencionado anteriormente, en nuestro laboratorio contamos con un grupo que trabaja en el hongo *C. graminicola*, liderado por el Dr. Michael Thon. Teniendo en cuenta que uno de los hongos que poseen un gen codificador de una enzima con elevada homología con las enzimas tipo NOS de animales es *C. graminicola*, se decidió utilizar este hongo como un sistema paralelo a efectos de comparación en cuanto a características fenotípicas de evidencia de producción de NO e incluso para tratar de generar una cepa mutante deficiente en el gen NOS sobre la cual llevar a cabo una caracterización fenotípica detallada. Los resultados de dichos experimentos se describen a continuación.

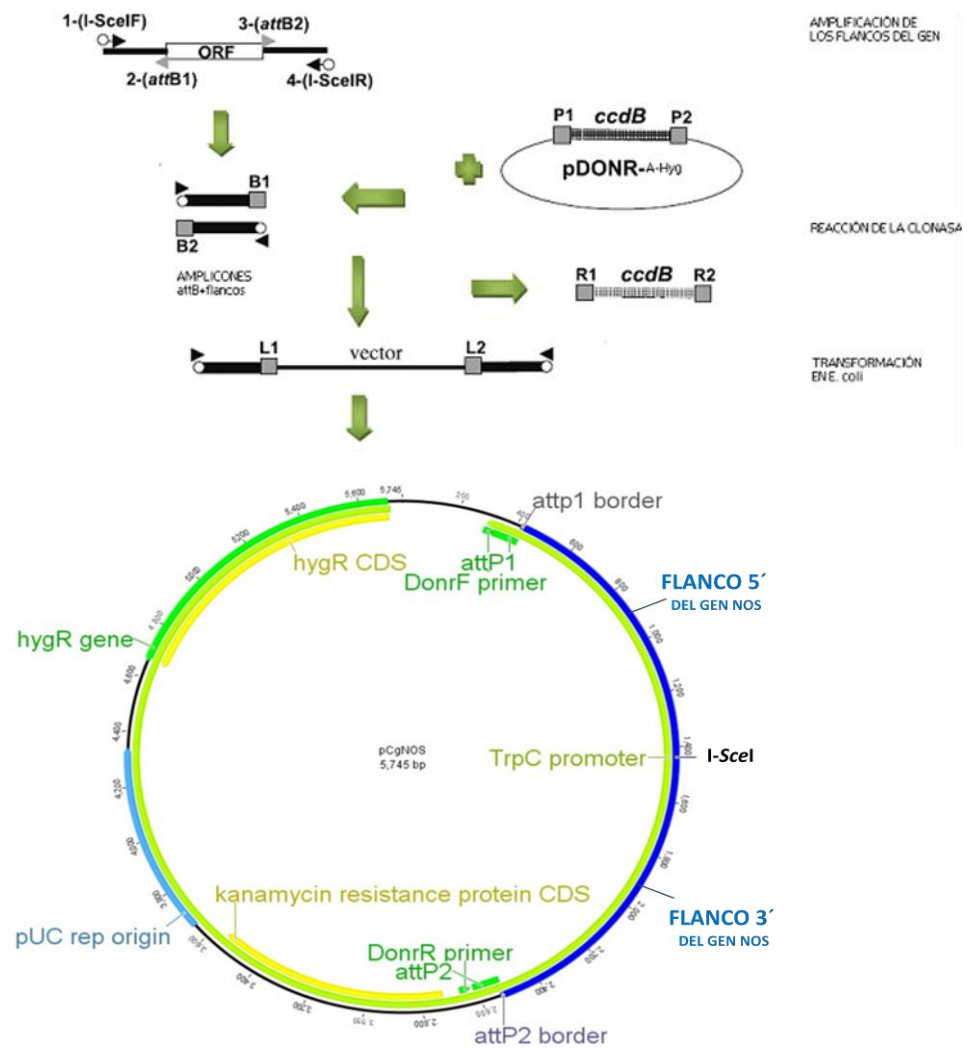
#### iv. Intentos de obtención de mutantes $\Delta CgNOS$ por reemplazamiento génico

En primer lugar fue necesario generar un plásmido para su utilización en experimentos de transformación y reemplazamiento génico. Para la construcción del vector de transformación se utilizó la tecnología DelsGate (García–Pedrajas *et al.*, 2008). Como primer paso se diseñaron las secuencias de cebadores que el método requiere como parte de la estrategia de mutagénesis por reemplazamiento génico que propone (Tabla 4). Estos cebadores amplifican las zonas flanqueantes del gen (ORF) que queremos eliminar y parte de su diseño conlleva la introducción de los sitios *attB1* y *attB2*, que son sitios que promueven la recombinación *in vitro* con el vector pDONR-A-Hyg, concretamente con los sitios de recombinación *attP1* y *attP2* presentes en el propio plásmido. En el vector pDONR-A-Hyg, los sitios *attP1* y *attP2* flanquean el gen *ccdb*, que es letal para la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, y la recombinación *in vitro* mediada por la enzima clonasa reemplaza este gen por una estructura que incluye los amplicones derivados de los flancos diseñados y que quedan ubicados a ambos lados de una fusión génica que permite la expresión del gen de resistencia a higromicina (en hongos). De esta manera, los transformantes de *E. coli* generados que posean los flancos seleccionados a un lado y otro del gen de resistencia a higromicina son aquellos que crecerán en la placa, y si no se ha producido la recombinación, la presencia del gen *ccdb* en el plásmido transformante determinará la muerte de la célula receptora y no se obtendrán colonias transformantes viables.

Siguiendo el fundamento del método descrito se amplificaron por PCR las secuencias flanqueantes, con un tamaño aproximado cada una de 1 kb, de la región codificante del gen *CgNOS* con las combinaciones de cebadores diseñadas para ello, y se purificaron los fragmentos correspondientes asegurándonos de que tuvieran una concentración de al menos 50 ng/ $\mu$ l. Una vez cumplido éste requisito, se procedió con la reacción de ligación mediante el uso del kit Gateway<sup>®</sup>BP Clonase<sup>™</sup> II Enzyme Mix (Invitrogen). Para la ligación (BP reaction) se añadieron en un tubo de PCR de 0,2 ml: entre 1-7  $\mu$ l de la mezcla de las amplicones de los flancos 5' y 3' con una concentración final de 150 ng/ $\mu$ l de cada uno, 1,5  $\mu$ l de vector pDONR-A-Hyg con una concentración de 106 ng/ $\mu$ l, 2  $\mu$ l de clonasa (BP Clonase<sup>™</sup> enzyme mix) y buffer TE hasta completar 8  $\mu$ l. Se colocó la mezcla en hielo por 2 minutos, luego 2 minutos al vórtex y finalmente se llevó al termociclador a 25°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 2  $\mu$ l de proteinasa K y la reacción se mantuvo a 37°C durante 10 minutos. Se procedió entonces a realizar la transformación con células DH5 $\alpha$  de *E. coli* como se describe en el apartado 15.a de Materiales y Métodos, con la única diferencia de que la mezcla de transformación se sembró en placas de LB de bajo contenido de Na (5%) y suplementadas con Kanamicina.

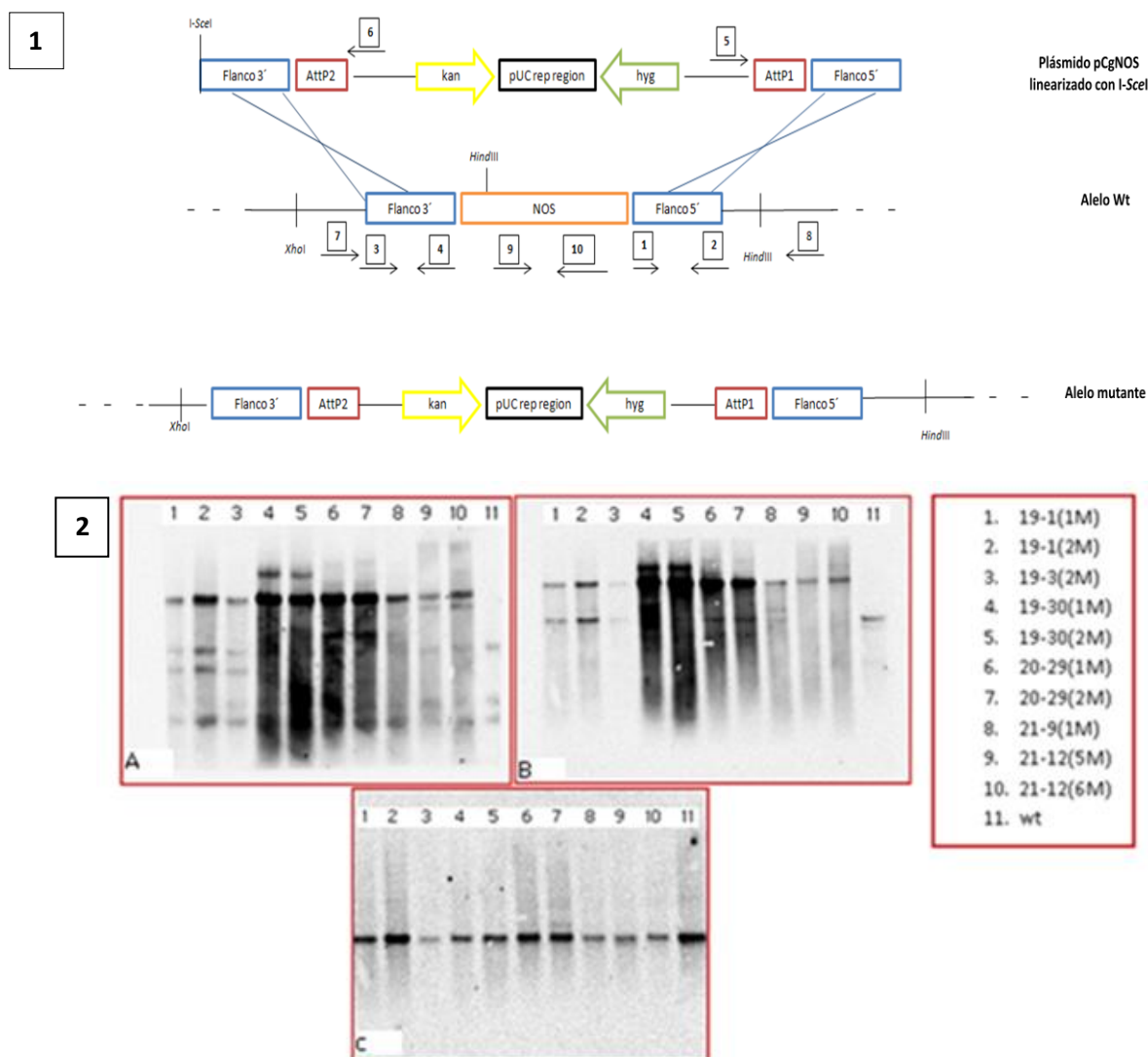
De las colonias obtenidas en la transformación se confirmaron aquellas que poseían la construcción mediante PCR con los cebadores para amplificar ambos flancos. Además, para estar completamente seguros de tener ambos flancos ligados al vector pDONR-A-Hyg, se realizaron cortes con enzimas de restricción informativos de la estructura del plásmido. Como siguiente paso se obtuvieron grandes cantidades de ADN plasmídico de la colonia seleccionada, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.b.ii de Materiales y Métodos.

Previo la transformación de *C. graminicola* con el plásmido seleccionado, se realizó una reacción de restricción con la enzima endonucleasa I-SceI para generar el plásmido en forma linearizada. Cabe resaltar que los cebadores diseñados en un inicio, tienen añadido el sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI, ausente en la mayoría de genomas de hongos. De esta manera se obtienen dos ventajas: promover la recombinación *in vitro* de los flancos con el vector pDONR-A-Hyg y la generación de una molécula lineal para la transformación del hongo. En la Figura 15 se muestra la estrategia de construcción del plásmido al que hemos nombrado como pCgNOS.



**FIGURA 15.** Esquema de la estrategia de construcción del plásmido pCgNOS utilizando la tecnología DelsGate.

La transformación de *C. graminicola* se llevó a cabo mediante la utilización de protoplastos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 14.c de Materiales y Métodos. Para seleccionar transformantes candidatos a mutantes  $\Delta CgNOS$  se realizó cultivo en medio líquido (25 °C y 180 rpm durante 2-3 días) de cada uno para la obtención de micelio en cantidades razonables para extracciones de ADN con el método rápido. Luego se procedió inmediatamente con las PCRs de comprobación con las combinaciones de los cebadores OGG3F+DonorR y OGG5F(2)+DonorFH (tabla 4) que amplifican una secuencia que incluye parte del genoma de *C. graminicola* y parte del plásmido pCgNOS. Aquellos transformantes que mostraron amplificación con ambas combinaciones de cebadores se seleccionaron para la obtención de cultivos monospóricos, procedimiento que tiene como finalidad garantizar en la medida de lo posible, la homocariosis de la mutación  $\Delta CgNOS$ . Posteriormente, a los cultivos monospóricos escogidos se los sometió a un análisis tipo Southern mediante una digestión con las enzimas *Xho*I y *Hind*III con varias sondas derivadas del gen *CgNOS*: sonda 5' (derivada de la secuencia flanqueante 5'), sonda 3' (derivada de la secuencia flanqueante 3') y sonda NOS (derivada de la región codificante) (Figura 16). Lo que buscamos es que se haya producido un evento de recombinación, tal que el gen de la higromicina presente en el plásmido pCgNOS reemplace al gen NOS por recombinación homóloga al reconocerse sus flancos (Figura 16).



**FIGURA 16.** (1) Estrategia de reemplazamiento génico del gen NOS mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen NOS y del alelo mutante construido artificialmente. Los cebadores I-SceIF [1] y attB1 [2] se utilizaron para amplificar el flanco 5', los cebadores attB2 [3] e I-SceIR [4] se utilizaron para amplificar el flanco 3', los cebadores DonrFH [5], DonorR [6], OGG5F(2) [7] y OGG3F [8] se utilizaron para discriminar entre transformantes positivos (aquellos transformantes en los que se ha efectuado el doble reemplazamiento del gen NOS por el gen de la higromicina por recombinación homóloga de las secuencias flanqueantes 5' y 3') y negativos (aquellos transformantes en los que no se ha efectuado dicho reemplazamiento), y los cebadores NOS1F [9] y NOS1R [10] se utilizaron para amplificar la secuencia codificante del gen de la NOS.

(2) A: Southern de 11 transformantes candidatos con la sonda 5' obtenida por PCR con los cebadores I-SceIF [1] y attB1 [2]. B: Southern de 11 transformantes candidatos con la sonda 3' obtenida por PCR con los cebadores attB2 [3] e I-SceIR [4]. C: Southern de 11 transformantes candidatos con la sonda NOS obtenida por PCR con los cebadores NOS1F [9] y NOS1R [10].

De un total de 233 transformantes obtenidos, se encontraron 20 que por PCR amplificaban los flancos. En figura 16 se observa que tanto la hibridación con la sonda 5'(A) como con la 3'(B) se obtuvieron varios candidatos a transformantes positivos que presentan el alelo mutante y no el alelo silvestre (banda correspondiente al wt, muestra 11 en todas las membranas). Pero, cuando se realizó la hibridación con la sonda NOS, todos presentaban la banda del alelo silvestre (C). En la figura 16 se presentan 11 de los 20 candidatos obtenidos y de ellos no encontramos ninguno con la mutación en homocariosis.



## 2. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL NO EN *C. graminicola* Y *B. cinerea*

### a. Efectos sobre la germinación en *C. graminicola*

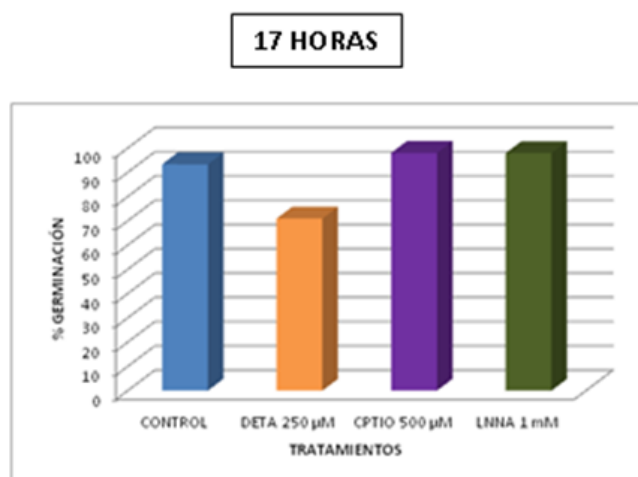
La disponibilidad de un mutante deficiente en el gen que codifica para la enzima NOS hubiera proporcionado una herramienta genética muy útil para valorar la contribución de esta vía enzimática en la producción de NO en *C. graminicola* y para progresar en el análisis de los procesos fisiológicos en los que el NO pueda participar en este organismo. Desafortunadamente no ha sido posible la obtención del mismo en el curso de este trabajo. No obstante, los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio y descritos en las secciones 1.b.i y 1.b.ii indican que *C. graminicola* produce, efectivamente, NO. En esta misma línea apuntan los trabajos llevados a cabo por Wang y Higgins (2005) en una especie relacionada, *C. coccodes*, en los que utilizando una aproximación similar demuestran que esta especie produce NO tanto en la fase de esporas como en la fase de micelio. Estos mismos autores, aplicando una aproximación farmacológica, demuestran que el NO tiene un efecto regulador de la germinación.

Teniendo en cuenta estas observaciones y como parte de la batería de experimentos diseñados para evaluar en una primera aproximación las posibles funciones fisiológicas en las que el NO pudiera participar en *C. graminicola*, consideramos tratar de estudiar el efecto sobre germinación que aquel pudiera tener en este sistema biológico. Con este objeto decidimos estimar el porcentaje de esporas germinadas tanto en cultivo estático como en cultivo en agitación en condiciones de exposición a un donador de NO (el aducto dietilentriamina-NO, DETA/NO), un secuestrador de NO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolino-1 óxido -3 óxido, cPTIO) y un inhibidor de la enzima NOS (N-nitro-L-arginina, L-NNA). En el experimento realizado en cultivo en agitación solamente se utilizaron los tratamientos con DETA y con L-NNA dado que el uso del cPTIO tuvo que ser restringido por el coste que representaba su utilización en volúmenes grandes.

#### i. Cultivo estático

Las condiciones de cultivo estático de *C. graminicola* en presencia o no del donador de NO, del secuestrador de NO y del inhibidor de la enzima NOS se describen en la sección 4.b. de Materiales y Métodos. En muestras tomadas a las 17 y 24 horas se estimó el porcentaje de esporas germinadas en cada condición. Los resultados obtenidos en un experimento representativo a los tiempos indicados se presentan en la Figura 17 en la que se aprecia claramente que el donador de NO (DETA) determina un retraso en la germinación de las esporas: a las 17 horas un 93% de las esporas han germinado en el tratamiento control frente a un 70% que han germinado en el tratamiento con DETA. A las 24 horas, las esporas de *C. graminicola* desarrollan apresorios melanizados, por lo que es difícil encontrarlas ya como

esporas individuales en suspensión y los recuentos son menos fiables. A pesar de este inconveniente, pudo apreciarse la misma tendencia con el tratamiento con DETA, es decir, un retraso en la germinación (resultados no mostrados). Los tratamientos con cPTIO y con L-NNA determinaron el efecto contrario, un ligero aumento del porcentaje de germinación, que llegó a alcanzar un 98% en el caso del secuestrador de NO y un 97,9% en el caso del inhibidor de la enzima NOS.



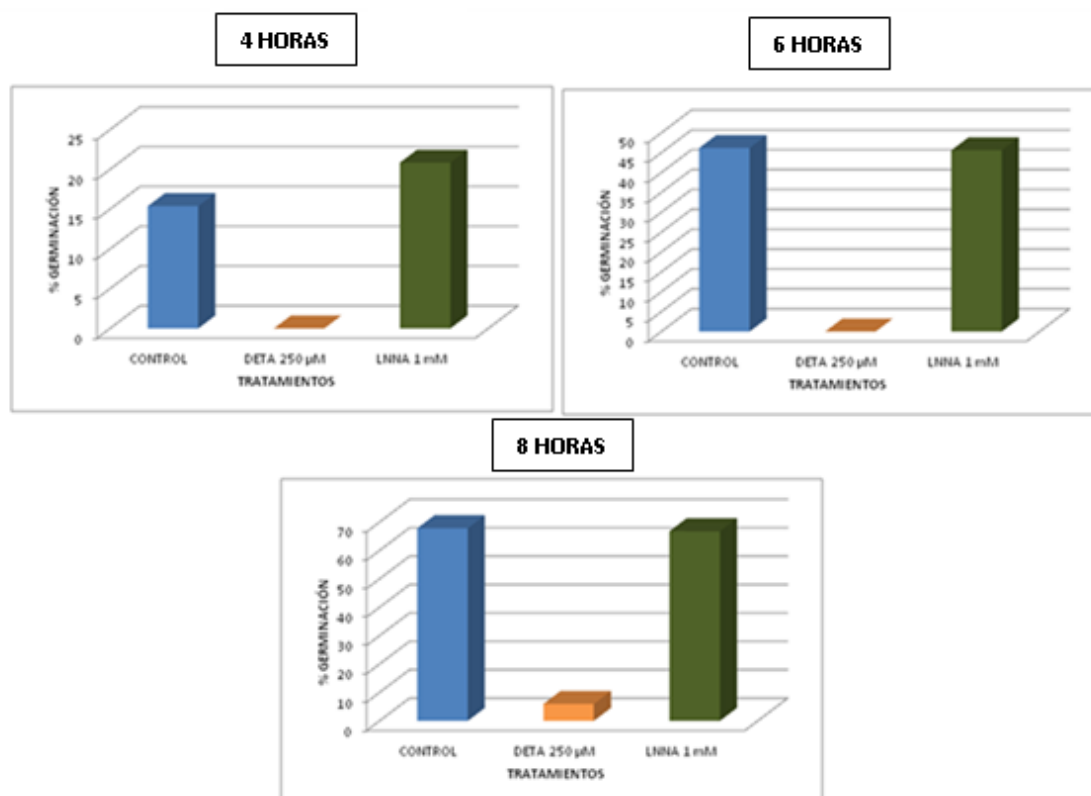
**FIGURA 17.** Efecto del NO en la germinación de *C. graminicola* M1.001 en cultivo estático. La germinación fue estimada a las 17 horas en presencia de un donador de NO (DETA 250 µM), un secuestrador de NO (cPTIO 500 µM) y un inhibidor de la NOS (L-NNA 1 mM) en relación con la situación control (sin fármaco). Se presentan los resultados de un experimento representativo. El experimento fue repetido en tres ocasiones con resultados similares.

Este experimento fue repetido en dos series de exposiciones más con resultados muy similares. Una observación que debemos tener en cuenta es que a las 17 horas de cultivo la germinación en ausencia de donador de NO es muy elevada, como vemos. Considerando posible que se determinen efectos similares en cultivo en agitación, y con el objeto de acentuar posibles diferencias, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos similares en cultivo en agitación evaluando igualmente la germinación pero a tiempos más cortos.

## ii. Cultivo en agitación

El efecto del NO sobre germinación también fue evaluado en condiciones de cultivo en agitación (las condiciones particulares son las descritas en la sección 4.d. de Materiales y Métodos). En este caso los recuentos se realizaron a las 4, 6 y 8 horas de incubación en agitación (Figura 18). Puede observarse que en estas condiciones la mayor parte de las esporas germinan entre las 4 y 8 horas de incubación. A las 4 horas ha germinado aproximadamente un

15% de las esporas, a las 6 horas un 45% y a las 8 horas casi un 70%. El efecto del donador de NO en los tres tiempos es muy obvio, determinando una reducción muy notable de la germinación. Por su parte, el tratamiento con el inhibidor de la NOS determina un aumento del porcentaje de esporas germinadas, de mayor magnitud en los primeros tiempos analizados, 4 y 6 horas, y ya muy reducido en el último tiempo considerado, las 8 horas.



**FIGURA 18.** Efecto del NO en la germinación de *C. graminicola* M.1001 en cultivo en agitación. La germinación fue estimada a las 4, 6 y 8 horas de cultivo en agitación en medio Fries en presencia de un donador de NO (DETA 250 µM), un secuestrador de NO (cPTIO 500 µM) y un inhibidor de la NOS (L-NNA 1 mM).

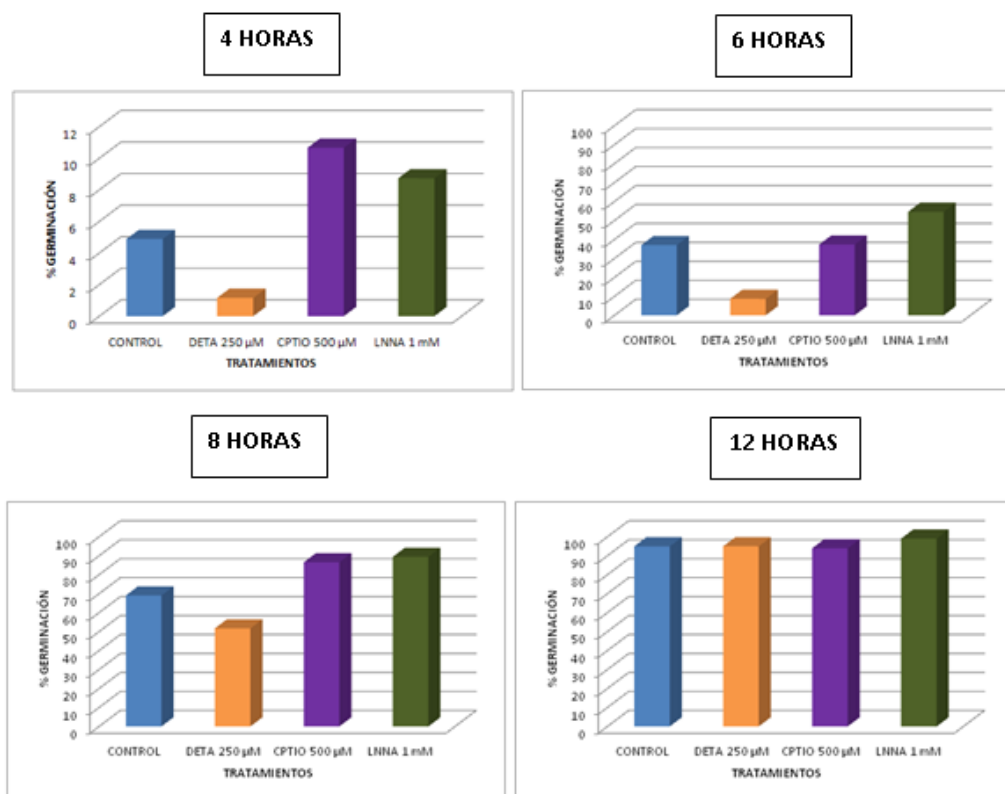
Teniendo en cuenta los efectos observados en la germinación de *C. graminicola* en las dos condiciones analizadas, cultivo estático y en cultivo en agitación, es posible concluir que en ambos casos se observan los mismos efectos en la germinación del hongo: la exposición a NO exógeno determina un retraso en la germinación de las esporas y la exposición a un inhibidor de la NOS, o a un secuestrador de NO como se ha podido comprobar en el caso del cultivo estático, determina una aceleración en la germinación.

### b. Efectos sobre la germinación en *B. cinerea*

Para analizar el efecto del NO en el proceso de germinación de *B. cinerea*, se utilizó la misma aproximación farmacológica planteada en los experimentos con *C. graminicola*, es decir, la exposición de esporas, en este caso de *B. cinerea*, a un donador de NO (DETA 250  $\mu$ M), a un secuestrador de NO (cPTIO 500  $\mu$ M) y a un inhibidor de la NOS (L-NNA 1 mM). Se propuso también, la observación de los efectos de la exposición de estos fármacos tanto en cultivo estático como en cultivo en agitación; y de igual forma en éste último solamente se utilizaron los tratamientos con DETA y con L-NNA. Los cultivos se llevaron a cabo como se describe en los apartados 4.a y 4.c de Materiales y Métodos.

#### i. Cultivo estático de la cepa silvestre B05.10

En la Figura 19 se muestra el porcentaje de esporas germinadas en cultivo estático a los diferentes tiempos considerados: 4, 6, 8 y 12 horas de tratamiento. Se comprueba que la mayor parte de las esporas germinan entre las 4 y 8 horas de cultivo y que a las 12 horas prácticamente la totalidad de las esporas ya han germinado. Se puede apreciar que el donador de NO (DETA) determina un retraso en la germinación de las esporas: a las 4 horas vemos un 4% de esporas germinadas en el Control mientras que en aquellas que tienen el tratamiento con DETA se observa apenas un 1% de esporas germinadas. A medida que transcurre el tiempo y avanza el proceso de germinación la situación observada es la misma: a las 6 horas hay un 36% de esporas germinadas en el Control frente a un 8% en aquellas con el tratamiento con DETA, a las 8 hay un 69% de esporas germinadas en el Control frente a un 51% en aquellas con DETA. A las 12 horas todas las esporas ha germinado, tanto en ausencia del donador de NO como en presencia del donador de NO, aunque los tubos germinativos de las esporas cultivadas en presencia del donador de NO son más cortos. Es decir, efectivamente la exposición a NO determina un retraso en la germinación. Transcurridas las 12 horas de cultivo estático, en el Control se pudo apreciar mayores formaciones de micelio y menos tubos germinativos en desarrollo individuales (no agregados) que en el tratamiento con DETA, lo que se complementa con el retraso en germinación observado desde el inicio de las observaciones (resultados no mostrados).



**FIGURA 19.** Efecto del NO en la germinación de *B. cinerea* B05.10 en cultivo estático. La germinación fue estimada a las 4, 6, 8 y 12 horas de cultivo en medio ½PDB en presencia de un donador de NO (DETA 250 µM), un secuestrador de NO (cPTIO 500 µM) y un inhibidor de la NOS (L-NNA 1 mM).

El tratamiento con cPTIO determina el efecto contrario al obtenido mediante el tratamiento con DETA: es posible apreciar una aceleración de la germinación, ya que el porcentaje de esporas germinadas en comparación con el Control (Figura 19) es mayor a los tres tiempos considerados, 4, 6 y 8 horas de cultivo. A las 12 horas ocurre lo mismo que en la comparación del Control con el tratamiento con DETA, ya que a este tiempo todas las esporas han germinado y las diferencias que se pueden observar son de longitud de tubos germinativos, mucho más difíciles de evaluar.

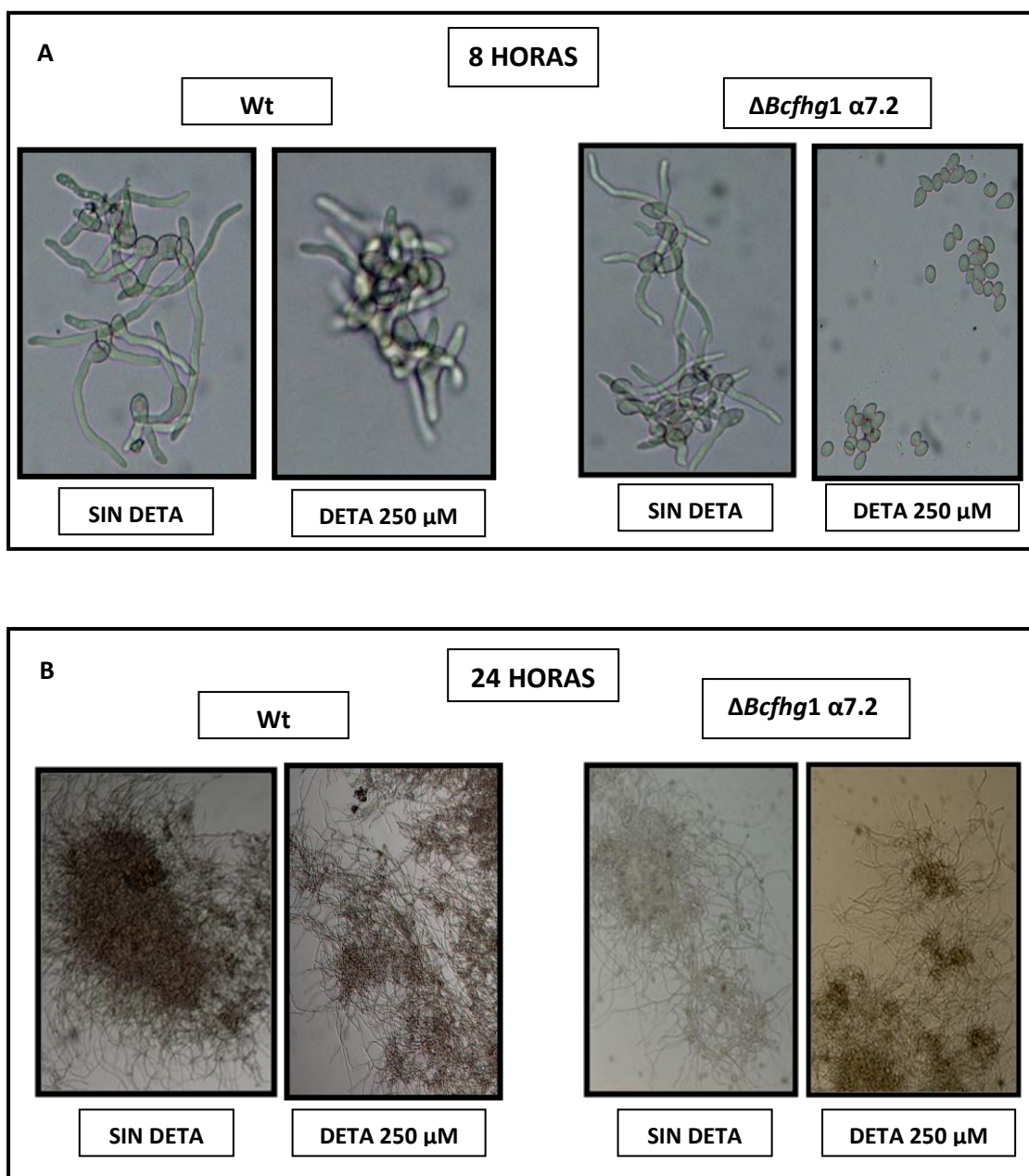
En el tratamiento con L-NNA, se observó el mismo efecto que con tratamiento con el cPTIO: se pudo apreciar una aceleración de la germinación que en algunos casos incluso superaba al observado con la exposición al cPTIO (Figura 19). Este es el caso de las 6 y 8 horas, en donde el tratamiento con L-NNA supone un 54% y 89% de esporas germinadas frente a un 36% y 69% del Control. A las 4 horas las diferencias entre el Control y el tratamiento con L-NNA son proporcionalmente incluso mayores que en el caso del tratamiento con cPTIO, ya que se cuentan el doble de esporas germinadas (8%) en el tratamiento con L-NNA en relación con el tratamiento Control (4%).

## ii. Cultivo estático de la cepa mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ y $\beta 16.7$

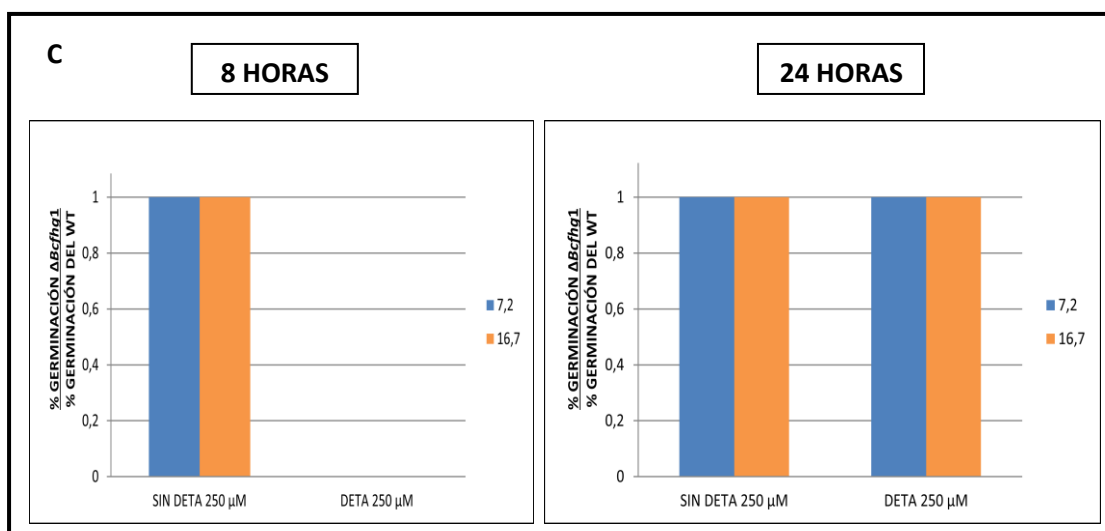
Para complementar las observaciones del efecto fisiológico del NO en *B. cinerea* y además observar la respuesta de una cepa deficiente en el sistema de detoxificación a la exposición a NO exógeno, se planteó la aplicación del tratamiento con DETA 250  $\mu$ M a las dos cepas mutantes  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  y  $\beta 16.7$  en comparación con la cepa silvestre como control. Se siguió en cada caso el progreso de la germinación de las esporas a las 4, 6 y 8 horas, y se observó que el efecto del NO en la germinación es más dramático que en la cepa silvestre, diferencia que se apreció con mayor claridad a las 8 horas de cultivo, dado que en este momento es cuando el proceso de germinación propiamente dicho en *B. cinerea*, de manera normal, prácticamente ha finalizado. En la Figura 20 (panel A) se presentan imágenes representativas del estado de germinación de las esporas de la cepa silvestre y de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (el mismo aspecto presenta en todos los casos la cepa  $\Delta Bcfhg1 \beta 16.7$ ) a las 8 horas de cultivo en ausencia y en presencia de NO. Se comprueba que tanto en la cepa control como en la cepa mutante a las 8 horas de cultivo en ausencia de NO exógeno prácticamente todas las esporas han germinado y que el tamaño de los tubos germinativos es muy similar en una y otra cepa. Este comportamiento paralelo se observa a lo largo de todo el proceso de germinación, en particular a las 4 y 6 horas, momentos en los que hemos efectuado observaciones al microscopio. Así, podemos resumir los resultados de todas las observaciones realizadas indicando que en todos los momentos considerados el porcentaje de esporas germinadas en la cepa silvestre y en las otras dos cepas mutantes es el mismo en ausencia de donador de NO exógeno. Esto determina que el cociente entre el “porcentaje de germinación de cada cepa mutante/porcentaje de germinación de la cepa silvestre” (diseñado para cuantificar diferencias de eficiencia de germinación entre las cepas mutantes y la cepa control), estimadas en una escala de 0 a 1, sea igual a la unidad (Figura 20, panel C).

La situación cambia cuando las esporas son cultivadas en presencia de NO exógeno. Puede comprobarse (Figura 20, panel A) que la exposición a NO determina un retraso en la germinación de las esporas de la cepa tipo silvestre (como hemos indicado en secciones anteriores), retraso que a las 8 horas de cultivo se manifiesta con un menor tamaño (longitud) de los tubos germinativos (todas las esporas han germinado ya, pero el tamaño de los tubos germinativos es menor). A este tiempo, por su parte, la exposición a NO de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  determina una inhibición total de la germinación de las esporas. En este caso, el cociente “porcentaje de germinación de la cepa mutante/porcentaje de germinación de la cepa silvestre” es igual a 0 (Figura 20, panel C). Para determinar si la germinación de las esporas de la cepa mutante se produce a tiempos más tardíos o si el NO produce un efecto de bloque permanente, se realizó una observación al microscopio óptico de una alícuota de las esporas del mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  expuestas al tratamiento con DETA 250  $\mu$ M a las 24 horas de cultivo (Figura 20, panel B). Se constató que las esporas a este tiempo ya han germinado y dado lugar a la formación de micelio y que apenas se encuentran esporas no germinadas, como tampoco se encuentran en el caso de la cepa silvestre a este mismo tiempo. En ambos casos el 100% de las esporas han germinado. Siendo así, el cociente “porcentaje de germinación de la cepa mutante/porcentaje de germinación de la cepa silvestre” a este tiempo es, también en las condiciones de exposición a NO, igual a la unidad. En comparación con la

cepa silvestre el aspecto de los cultivos a las 24 horas es indicativo de una menor cantidad de biomasa producida a tiempos equivalentes.



**FIGURA 20.** Efecto del NO en la germinación de los mutantes  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  y  $\beta 16.7$  y de la cepa silvestre Wt. (A) Comparación de la germinación a las 8 horas de cultivo de esporas de la cepa VeE2.1 y del mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . Las cepas fueron expuestas y no expuestas (SIN DETA) a un donador de NO (DETA 250  $\mu$ M), y se tomaron fotografías para comparar visualmente el efecto del DETA al tiempo señalado. (B) Comparación de la germinación a las 24 horas de cultivo de esporas de la cepa VeE2.1 y del mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . Las cepas fueron expuestas y no expuestas (SIN DETA) a un donador de NO (DETA 250  $\mu$ M), y se tomaron fotografías para comparar visualmente el efecto del DETA al tiempo señalado.



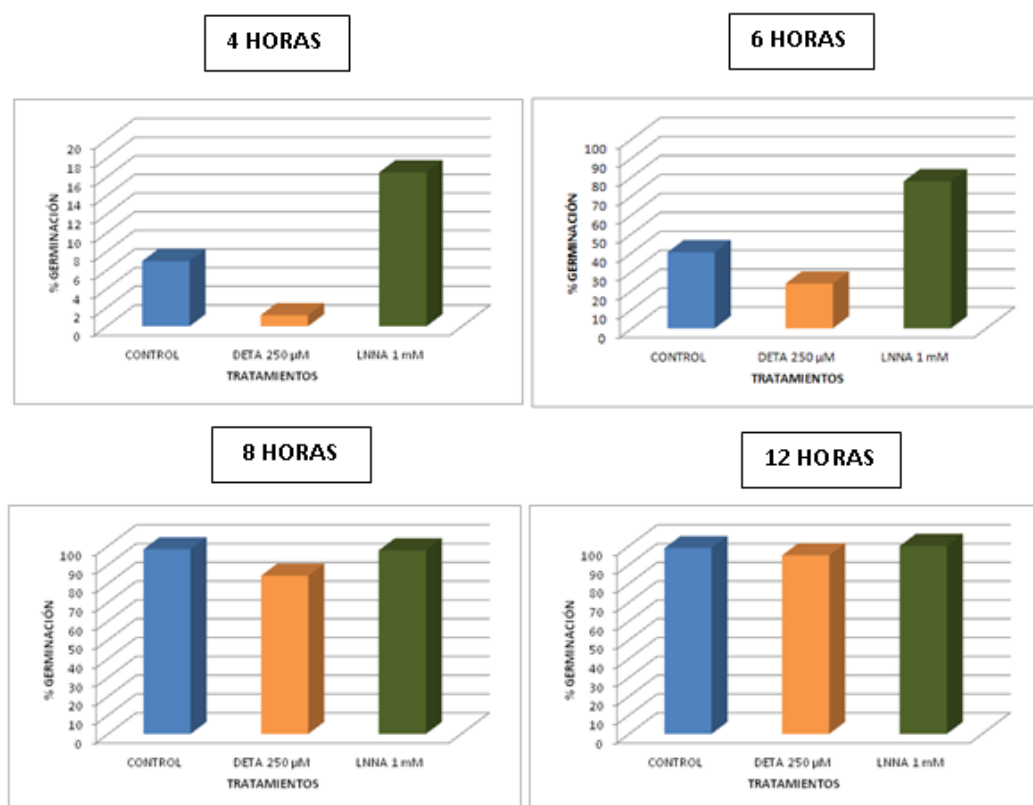
**FIGURA 21.** Efecto del NO en la germinación de los mutantes  $\Delta Bcfhg1$   $\alpha 7.2$  y  $\beta 16.7$  y de la cepa silvestre Wt. (C) Cociente “porcentaje de germinación de la cepa mutante/porcentaje de germinación de la cepa silvestre” a los tiempos indicados en presencia y en ausencia del donador de NO.

En resumen, las cepas mutantes  $\Delta Bcfhg1$   $\alpha 7.2$  y  $\beta 16.7$  muestran un retraso en la germinación mucho más evidente que la cepa silvestre a las 8 horas de incubación en las mismas condiciones de cultivo estático en medio  $\frac{1}{2}$ PDB en presencia del donador de NO (DETA 250  $\mu$ M). Este efecto es indicativo de una mayor sensibilidad a NO de las esporas en un sistema (cepa mutante) desprovisto de su mecanismo de detoxificación de NO y sugiere que el NO está afectando de manera directa el proceso de germinación y que este compuesto podría ser clave en la regulación del mismo. El bloqueo observado es, además, transitorio.

### iii. Cultivo en agitación

También en el caso de *B. cinerea* se evaluó, en segundo lugar, el efecto de la exposición a NO exógeno y de la adición de un inhibidor de la enzima NOS sobre la germinación en cultivo en agitación. Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.c. de Materiales y Métodos, se tomaron muestras a las 4, 6, 8 y 12 horas de cultivo en cada uno de los tratamientos considerados y se estimó el porcentaje de germinación en cada caso. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos que, esencialmente, reflejan la situación observada en cultivo estático: el tratamiento con DETA retrasa la germinación y la exposición a L-NNA acelera la germinación. En estas condiciones de cultivo en agitación la germinación progresa un poquito más rápidamente que en medio estático (a las 8 horas la germinación es casi total en cultivo en agitación) y se observa que las diferencias en retraso o adelanto de la germinación en cada tiempo analizado son, en general, más acentuadas que en el cultivo estático. Transcurridas 12 horas, todas las esporas han germinado en los tres tratamientos.





**FIGURA 22.** Efecto del NO en la germinación de *B. cinerea* B05.10 en cultivo en agitación. La germinación fue estimada a las 4, 6, 8 y 12 horas de cultivo en agitación en medio sales Gamborg's B5S en presencia de un donador de NO (DETA 250 µM) y un inhibidor de la NOS (L-NNA 1 mM).

En resumen, al igual que hemos observado en *C. graminicola*, en *B. cinerea* tanto en cultivo en agitación como en cultivo estático, el tratamiento con un donador de NO (DETA) determina un retraso en la germinación. Dicho retraso es más dramático en los mutantes deficientes del gen de la flavohemoglobina, los cuales exhiben un 0% de esporas germinadas a las 8 horas, tiempo en el que la germinación de manera normal prácticamente ha concluido. Por su parte, el tratamiento con secuestradores de NO o con un inhibidor de la NOS aceleran la germinación. Todo ello parece sugerir que en *B. cinerea*, y probablemente de la misma manera en *C. graminicola*, el NO desempeña una función reguladora de la germinación.

### 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A NO

Los resultados de los trabajos de investigación previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han permitido demostrar que la enzima flavohemoglobina BCFHG1 de *B. cinerea* no es un factor de patogenicidad en este organismo. Los estudios llevados a cabo en las fases iniciales de este trabajo de tesis doctoral apoyan las propuestas previas de nuestro grupo de investigación que sugieren que el papel del sistema de detoxificación de NO basado en la flavohemoglobina BCFHG1 debe ser considerado desde una perspectiva más global en la que se tiene que analizar tanto la producción como la detoxificación de NO por parte del microorganismos, y que el metabolismo del NO en *B. cinerea* ciertamente está relacionado con la regulación de procesos biológicos importantes en la fisiología del patógeno, en particular con la germinación de las esporas. Teniendo en cuenta estas observaciones y estas propuestas es posible formular el objetivo general y fundamental de esta tesis doctoral, “la identificación y la caracterización de los procesos fisiológicos en los que es relevante el metabolismo del NO en *B. cinerea*”. En última instancia nos proponemos abordar esta caracterización mediante la identificación de los factores genéticos que participan en dichos procesos fisiológicos.

Para ello proponemos y diseñamos una estrategia experimental basada en una hipótesis básica: La exposición del patógeno a NO exógeno o la eliminación del NO endógeno generado por el propio patógeno deben producir cambios en los patrones de expresión génica que deben ser informativos de la naturaleza de los procesos y de las funciones fisiológicas en las que el NO participa en este organismo. Desde esta consideración básica proponemos entonces llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial en respuesta a NO exógeno o a secuestradores de NO endógeno. El análisis y la caracterización de los genes regulados diferencialmente en estas condiciones deben ser informativos de la naturaleza de aquellos procesos.

Esta propuesta general nos permite tratar de dar respuesta a varias cuestiones que consideramos importantes en relación con la fisiología de *B. cinerea* y el papel del óxido nítrico. En primer lugar, el papel del NO sobre la germinación. Teniendo en cuenta las observaciones presentadas en las secciones previas de este trabajo proponemos comparar el patrón de expresión de la cepa silvestre durante la germinación (5 horas de cultivo en agitación) en ausencia de NO exógeno, condiciones en las que se dispara el programa de germinación, y el patrón de expresión cuando, disparado el programa de germinación (5 horas de cultivo en agitación) las esporas son expuestas a un donador de NO o a un secuestrador de NO. Dado el papel señalizador que presenta el NO en distintos sistemas vivos es posible proponer, entre otras, una función reguladora de la expresión génica mediada por la inducción o represión de factores de transcripción. Dado que el efecto sobre germinación es mucho más evidente en la cepa deficiente en la flavohemoglobina BCFHG1 es posible proponer el análisis de los patrones de expresión de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  cultivada durante 5 horas en agitación, condiciones, como indicamos, en las que se dispara el programa de germinación, con el patrón de expresión de la cepa mutante cuando, disparado el programa de germinación,

las esporas son expuestas a NO exógeno. Este sistema “desprotegido” frente a condiciones de estrés nitrosativo puede facilitar la identificación de factores genéticos regulados por NO.

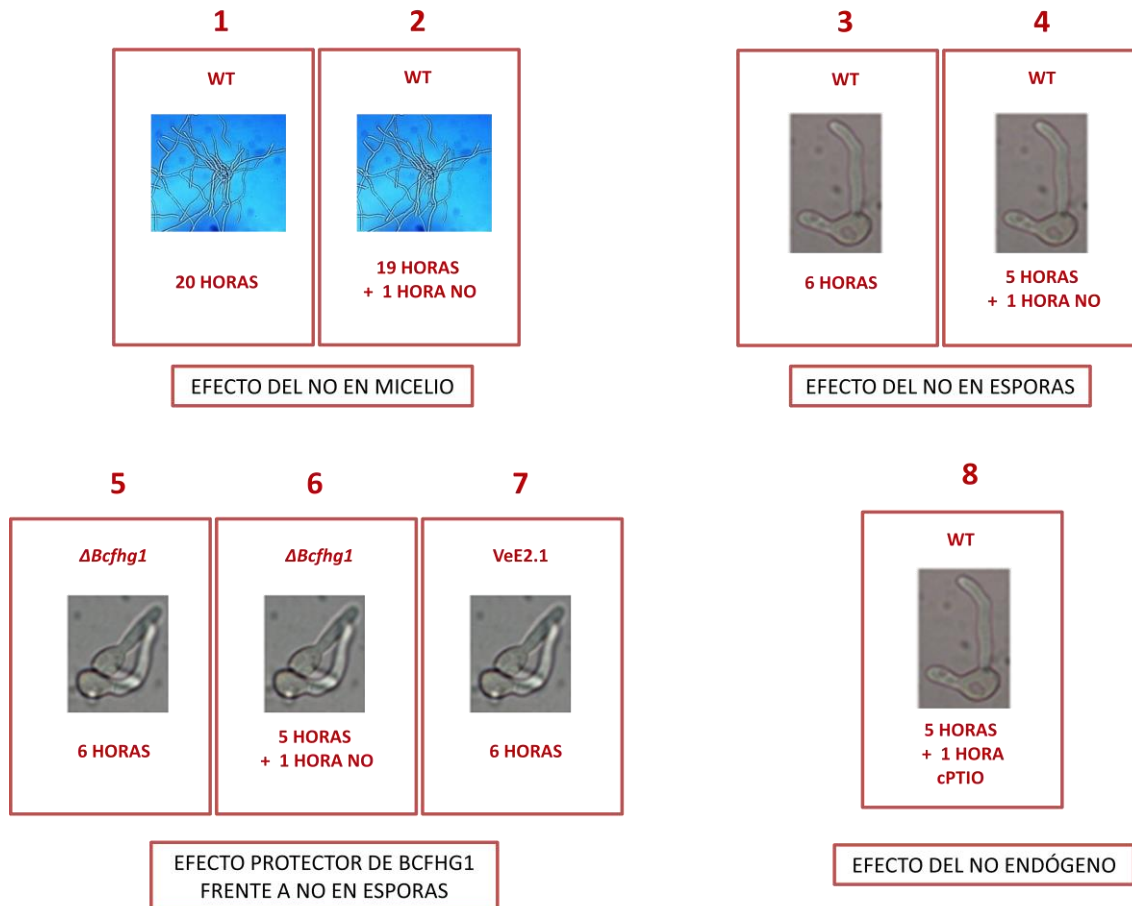
En segundo lugar, estudios previos han demostrado que la sensibilidad y la respuesta frente a NO exógeno de las esporas en fase de germinación y del micelio en crecimiento activo son diferentes. Concretamente, la exposición de micelio en crecimiento activo determina una estimulación de la producción de NO por el propio patógeno, estimulación que no se observa en esporas en germinación expuestas a NO. Esta respuesta diferencial implica, como vemos, producción de NO endógeno. Por lo tanto, el estudio comparativo de los patrones de expresión en ambos estadios de desarrollo en respuesta a NO exógeno puede contribuir a explicar no sólo las diferencias de comportamiento entre uno y otro, sino también a obtener información sobre los mecanismos de producción de NO endógeno en *B. cinerea*.

Para tratar, en la medida de lo posible, de dar respuesta a estas dos cuestiones principales y a diversas cuestiones relacionadas se propuso un análisis de expresión génica diferencial en las condiciones experimentales que se detallan a continuación. En este análisis se plantea la utilización de un microarray de ADN diseñado por la empresa Nimblegen en colaboración con el Consorcio de laboratorios que participaron en la secuenciación y anotación de los genomas de las cepas de *B. cinerea* B05.10 y T4 y de la cepa 1980 de *Sclerotinia sclerotiorum* (Amselem *et al.*, 2011).

#### a. Diseño experimental

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica diferencial se prepararon muestras de ARN total derivadas de los materiales biológicos cultivados en las condiciones apropiadas para abordar las cuestiones descritas en las secciones anteriores. El diseño experimental se concibió con 8 condiciones para las cuales se tuvo en cuenta el estadio de desarrollo del hongo, la cepa y el tratamiento con DETA y cPTIO. La Figura 22 presenta de forma visual un resumen de los tratamientos realizados con los códigos utilizados para simplificar la descripción y las referencias a las muestras generadas que a lo largo de este trabajo se hacen. Estas son:

- Muestra 1: Micelio tipo silvestre cultivado durante 20 horas
- Muestra 2: Micelio tipo silvestre cultivado durante 19 horas y expuesto a NO durante 1 hora
- Muestra 3: Esporas tipo silvestre cultivadas durante 6 horas
- Muestra 4: Esporas tipo silvestre cultivadas durante 5 horas y expuestas a NO durante 1 hora
- Muestra 5: Esporas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  cultivadas durante 6 horas
- Muestra 6: Esporas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  cultivadas durante 5 horas y expuestas a NO durante 1 hora
- Muestra 7: Esporas de la cepa VeE2.1 cultivadas durante 6 horas
- Muestra 8: Esporas de la cepa silvestre cultivadas durante 5 horas y expuestas a cPTIO durante 1 hora



**FIGURA 23.** Condiciones experimentales objeto de estudio en nuestro análisis de expresión génica diferencial de *B. cinerea* en respuesta a un donador de NO (DETA 125  $\mu$ M) y un secuestrador de NO (cPTIO 500  $\mu$ M).

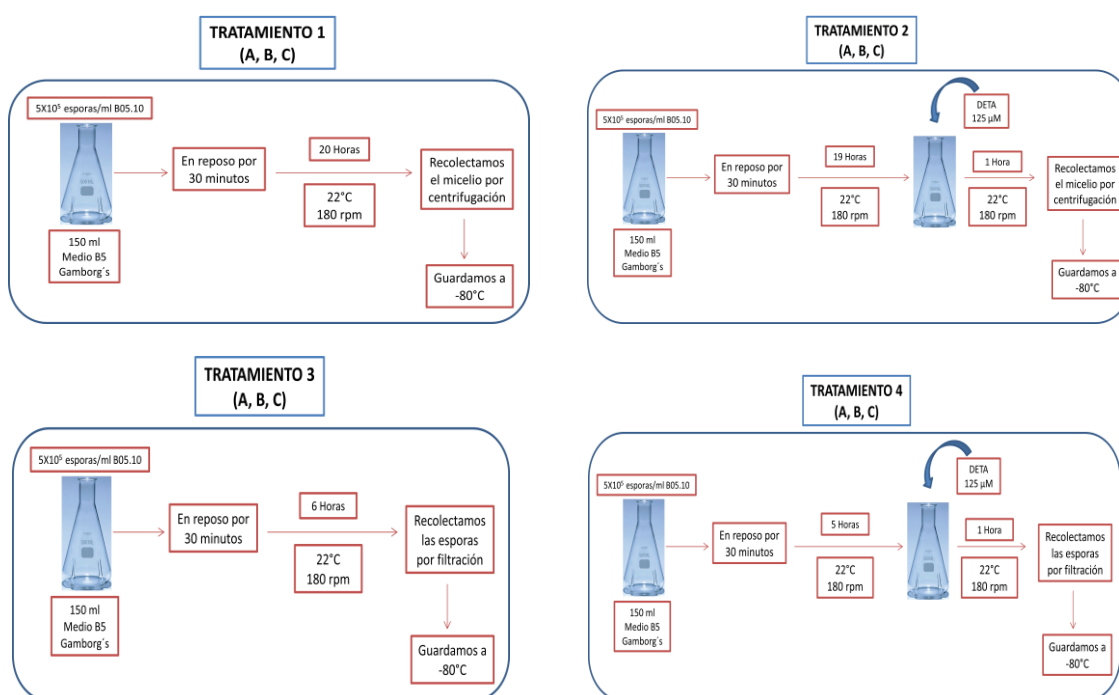
Analizando estas ocho condiciones experimentales es posible establecer varias comparativas de interés. Indicamos a continuación las comparativas que en principio nuestro diseño experimental nos permitirá abordar, llamando la atención expresamente sobre las que serán objeto de análisis en este trabajo de tesis doctoral.

- La comparativa 1 vs 2 permite analizar el efecto del NO en micelio en desarrollo.
- La comparativa 3 vs 4 permite analizar el efecto del NO en esporas en germinación.
- La comparativa 5 vs 7 permite analizar el efecto de la eliminación del gen *Bcfhg1* en ausencia de NO exógeno.
- La comparativa 5 vs 6 vs 7 permite analizar el efecto protector de BCFHG1 frente a NO en esporas en germinación.
- La comparativa 3 vs 7 permite analizar el efecto que el proceso de transformación puede determinar en el micelio derivado de un protoplasto regenerado.
- La comparativa 3 vs 8 permite analizar el efecto de la eliminación del NO endógeno.

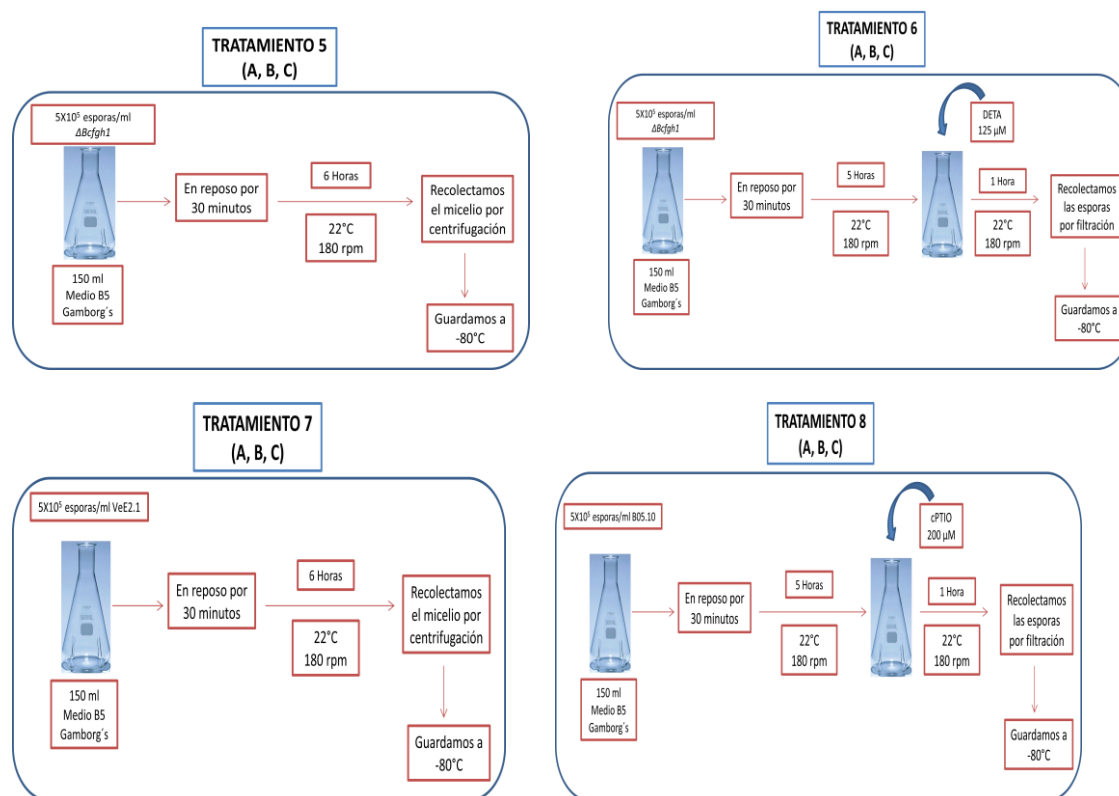
- La comparativa 1 vs 3 permite analizar la expresión génica diferencial en función del estadio de desarrollo.

Como vemos, en estos análisis se utilizan dos cepas de tipo silvestre, la cepa original B05.10 y una cepa derivada de esta, la cepa VeE2.1, concretamente derivada de un protoplasto generado a partir de la misma en un experimento de obtención de protoplastos para transformación y que ha sido sometido exactamente a los mismos tratamientos que los protoplastos utilizados para la transformación, excepto que no ha sido tratado con ADN transformante. Su utilización se justifica en observaciones previas en nuestro laboratorio que indican que el proceso de obtención y regeneración de protoplastos puede determinar alteraciones fenotípicas más o menos significativas que pueden alterar la caracterización fenotípica de mutantes (Turrión-Gómez, Tesis Doctoral). Aunque no es este el objetivo fundamental del trabajo que se describe en esta memoria, la cepa correspondiente ha sido utilizada como control en diversos experimentos de expresión génica diferencial y de evaluación del fenotipo de cepas mutantes.

Las condiciones experimentales particulares en las que se cultivaron los distintos materiales biológicos utilizados en este trabajo son los siguientes. Para facilitar su descripción se incluyen los esquemas temporales correspondientes en la Figura 23.



**FIGURA 24.** Esquema de los experimentos llevados a cabo de las 8 condiciones propuestas en el análisis de expresión génica diferencial en respuesta a donadores de NO exógeno y secuestradores de NO endógeno.



**FIGURA 25.** Esquema de los experimentos llevados a cabo de las 8 condiciones propuestas en el análisis de expresión génica diferencial en respuesta a donadores de NO exógeno y secuestradores de NO endógeno.

Los experimentos llevados a cabo en el tratamiento 1 y 2 corresponden a esporas de la cepa silvestre B05.10 mantenidas en reposo durante 30 minutos y seguidamente incubadas durante 20 horas a 22°C y 180 r.p.m. en medio Gamborg's B5S. A la muestra correspondiente al tratamiento 2, se añadió al cultivo de 19 horas de incubación, DETA a una concentración final de 125 µM, y se incubó por 1 hora más hasta cumplir con las 20 horas establecidas. El procedimiento para los tratamientos 3 y 4 corresponde a esporas de la cepa silvestre B05.10 mantenidas igualmente en reposo durante 30 minutos y seguidamente incubadas durante 6 horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación que para los tratamientos 1 y 2. En este caso, a la muestra correspondiente al tratamiento 4 se le añadió DETA 125 µM al cultivo de 5 horas de incubación para posteriormente dejarla por 1 hora más hasta cumplir con las 6 horas de cultivo establecidas. En los tratamientos 5 y 7 se realizó el mismo procedimiento que para el tratamiento 3 con la única diferencia que en este caso las muestras corresponden a esporas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  y de la cepa silvestre VeE2.1, respectivamente. El tratamiento 6 se llevó a cabo de la misma manera que el tratamiento 4 con la única diferencia de que la muestra corresponde a esporas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . El tratamiento 8 corresponde a esporas de la cepa silvestre B05.10 mantenidas 30 minutos en reposo e incubadas durante 5 horas a 22°C y 180 r.p.m en medio Gamborg's B5S, a las cuales se les añadió cPTIO a una concentración final de 200 µM y se las dejó incubar durante 1 hora más.

Todas las muestras fueron recolectadas una vez culminado su tiempo de incubación establecido y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En cada condición se prepararon cuatro muestras idénticas en paralelo. A partir del material biológico recogido en cada caso se extrajo ARN total siguiendo los procedimientos descritos en la sección 8.c de Materiales y Métodos. Una vez comprobada la integridad de todas las muestras en gel de agarosa y una vez estimada la concentración de ARN en cada caso se prepararon las muestras que fueron enviadas a la empresa Nimblegen para su utilización en el análisis de expresión génica global. Concretamente se enviaron  $20\ \mu\text{g}$  de ARN total de cada una de tres réplicas biológicas, que fueron denominadas A, B y C, de cada condición (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Se conservó ARN total de una cuarta réplica biológica de cada condición para llevar a cabo la validación de los resultados obtenidos en el análisis de microarrays, si fuera necesario, posteriormente.

La empresa Nimblegen proporcionó, finalmente, las series de datos derivadas de los análisis que llevaron a cabo. Estos consistieron en una serie de tablas Excel con los datos de expresión crudos en cada condición y en cada réplica y la misma serie de datos una vez han sido sometidos a un proceso de normalización interna. Son estas últimas tablas las que se han utilizado en todos los análisis llevados a cabo en nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Rodrigo Santamaría, del Departamento de Automática de la Universidad de Salamanca.

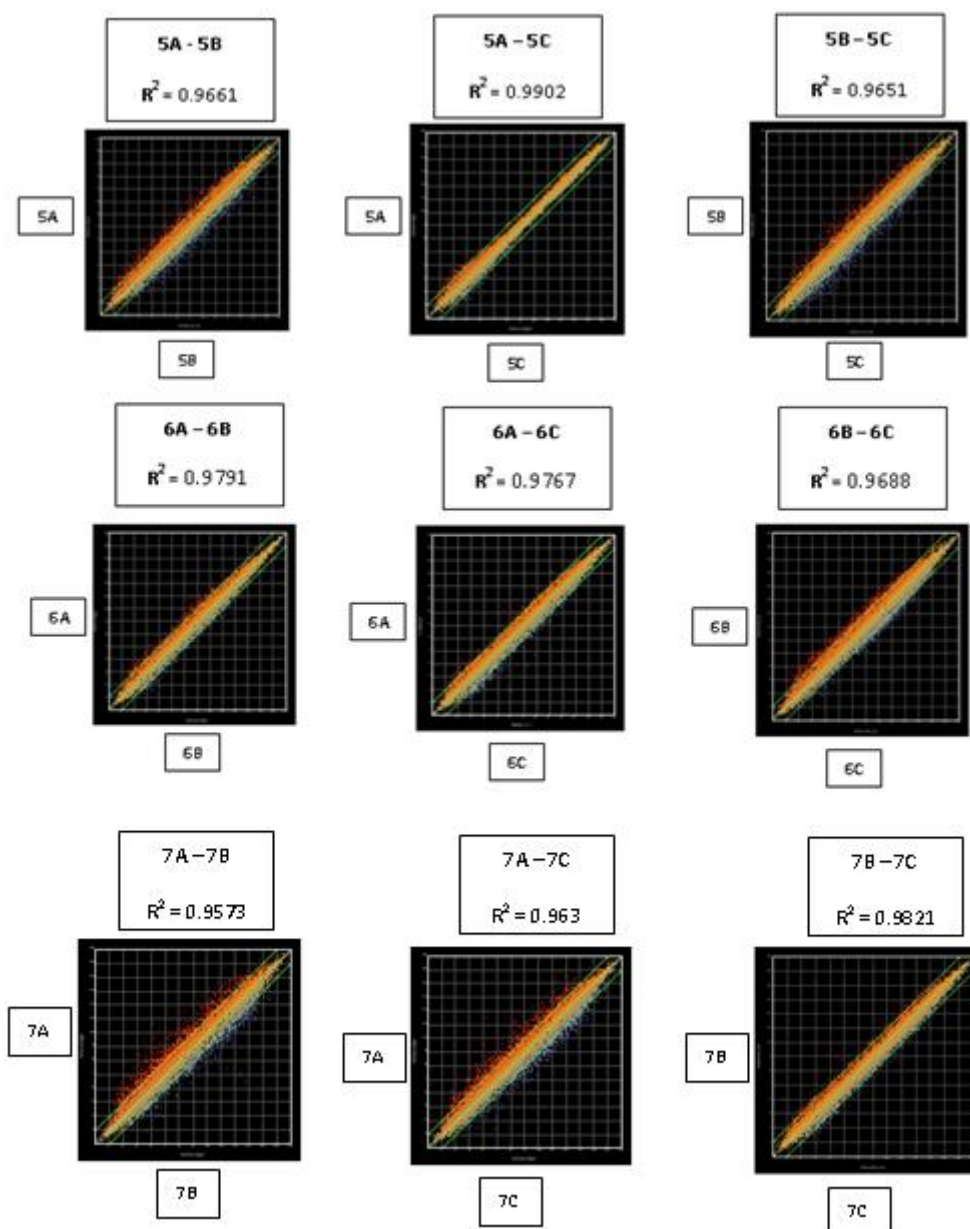
De todas las comparaciones que es posible considerar con los materiales generados en nuestro trabajo, para la realización de esta tesis doctoral nuestra atención se ha centrado en dos en particular. En primer lugar la comparación 3vs4, que debe proporcionar información sobre los factores genéticos que responden a NO exógeno en la fase de germinación de las esporas, estando interesados en particular en determinar el posible papel señalizador del NO en esta fase de desarrollo y los mecanismos que puedan explicar el retraso en la germinación que se observa cuando las esporas en germinación son expuestas a NO. Y en segundo lugar, la comparación 5vs6vs7, es decir el efecto del NO sobre un sistema carente de la enzima BCFHG1 y por lo tanto desprotegido frente a condiciones de estrés nitrosativo. En estas condiciones se observa no un retraso sino un bloqueo en germinación, probablemente porque se acentúan los efectos del NO sobre los sistemas de regulación y su utilización puede ayudar a revelar la identidad de los factores genéticos y de los procesos regulados por NO. Teniendo en cuenta estas reflexiones comenzamos nuestro análisis precisamente con esta comparación, la que hace uso de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ .

b. Análisis del efecto protector de BCFHG1 frente a NO en esporas (5vs6vs7)

Se tomaron en primer lugar las series de datos correspondientes a las condiciones 5, 6 y 7. Con nuestro diseño experimental en estas condiciones estamos “disparando” el programa de germinación cultivando las esporas de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  durante 5 horas. Transcurrido este tiempo en una serie de muestras (serie 6) se añade el donador de NO y se prolonga la incubación una hora más. Otra serie de muestras se mantienen en agitación in adición de NO exógeno. Transcurrida esta hora de exposición a NO para la serie 6, los materiales biológicos de ambas son recogidos y congelados inmediatamente. Como control adicional se cultivan en las mismas condiciones esporas de la cepa VeE2.1, que en este experimento representa la cepa tipo silvestre a partir de la cual se ha obtenido el mutante  $\Delta Bcfhg1$ , y que no son expuestas a NO, con el objeto de discriminar entre aquellos genes que responden a NO exógeno y aquellos genes alterados como consecuencia de la mutación.

Como parte de la evaluación de la calidad de los datos facilitados por la empresa Nimblegen, se realizó inicialmente un análisis de la reproducibilidad de las 3 réplicas biológicas de cada condición, para determinar si se observaban diferencias entre réplicas biológicas y si en caso de ser así, se encontraban dentro de un margen de error aceptable. Para ello se utilizó el programa DNASTAR'S ArrayStar 4.1, que permite calcular la correlación entre dos muestras dadas (en este caso 2 de las 3 réplicas biológicas de cada condición) y que se visualiza mediante la herramienta gráfica “Scatter Plot”. Como resultado se obtiene un gráfico XY (Figura 24) en donde cada uno de los ejes representa una de las dos réplicas biológicas de una condición dada, y un valor de  $R^2$ , coeficiente de correlación que mide la proporción de variación de una muestra con respecto a otra. Cuanto más próximo a 1, más similares son las dos réplicas biológicas comparadas en cada caso. Si son muy similares entre sí, se pueden dar como válidas para continuar con el análisis de expresión diferencial.



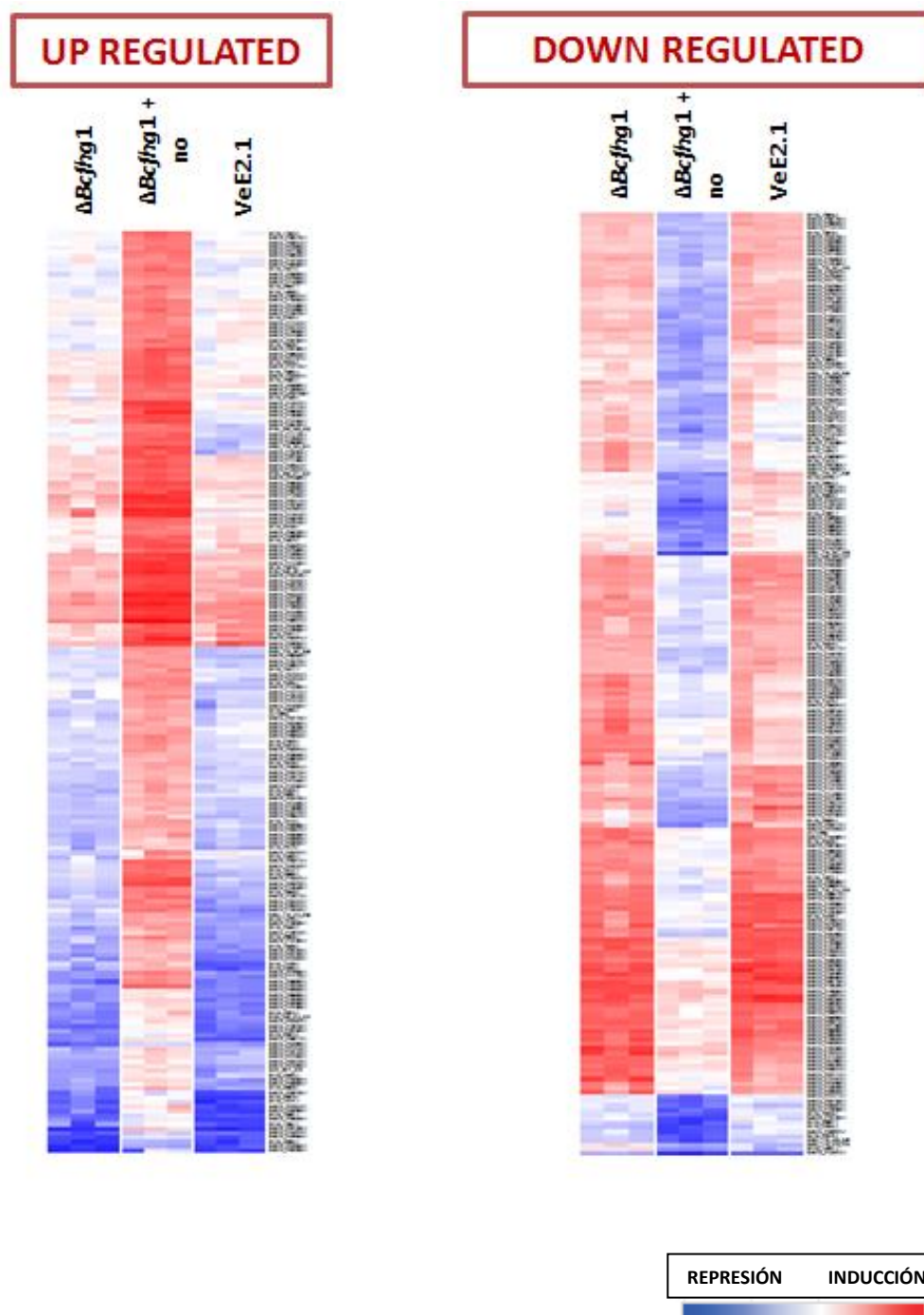


**FIGURA 26.** Scatter plots de las 3 réplicas biológicas (A, B y C) de las condiciones 5, 6 y 7. En cada gráfico XY se representa la comparación de 2 de las 3 réplicas de cada condición y su respectivo valor de  $R^2$ .

En la Figura 24 se presentan los Scatter plots correspondientes a las condiciones 5, 6 y 7, y por las gráficas que presentan cada una de las comparaciones de sus réplicas, junto con el valor de  $R^2$  indicado en cada una de ellas, se puede decir que las réplicas biológicas son válidas dado que en todos los casos existe una correlación muy alta. Con estos resultados, indicativos de una reproducibilidad muy alta en cada serie de réplicas biológicas, se prosiguió con el análisis diferencial propiamente dicho.

La comparación 5vs6vs7, es decir la cepa control VeE2.1 comparada con el mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  expuesto y no expuesto a NO exógeno (tratamiento con DETA), nos plantea una interrogante con carácter global: BCFHG1, ¿protege a *B. cinerea* frente a estrés nitrosativo?

Teniendo este planteamiento como base, y haciendo uso del paquete bioinformático Limma (los programas utilizados para llevar a cabo los análisis de expresión génica diferencial y de enriquecimiento funcional, así como las características básicas de estos análisis, se describen en la sección 21 de Materiales y Métodos), se realizó una primera búsqueda de los genes diferencialmente expresados con las condiciones de selección estándar utilizadas en los análisis de expresión génica global con microarrays: un nivel de inducción o represión de 2 y un p-value <0,01. Así se obtuvieron 5924 genes expresados diferencialmente en esta comparativa; número de genes muy elevado indicativo de que la exposición a NO en un sistema carente del mecanismo fundamental de detoxificación de NO determina la alteración del patrón de una parte muy significativa del genoma del hongo. Un número tan elevado de genes complicaría cualquier análisis posterior de enriquecimiento funcional. Por esta razón, y para obtener una lista de genes que respondan a NO más reducida, pero que recoja aquellos genes que lo hacen de manera más intensa, se decidió elevar los niveles de astringencia en nuestro análisis a un cambio de nivel de expresión (inducción o represión) de 8 y un p-value <0,01. En esas condiciones se identificaron 426 genes que responden a NO, de los cuales 210 muestran aumento en el nivel de expresión en respuesta a la exposición con NO exógeno, y 216 genes muestran represión en las mismas condiciones. La Figura 25 muestra una representación gráfica mediante heat maps de los genes incluidos en una y otra categoría.

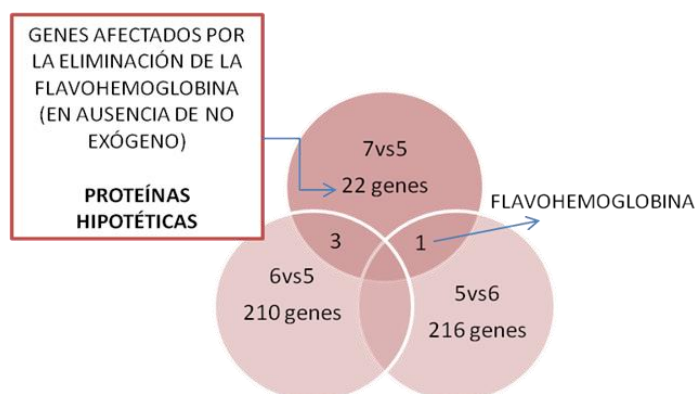


**FIGURA 27.** Heatmap de genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO exógeno (down regulated, 5vs6) y genes cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO exógeno (up regulated, 6vs5) en la comparación 5vs6vs7. Los genes cuyo patrón está representado en color azul, corresponden a aquellos cuya expresión está reprimida y los representados en rojo corresponden a los genes cuya expresión está inducida en las condiciones mencionadas anteriormente.

Al comparar solamente las condiciones 7vs5 es posible identificar aquellos genes cuya expresión se ve alterada como consecuencia de la eliminación de la flavohemoglobina del microorganismo. Se encontraron 26 genes que responden a esta situación (Figura 26). De ellos, tres aparecen también en el listado de genes cuya expresión aumenta en respuesta a NO, y

fueron eliminados de nuestro listado de genes inducidos en respuesta a NO. Por su parte, uno de los 26 genes aparece en la lista de genes reprimidos en respuesta a NO. Este es el gen que codifica la enzima BCFHG1, gen eliminado por reemplazamiento génico en la cepa  $\Delta Bcfhg1$  utilizada en esa comparativa que, obviamente, no puede mostrar expresión alguna en esta cepa en comparación con la cepa silvestre. De los 25 genes restantes, 10 codifican proteínas hipotéticas y los otros 15 genes codifican proteínas como citocromos p450, varias enzimas como ciclasas, amilasas, atpasas y péptidosintetasas no ribosomales (NRPS), y proteínas de membrana.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, finalmente nuestro análisis ha proporcionado una lista de genes cuya expresión aumenta en respuesta a la exposición a NO integrada por 207 genes (lista “6 vs 5”), y una lista de genes cuya expresión es reprimida en respuesta a NO integrada por 215 genes (“5 vs 6”). Estas dos listas se presentan en la sección de anexos (Anexo 1 y Anexo 2). También se encuentra como anexo la lista correspondiente a los 26 genes de la comparativa 7 vs 5 (Anexo 3).



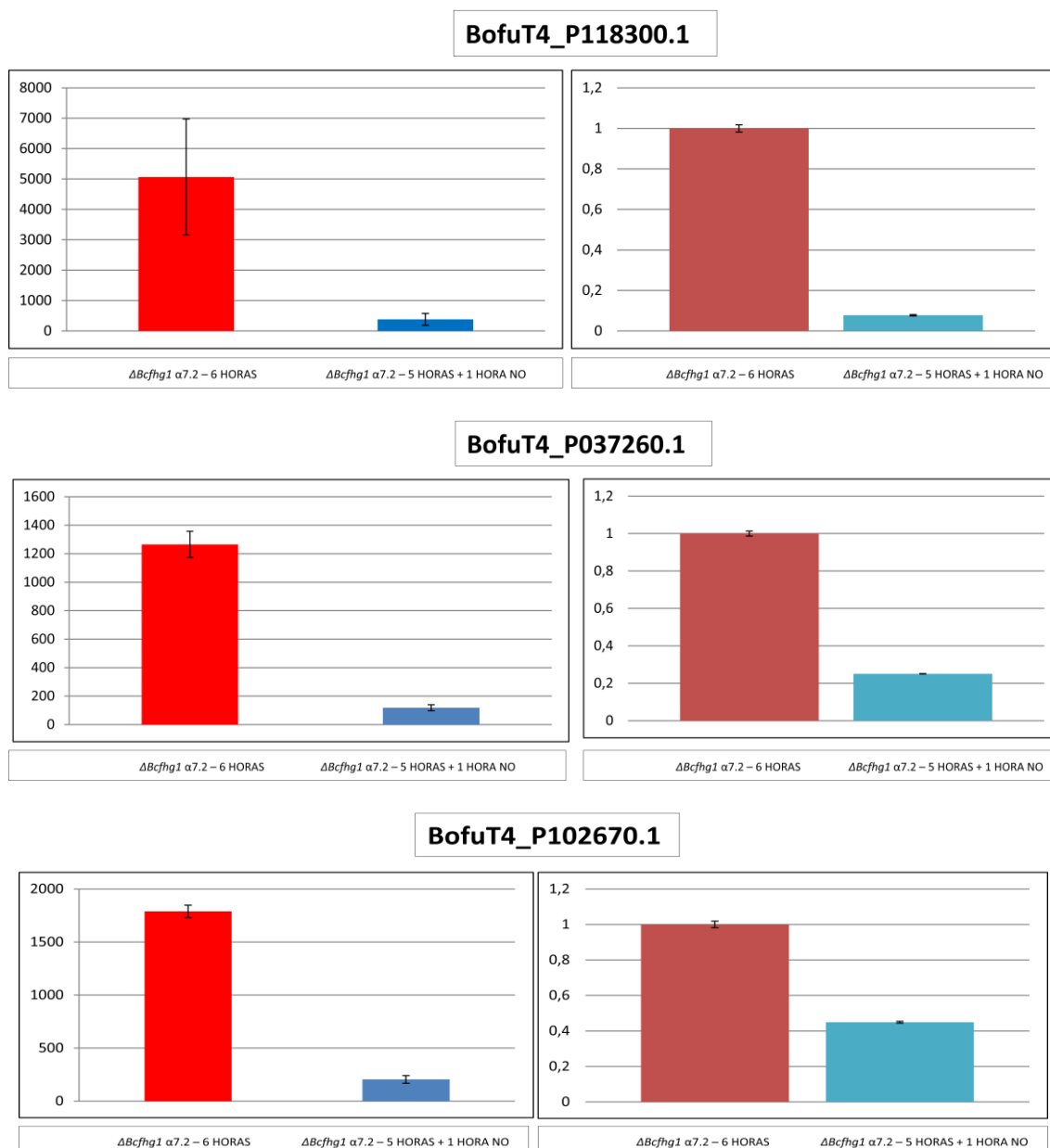
**FIGURA 28.** Número de genes identificados en cada una de las comparaciones de las condiciones 5vs6vs7. “6 vs 5”: genes cuya expresión es mayor en la condición 6 en relación con la condición 5, es decir, cuya expresión aumenta en la condición 6 -exposición a NO- en relación a la condición 5 -no exposición a NO-. “5 vs 6”: genes cuya expresión es mayor en la condición 5 en relación a la condición 6, es decir, cuya expresión se reprime en la condición 6 -exposición a NO- en relación con la condición 5 -no exposición a NO-.

Una vez obtenidas las listas de genes de cada comparación realizada, se procedió a la validación de la expresión diferencial de un grupo de ellos mediante PCR en tiempo real. Se planteó esta validación para confirmar que, en efecto, existe un cambio en los niveles de expresión de los genes detectados mediante las hibridaciones llevadas a cabo sobre los microarrays utilizados en este trabajo. Los genes escogidos de la comparación 5vs6vs7 para su validación se detallan en la tabla 9.

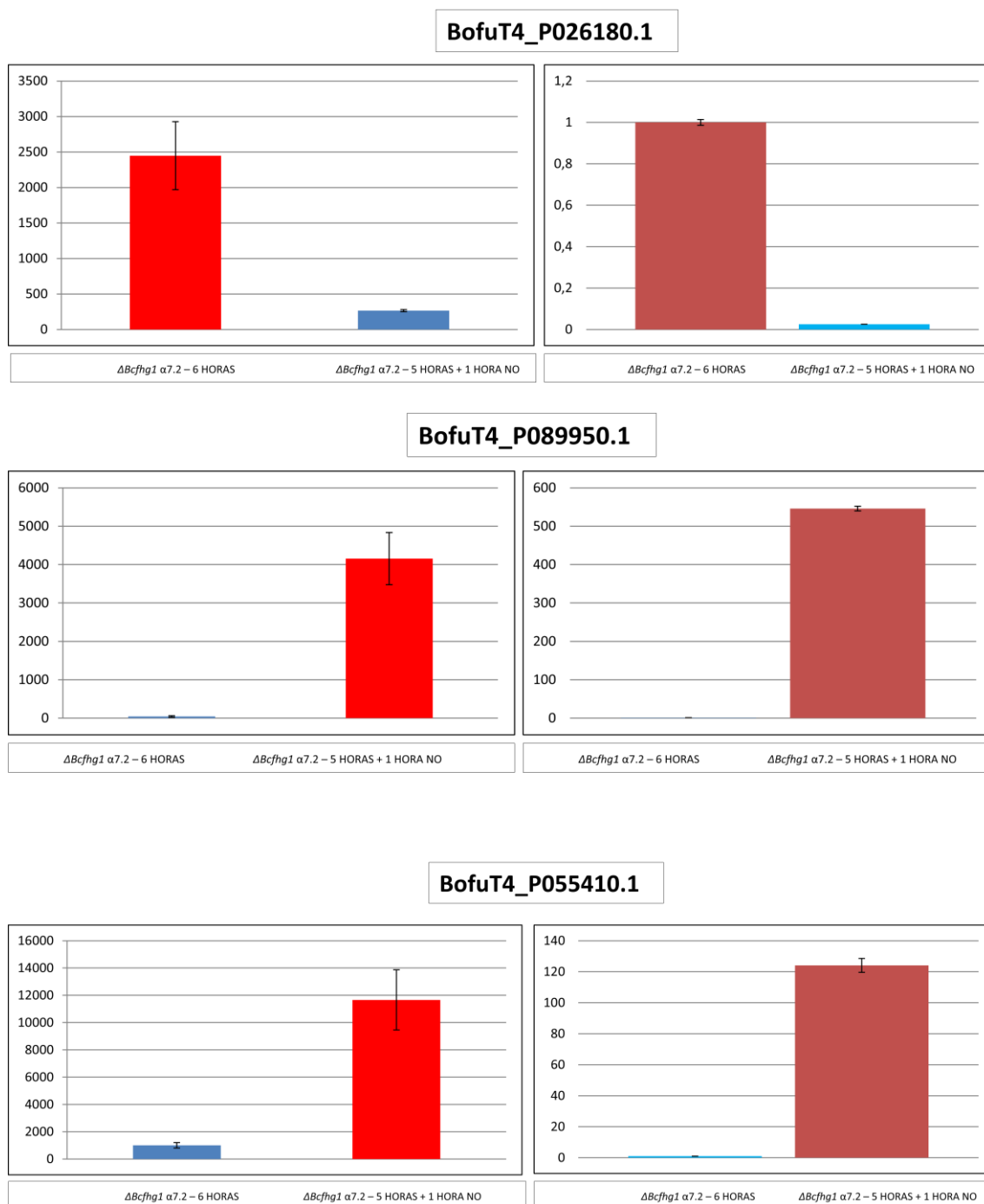
**Tabla 9.** Genes escogidos para su validación mediante PCR Cuantitativa que pertenecen a la comparación 5vs6vs7. Se indican los códigos de los genes, su función y categoría GO y el valor log2 de su nivel de inducción (+) o represión (-).

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN (PUTATIVA)	CATEGORÍA GO	Log2
<b>BoFuT4_P118300.1</b>	Similar to M-phase inducer phosphatase	CICLO CELULAR	-3,8
<b>BoFuT4_P037260.1</b>	Similar to histone H3 methyltransferase		-3,4
<b>BoFuT4_P102670.1</b>	Similar to Condensin complex subunit 1		-3,1
<b>BoFuT4_P026180.1</b>	Similar to Kinetochore protein		-3,2
<b>BoFuT4_P089950.1</b>	Similar to Isoflavone reductase family protein (Nmr like protein)	UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO	+6,7
<b>BoFuT4_P055410.1</b>	Similar to nmrA-like family protein		+3,5
<b>BoFuT4_P011760.1</b>	Similar to SDA1 – domain containing protein (citoeskeleton)	NUCLEOLO	-4,5
<b>BoFuT4_P159180.1</b>	Similar to U3 small nucleolar RNA-associated protein		-3,7
<b>BoFuT4_P057260.1</b>	Similar to Glutathione S – transferase	GST	+7,1

La Figura 27 muestra los histogramas de cada uno de los genes escogidos para su validación por PCR Cuantitativa, realizados tanto con los datos del microarray como con los obtenidos por PCR Cuantitativa. En los mismos se cuantifican los niveles de expresión de cada gen de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en presencia de NO exógeno en relación con el nivel de expresión en ausencia de NO exógeno.

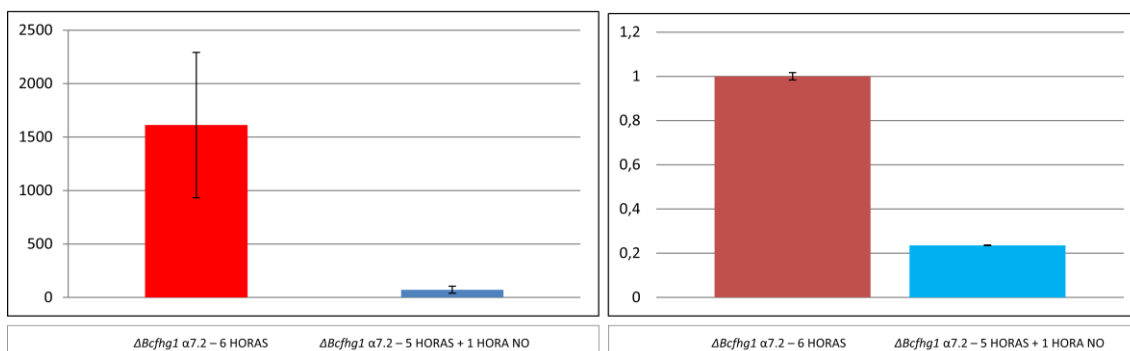


**FIGURA 29.** Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 9 genes seleccionados para su validación por PCR Cuantitativa. Los histogramas de la izquierda han sido generados con los datos obtenidos en el análisis de microarray y los de la derecha han sido generados con los datos obtenidos mediante PCR Cuantitativa. Los 9 genes representados en ambos histogramas pertenecen a las listas de genes diferencialmente expresados con un cambio en sus niveles de expresión superior a 8 y un p- value <0,01 de los 426 genes encontrados en la comparación de las condiciones 5vs6vs7 derivados del análisis de microarray.

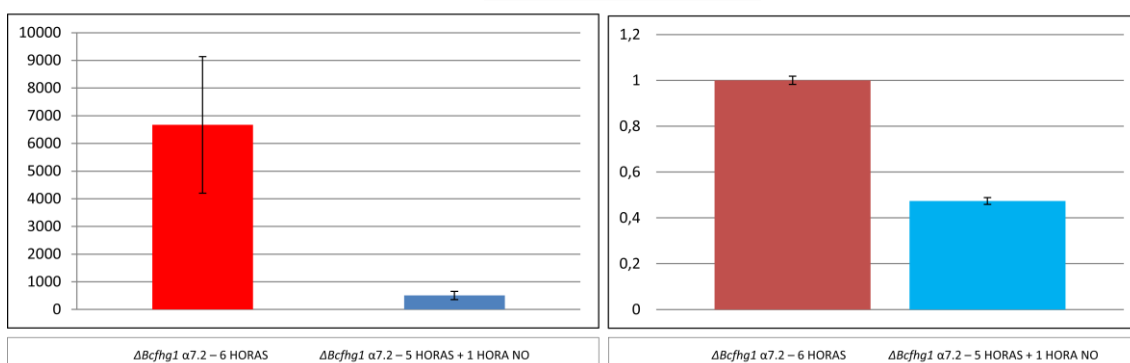


**FIGURA 30.** Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 9 genes seleccionados para su validación por PCR Cuantitativa. Los histogramas de la izquierda han sido generados con los datos obtenidos en el análisis de microarray y los de la derecha han sido generados con los datos obtenidos mediante PCR Cuantitativa. Los 9 genes representados en ambos histogramas pertenecen a las listas de genes diferencialmente expresados con un cambio en sus niveles de expresión superior a 8 y un p- value <0,01 de los 426 genes encontrados en la comparación de las condiciones 5vs6vs7 derivados del análisis de microarray.

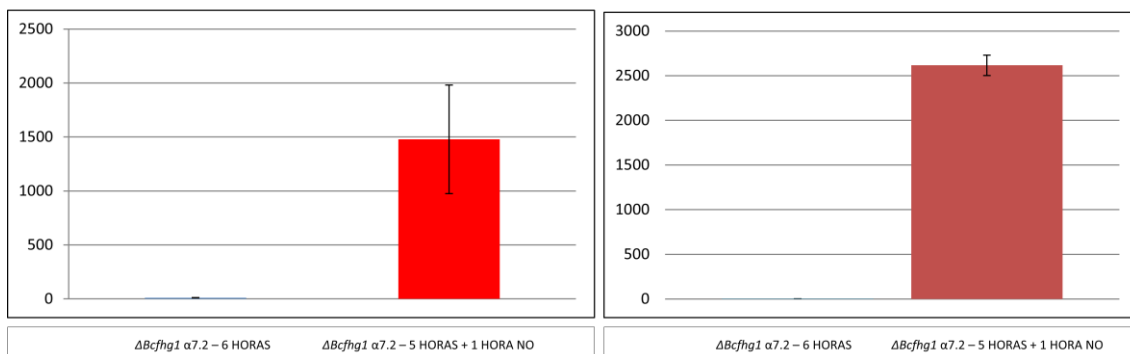
## BofuT4\_P011760.1



## BofuT4\_P159180.1



## BofuT4\_P057260.1



**FIGURA 31.** Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 9 genes seleccionados para su validación por PCR Cuantitativa. Los histogramas de la izquierda han sido generados con los datos obtenidos en el análisis de microarray y los de la derecha han sido generados con los datos obtenidos mediante PCR Cuantitativa. Los 9 genes representados en ambos histogramas pertenecen a las listas de genes diferencialmente expresados con un cambio en sus niveles de expresión superior a 8 y un p- value <0,01 de los 426 genes encontrados en la comparación de las condiciones 5vs6vs7 derivados del análisis de microarray.

Los cambios en los niveles de expresión de los 9 genes de la tabla 9 detectados en el análisis de microarray se corresponden esencialmente con los resultados obtenidos en la PCR Cuantitativa. Aunque los niveles de inducción o represión estimados en algunos casos muestren diferencias de magnitud, en todos los genes analizados se detecta bien inducción,



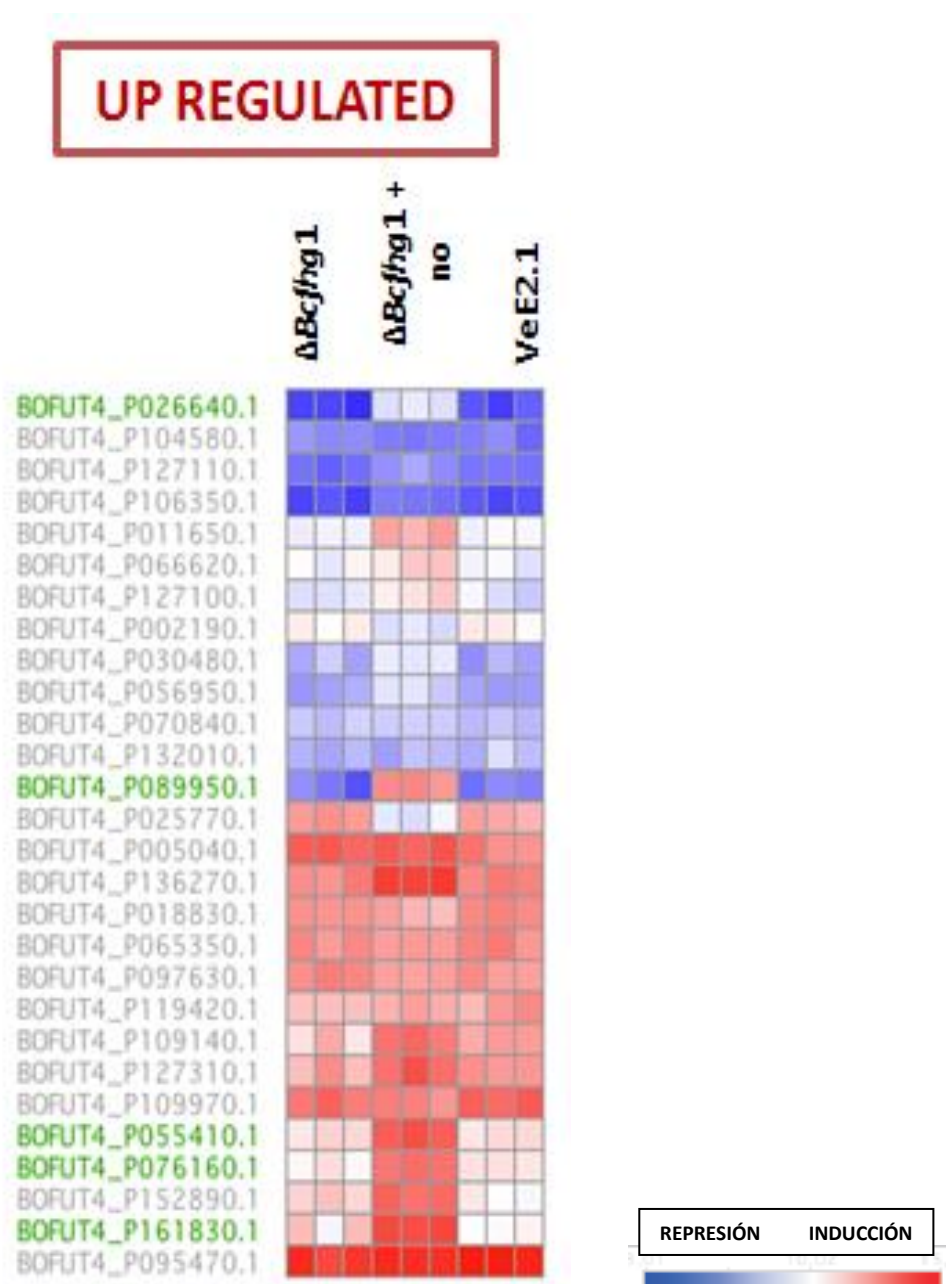
bien represión, en las condiciones analizadas tanto cuando se utilizan los datos generados mediante hibridación de microarrays como cuando se utilizan los datos derivados del análisis de PCR cuantitativa. Podemos tener garantías, por lo tanto, de que estamos manejando datos y estimaciones fiables en cuanto a las listas de genes expresados diferencialmente que nuestros análisis de los datos derivados de la hibridación de microarrays ha permitido generar.

Utilizando las listas de genes diferencialmente expresados, inducidos o reprimidos, en respuesta a NO y las anotaciones de términos GO a nuestra disposición para aquellas proteínas de las que disponemos de anotaciones de tipo funcional derivadas de la anotación del genoma de *B. cinerea* se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional utilizando el programa Go-Bayes del paquete informático MGSA (Bauer *et al.*, 2011). Los autores indican que la probabilidad mínima para aceptar enriquecimiento, desde un punto de vista estadístico, es del 50% (0,5). La tabla 10 muestra las categorías funcionales y la probabilidad de que una categoría dada represente una categoría funcional enriquecida cuando se consideran los genes que integran la lista de genes cuya expresión aumenta en la condición de exposición a NO (6 vs 5). En este análisis se detectan únicamente dos categorías funcionales, las relacionadas con los términos GO “Regulación de la utilización de nitrógeno” y “Utilización de nitrógeno” (dos términos GO relacionados), con valores de probabilidad próximos al límite considerado como significativo.

**Tabla 10.** Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión aumenta en respuesta a NO en la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (6 vs 5).

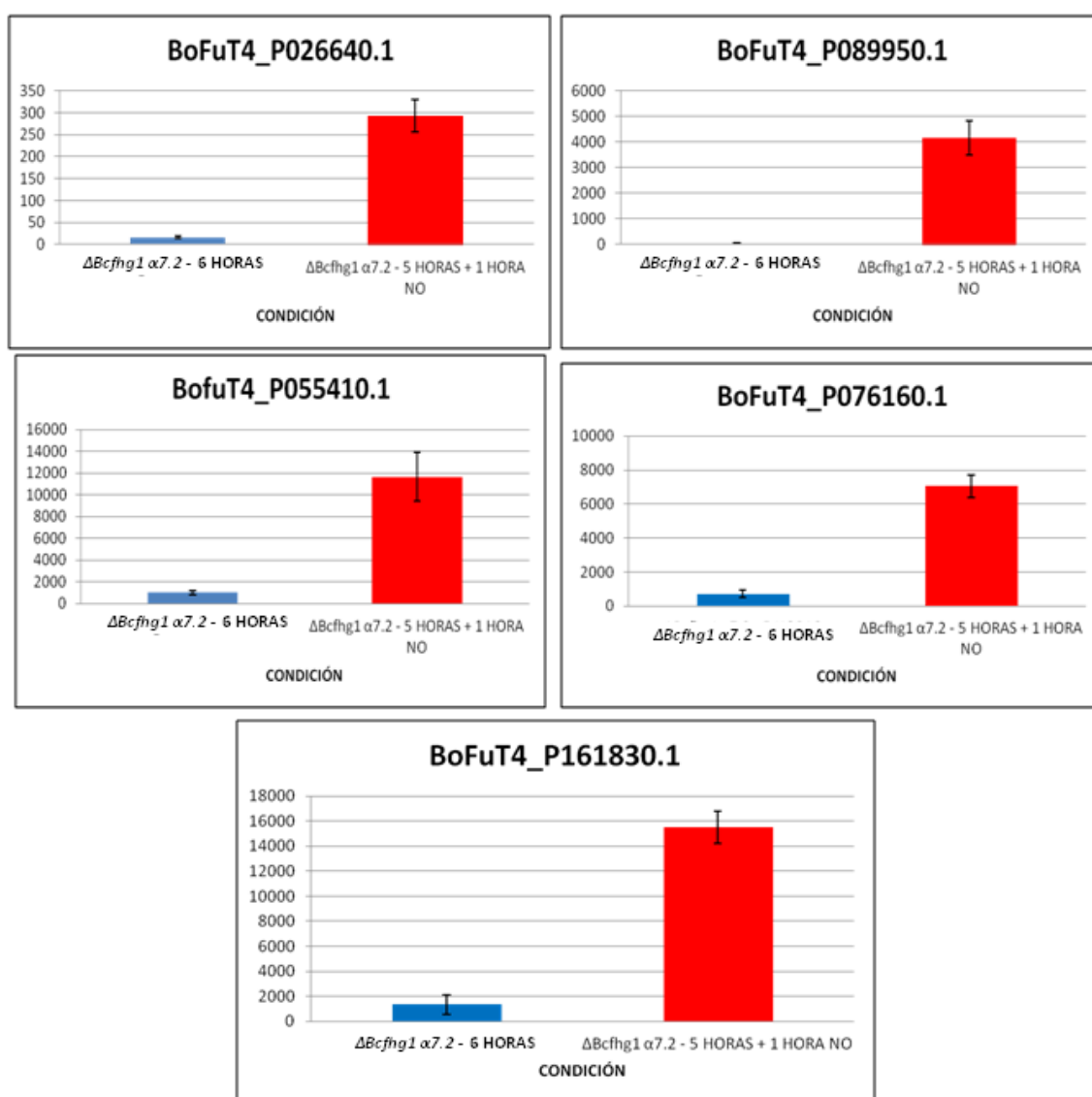
# GENES ANOTADOS	# GENES DIFERENCIALMENTE ANOTADOS	PROBABILIDAD DE ENRIQUECIMIENTO	TÉRMINO GO
26	5	0,4694696	Regulación de la utilización de nitrógeno
26	5	0,4631012	Utilización de nitrógeno
8	2	0,0985542	Actividad catalasa
8	2	0.0938634	Procesos catabólicos de compuestos aromáticos
40	4	0.0553886	Actividad N-acetiltransferasa
42	4	0.0343704	Actividad N-aciltransferasa
1	1	0.0301344	Cianuro hidratasa
1	1	0.0206542	Homogentisato 1,2 dioxigenasa
2	1	0.0180678	Procesos metabólicos de lignina
2	1	0.0180144	Procesos catabólicos de fenilpropanoides

La Figura 28 muestra una representación visual de todos los genes del genoma anotado de *B. cinerea* que incluyen en su anotación el término GO “Regulación de la utilización del nitrógeno” (26), identificando en color verde el código numérico de aquellos genes diferencialmente expresados en estas condiciones (5).



**FIGURA 32.** Heat map de todos los genes del genoma anotado de *B. cinerea* que incluyen en su anotación el término GO “Regulación de la utilización del nitrógeno” (26), identificando en color verde el código numérico de aquellos genes diferencialmente expresados en estas condiciones (5).

De los 5 genes podemos destacar 2: BoFuT4\_P026640.1 y BoFuT4\_P055410.1. El primero es un gen identificado como similar a una proteína de la familia de la isoflavona reductasa CipA y el segundo como similar a una proteína de la familia nmr-A. Este último está relacionado con la familia nmr-A, un regulador transcripcional negativo implicado en la modificación post-traducciona del factor de transcripción AreA. Nmr-A es parte del sistema que controla la represión de metabolitos de nitrógeno en hongos y el hecho de que se encuentre formando parte de los genes inducidos por NO en el mutante deficiente de la flavohemoglobina es notable. El cambio en los niveles de expresión de los 2 genes en ambas condiciones (sin y con NO) se representa en la Figura 29.



**FIGURA 33.** Histogramas que representan el cambio en los niveles de expresión de los genes diferencialmente expresados: BoFuT4\_P026640.1, BoFuT4\_P089950.1, BoFuT4\_P055410.1, BoFuT4\_P076160.1 y BoFuT4\_P161830.1, cuya expresión se ve inducida por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ .

Dentro del listado de genes cuya expresión se induce por NO en la comparación 5 vs 6 vs 7 también podemos encontrar otras categorías GO representadas a pesar de no haber sido detectadas como enriquecidas en estas condiciones por el programa Go-Bayes (Anexo 1), entre ellas podemos nombrar a las categorías denominadas como “Actividad oxidorreductasa”, “Transporte transmembrana” y “Actividad hidrolasa”. Encontramos además, muchos genes relacionados con el estado redox de la célula y dentro de ellos el que presenta el más alto nivel de inducción es el gen BoFuT4\_P057260.1. Este gen codifica una enzima Glutation S-transferasa (GST), enzimas muy importantes en el metabolismo celular en particular en la fase II de detoxificación de compuestos y respuesta a estrés oxidativo. Existen dos superfamilias de estas enzimas multifuncionales cuya primera identificación en *B. cinerea* fue la de la enzima codificada por el gen *bcgst1*. El estudio realizado por Prins *et al.* (2000) comprobó que la expresión de este gen se ve inducida frente a estrés oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Actualmente se conoce que el genoma de *B. cinerea* presenta 7 genes con secuencia similar a aquellos reconocidos como codificadores de GSTs.

Se llevó a cabo el mismo tipo de análisis de enriquecimiento funcional utilizando la lista de genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO (lista 5 vs 6). La tabla 11 muestra las categorías funcionales obtenidas en este caso. Se comprueba que sólo dos categorías funcionales, las correspondientes a los términos “Replicación de ADN” y “Nucleolo” aparecen con un valor de probabilidad superior al límite considerado como aceptable. Pero en este caso los valores de probabilidad de estas categorías son muy elevados. Además, con valores ya inferiores a 0,5 se recogen varias categorías funcionales correspondientes a términos GO relacionados entre sí (de hecho, algunos de los genes están incluidos en varios de estos términos GO) y relacionados con ciclo celular: “Fase de ciclo celular”, “Fase M”, “Procesos de ciclo celular”, “Ciclo celular mitótico”. De forma similar, encontramos varios términos GO relacionados con ADN y reparación de ADN (“Unión de ADN”, “Reparación de mismatch”, “Unión a ADN de doble cadena”).

**Tabla 11.** Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO en la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (5 vs 6).

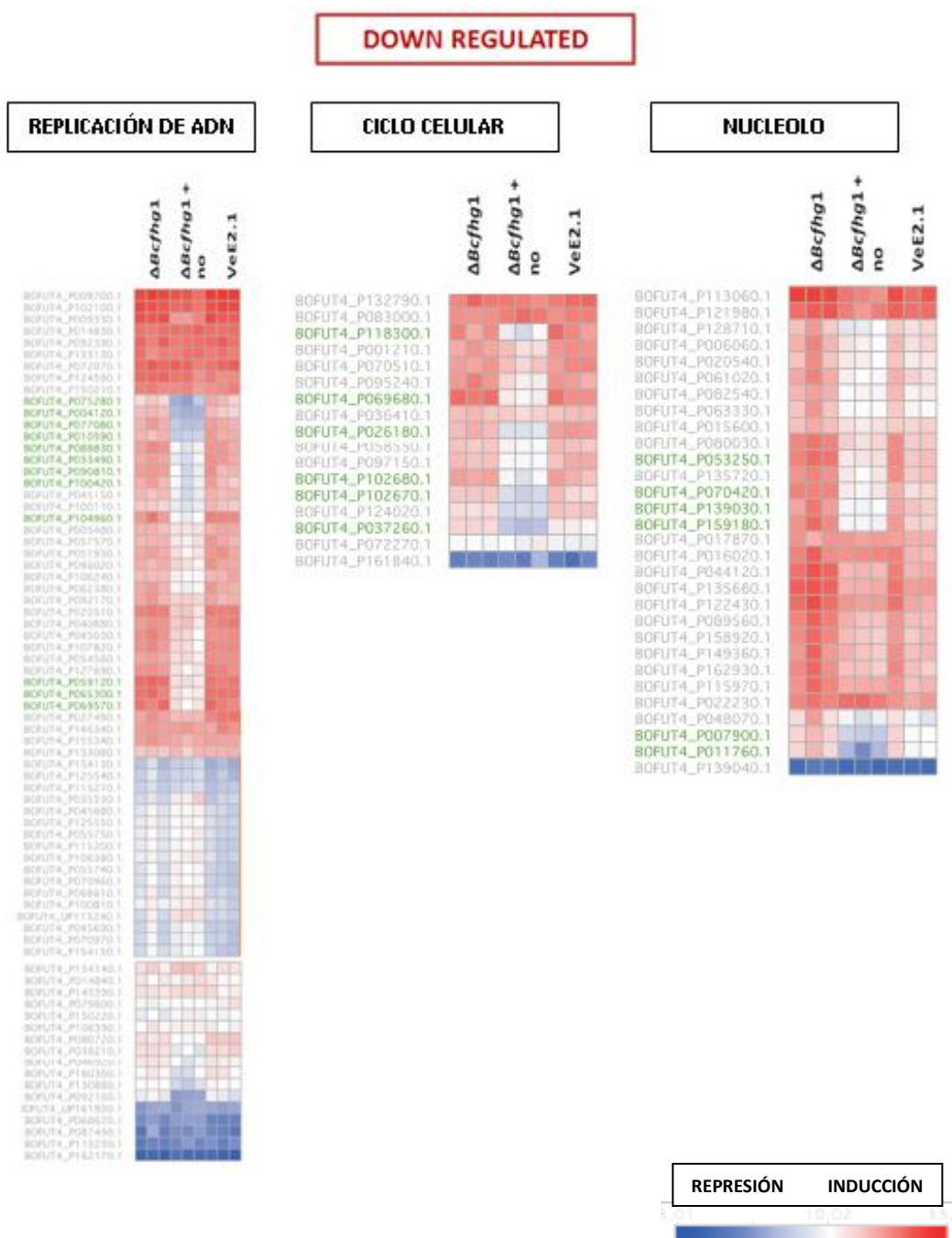
# GENES ANOTADOS	# GENES DIFERENCIALMENTE ANOTADOS	PROBABILIDAD DE ENRIQUECIMIENTO	TÉRMINO GO
74	14	0.9847178	Replicación de ADN
32	7	0.7264504	Nucleolo
23	9	0.3700246	Fase de Ciclo celular
22	8	0.262645	Fase M
8	2	0.1783308	Unión a ADN
26	9	0.1629578	Procesos de ciclo celular
8	2	0.1601692	Reparación de

			missmatch
9	2	0.152903	Unión a ADN de doble cadena
18	8	0.1114234	Ciclo celular mitótico
39	6	0.1018336	Procesamiento rARN

La Figura 30 es una representación gráfica de los genes de *B. cinerea* en cuya anotación se incluye alguno de los tres términos GO destacados en este análisis y aquellos dentro de estas categorías que aparecen en nuestras listas de genes reprimidos en condiciones de exposición a NO (códigos en verde). Es interesante destacar que esta representación permite visualizar fácilmente el hecho de que en estas categorías funcionales se encuentran efectivamente varios genes reprimidos en los niveles a los que se ha llevado el análisis de expresión génica diferencial considerado en este estudio. Pero además es posible identificar en las tres categorías un buen número de genes que también muestran represión en estas condiciones experimentales, aunque no aparecen en el listado porque no se reprimen a los niveles utilizados para seleccionar los genes diferencialmente expresados. Disminuyendo los niveles de selección es posible detectar más genes reprimidos dentro de estas categorías.

Una primera observación de los listados de genes y categorías funcionales enriquecidas generadas sugiere de manera muy evidente que existe una relación entre exposición a NO exógeno en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  y regulación de ciclo celular, ya que todas las categorías funcionales que aparecen en el listado están relacionadas de forma más o menos directa con este conjunto de procesos clave en el ciclo de vida de todos los organismos.

El ciclo celular y su regulación son procesos clave muy conservados en todos los sistemas vivos. Su estudio y caracterización ha centrado muy numerosos trabajos tanto en organismos unicelulares como pluricelulares y la disección de los mismos ha permitido conocer en profundidad muchos aspectos y detalles. La levadura *S. cerevisiae* es el sistema modelo por excelencia de este tipo de estudios. Es un organismo unicelular y mononucleado que presenta un ciclo de vida corto, característica ésta muy importante desde el punto de vista aplicado en el contexto de la investigación en el laboratorio. Además, es posible trabajar con cultivos en los que se sincroniza el ciclo celular en poblaciones de células, lo que facilita enormemente su estudio. Tanto el ciclo celular propiamente dicho como su regulación son procesos que se encuentran muy conservados en los seres vivos por lo que toda la información obtenida a partir de un sistema modelo como *S. cerevisiae* constituye una base realmente útil en el estudio del ciclo celular en el resto de organismos vivos.



**FIGURA 34.** Heat map de todos los genes del genoma anotado de *B. cinerea* que incluyen en su anotación el término GO “Replicación de ADN”, “Ciclo celular” y “Nucleolo”, identificando en color verde el código numérico de aquellos genes diferencialmente expresados en estas condiciones.

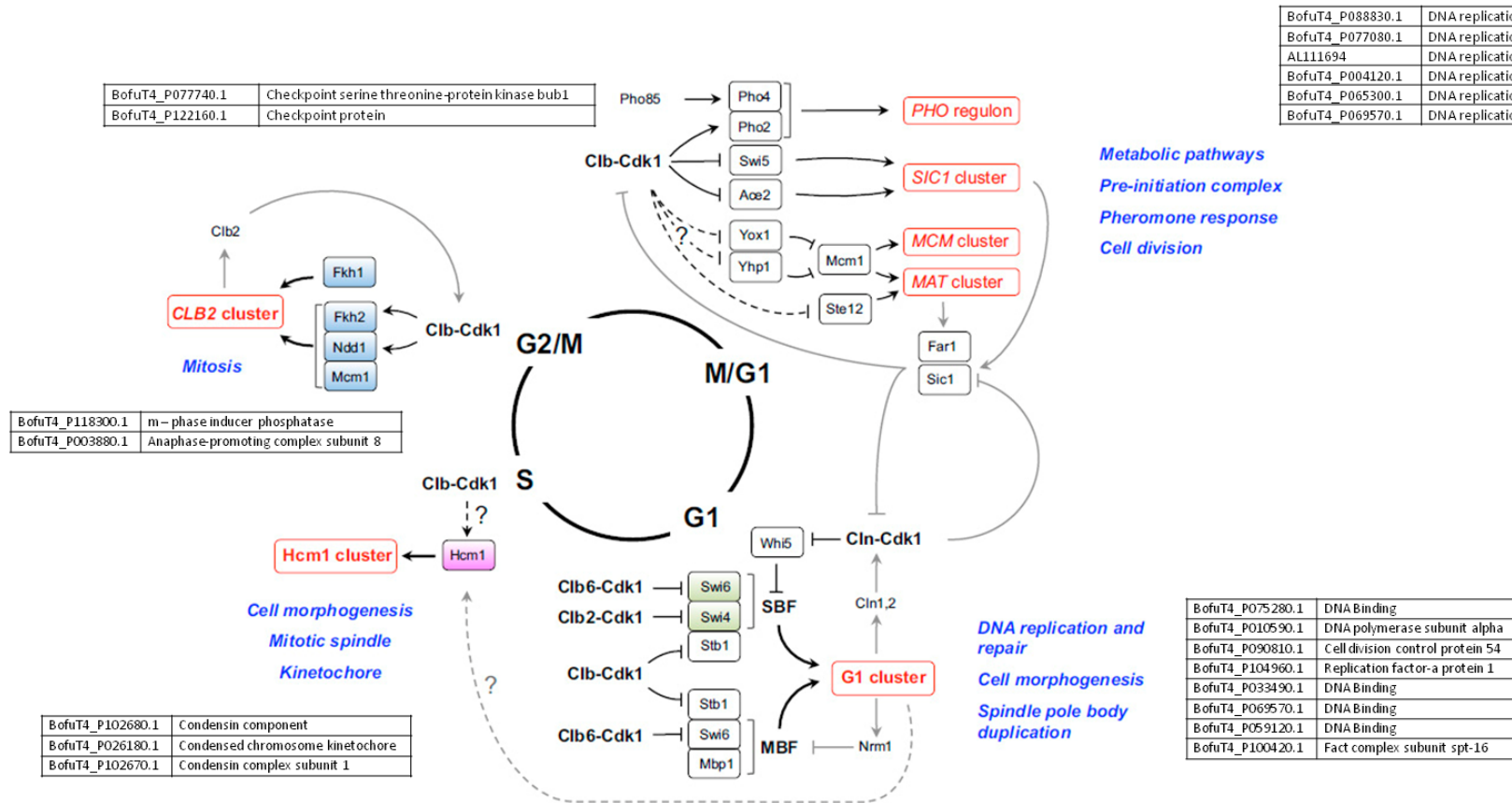
El ciclo celular es un conjunto de procesos en los que participan muy numerosos genes y productos génicos. Dada la trascendencia que tiene su correcta ejecución y el desarrollo ordenado de las distintas fases del mismo, es un proceso altamente regulado. Uno de los principales mecanismos que los sistemas vivos han desarrollado para tratar de asegurar la unidireccionalidad y la irreversibilidad del ciclo implica la regulación de distintos programas transcripcionales durante las distintas fases del ciclo. En general, cada programa

transcripcional determina la síntesis de proteínas que desempeñan funciones importantes y/o esenciales en la fase siguiente del ciclo, lo que promueve el avance del ciclo en una dirección dada. En general, los genes que participan en un proceso dado en una fase del ciclo celular particular están regulados por un mismo factor de transcripción específico de ese grupo de genes.

Como se observa en la Figura 31, que presenta de manera simplificada los programas transcripcionales que operan en las distintas fases del ciclo celular en *S. cerevisiae* (tomada de Enserik *et al.*, 2010) la regulación del mismo es muy compleja y en buena medida depende de la actividad de CDK1 (Ciclin dependent Kinase, siglas en inglés). Esta figura muestra los principales procesos que se ejecutan en cada fase del ciclo celular, indicando los grupos de genes, y los factores específicos que regulan su expresión, que se expresan en cada fase. Es necesario destacar que estos estudios han sido llevados a cabo en experimentos en los que se ha sincronizado el desarrollo de las células en cultivo para determinar que todas ellas se encuentran en cada momento en la misma fase del ciclo con el objeto de poder llevar a cabo un análisis de expresión génica que permita identificar los genes que comparten un mismo patrón de expresión (su expresión se induce o se reprime de la misma manera, en la misma fase).

Estos estudios y estas descripciones en *S. cerevisiae* nos ofrecen un marco de trabajo muy interesante en el contexto de las observaciones que se derivan de nuestra experimentación.

En el análisis de expresión diferencial llevado a cabo para la comparación 5vs6vs7 y cuyos resultados se describen en los párrafos anteriores en esta misma sección, se observa en las situaciones de referencia, cepa tipo silvestre y cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  en condiciones de no exposición a NO, expresión de genes adscritos a, o relacionados con, procesos característicos de cada una de las etapas que componen el ciclo celular (G1, S, G2 y M) que luego son reprimidos en condiciones de exposición a NO. Por ejemplo: Formación del complejo de iniciación en M/G1, replicación de DNA en fase G1, formación del huso mitótico y del kinetocoro en fase S, Mitosis en la transición G2/M entre otras. En la figura 30 presentamos algunos de los genes que identificamos en el listado de genes reprimidos por exposición a NO en el análisis de expresión diferencial y la función y fase del ciclo celular con la que se encuentran relacionados específicamente.

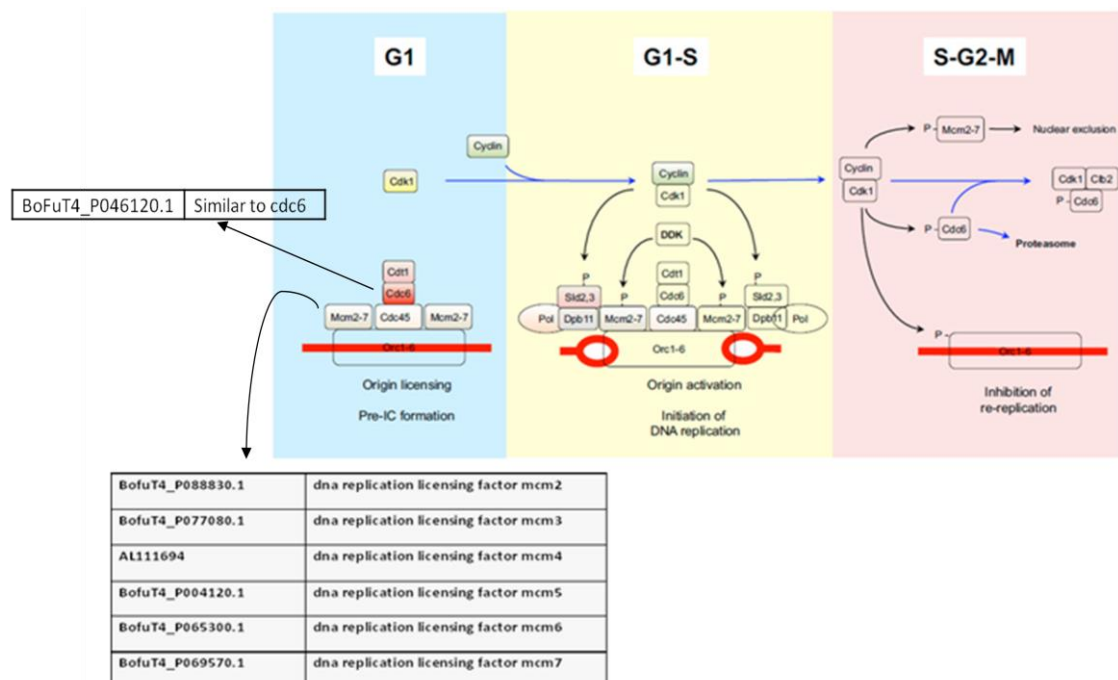


**FIGURA 35.** Regulación de los programas transcripcionales por CDK1 durante el ciclo celular (Modificado de Enserink y Kolodner, 2010). Sobre la figura se señalan los grupos de genes relacionados con procesos adscritos a cada una de las etapas del ciclo celular cuya expresión se reprime en presencia de NO exógeno (5vs6).



El hecho de que en el listado de genes reprimidos por exposición a NO encontremos genes adscritos a procesos relacionados con todas las fases del ciclo celular es probablemente indicativo de que la germinación de las esporas en *B. cinerea*, estructuras multinucleadas, implica divisiones nucleares que se producen de forma no sincrónica.

Derivada del análisis de este listado surge una observación muy notable. Cabe destacar que los genes que muestran niveles de represión más altos son todos los genes que forman parte del cluster MCM de *S. cerevisiae* y que en este organismo se expresan específicamente en la fase transición G1/S. Los productos codificados son las proteínas MCM, proteínas de mantenimiento de mini-cromosomas esenciales para el inicio de la replicación en organismos eucariotas. Estas proteínas forman un complejo hexamérico (Mcm2-Mcm7) altamente conservado con un papel fundamental como helicasa en la iniciación de la síntesis de ADN en los orígenes de replicación (Figura 32).



**FIGURA 36.** Cdk1 y la regulación de la replicación del ADN. En la fase G1, las células se preparan para la replicación del ADN ensamblando complejos de pre-replicación (pre-RCs) en sus orígenes de replicación (origin licensing) para el inicio de la síntesis de ADN. El ORC (complejo de reconocimiento del origen) está encargado de reclutar a las proteínas del complejo MCM (Mcm2-7), la ATPasa Cdc6 y Cdt1 para dar paso a la síntesis de ADN (modificado de Enserink and Kolodner, 2010).

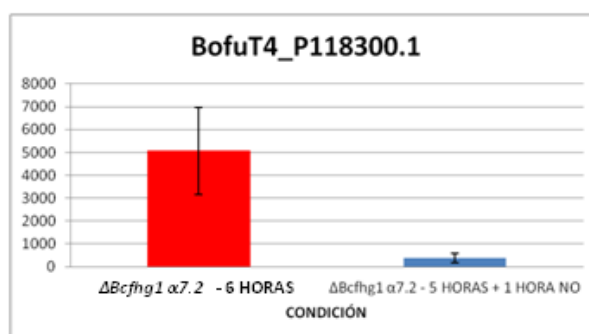
Durante las fases G2 y M (mitosis) los orígenes de replicación del ADN se encuentran asociados a un completo multiproteico denominado ORC (Origin Recognition Complex, por sus siglas en inglés)(Lodis *et al.*, 2004). Durante la fase G1 del ciclo siguiente los factores de iniciación Cdc6 y Ctd1 facilitan la unión de la helicasa MCM al ORC y forman el complejo de pre-replicación o pre-RC. En las fases posteriores de G2 y M, Cdk1 fosforila a estos factores

impidiendo su unión al ORC. La fase S se dispara cuando las Cdk-ciclinas S y la kinasa (DDK) fosforilan componentes del pre-RC. Esto permite el reclutamiento del factor iniciador Cdc45 que activa la helicasa MCM y abre la doble hélice del ADN (burbuja de replicación). Cdk1 mantiene fosforilados los factores de iniciación (como Cdc45) impidiendo su re-asociación al ORC (Lodish *et al.*, 2004). Esto asegura que cada origen de replicación dispare la síntesis de ADN una sola vez por ciclo.

En el listado de genes reprimidos por exposición a NO encontramos también varios genes relacionados con replicación y reparación de ADN como BofuT4\_P010590.1, que codifica para la subunidad alpha de la ADN polimerasa, BofuT4\_P104960.1, que codifica para la proteína 1 del factor de replicación a, y BoFuT4\_P090810.1 que codifica para la proteína 54 de control de la división celular. En *S. cerevisiae* algunos de estos genes forman parte de lo que se denomina “G1 Cluster” y su expresión depende de la actividad de dos factores transcripcionales: MBF (Mlu1-box binding factor) y SBF (Figura 31).

En la lista encontramos también genes que codifican productos relacionados con la formación del huso acromático y del kinetocoro, específicos de fase S en *S. cerevisiae*, como BofuT4\_P032680.1, que codifica una proteína del kinetocoro, ndc80, y el gen BofuT4\_P069680.1, que codifica para la subunidad 1 del complejo de la condensina, proteínas que tienen un papel central en el ensamblado y segregación de los cromosomas en las células eucariotas.

Otros genes encontrados son los relacionados con la fase de mitosis propiamente dicha, entre los que podemos mencionar BofuT4\_P118800.1 y BofuT4\_P003880.1, que codifican para unidades del complejo promotor de la anafase, cut9 en el primer caso y 8 en el segundo, cuya función está relacionada con la separación de las cromátidas para que puedan migrar hacia las células hijas, proceso que ocurre en la Telofase. Otro grupo también encontrado en el listado son los que codifican para proteínas de checkpoint, como el gen BofuT4\_P077740.1, que codifica una kinasa de serina y treonina bub1, y BofuT4\_P122160.1. También encontramos un gen muy interesante descrito como “M-phase inducer phosphatase” que muestra un nivel de represión importante (tabla 9) (Figura 33). Es el gen BoFuT4\_P118300.1, que en el sistema GRS (Genome Report System) del INRA está anotado como “similar a la proteína Cdc25” que es una fosfatasa inductora de la fase M (M-phase inducer phosphatase).



**FIGURA 37.** Representación del cambio en los niveles de expresión del gen BofuT4\_P118300.1

Este gen es el ortólogo de Cdc25 en *S. pombe* y Mih1 en *S. cerevisiae* y es el encargado de defosforilar y activar a Cdk1 (Cdc2 en *S. pombe* y cdc28 en *S. cerevisiae*). Esta kinasa dependiente de ciclina controla que la célula pueda pasar de la fase G2 a la fase M. Dado el papel clave que tiene en el ciclo celular, su hallazgo en nuestra lista de genes de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  cuya expresión se ve reprimida por exposición a NO es muy interesante y es por ello que llevamos a cabo un estudio de esta proteína cuyos resultados se describen en las secciones siguientes.

En el listado de genes reprimidos por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  también se encuentran algunos genes pertenecientes a la categoría GO denominada “Nucleolo” de la cual podemos nombrar a BofuT4\_P011760.1, que codifica para una proteína con un dominio Sda1 requerida para la exportación de subunidades pre-ribosomales tipo 60S al citoplasma, BofuT4\_P007900.1, que codifica para un factor de expansión tipo def (Digestive organ expansion factor), implicado en la ruta p53 encargada del control de la expansión del crecimiento de órganos digestivos, y BofuT4\_P070420.1, que codifica para una proteína ytm1, que forma parte de partículas pre-ribosomales 66S, asociada a microtúbulos.

Además, también podemos encontrar otros genes interesantes que codifican para proteínas como transportadores de proteínas tipo MFS (BofuT4\_P104370.1 y BofuT4\_P068110.1), factores de transcripción tipo C2H2 y C6 (BofuT4\_P128820.1 y BofuT4\_P011410.1, respectivamente), y citocromos p450 (BC1G\_07667.1, BofuT4\_P105710.1, BofuT4\_P104410.1, BofuT4\_P104310.1). Cabe mencionar que se encuentran 76 genes que codifican para proteínas hipotéticas.

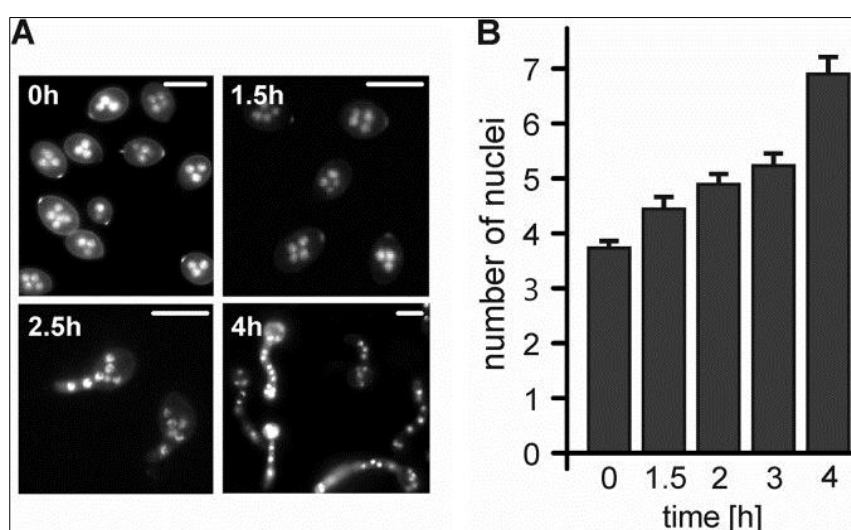
En resumen, teniendo en cuenta la información generada en nuestro análisis de expresión génica diferencial en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en respuesta a condiciones de exposición a NO la conclusión más significativa e informativa es que se reprimen genes codificadores de productos génicos que participan en las distintas fases del ciclo celular y genes relacionados con la actividad del nucleolo. En conjunto es posible concluir que parece producirse una parada de todos los procesos relacionados con ciclo celular y división celular. Si consideramos la situación observada tratando de tomar cierta distancia y desde una perspectiva global cabe hacer una consideración general. El hecho de que los genes del cluster MCM sean los que presenten un nivel de represión muy alto, permite proponer que los ORC no podrían reclutar al complejo MCM sobre los orígenes de replicación que, por lo tanto, no van a configurar orígenes de replicación funcionales en los que tenga lugar la síntesis y replicación de ADN.

Esta consideración surge analizando los cambios de expresión que se producen cuando un sistema en el que se ha disparado la germinación, y en el que se están expresando los genes que codifican los productos génicos que participan en la misma, es expuesto a NO. Esta exposición determina la represión de un buen número de genes relacionados con ciclo celular. Surge ahora una pregunta fundamental. Esta situación ...¿puede explicar el bloqueo en la germinación que se observa cuando la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  es cultivada en presencia de NO desde el inicio de la incubación, como hemos observado al estudiar el efecto del NO sobre la germinación en la cepa tipo silvestre y en esta cepa mutante?.

i. Determinación del número de núcleos de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$

Para tratar de responder a esta pregunta nos planteamos llevar a cabo un seguimiento del comportamiento de los núcleos en las esporas y en los tubos germinativos en las primeras horas del proceso de germinación tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  expuestas y no expuestas al tratamiento con NO.

Hemos indicado en el apartado anterior que las esporas de *B. cinerea* son multinucleadas. En el trabajo realizado por Leroch *et al.* (2013) se ha determinado que las esporas de este hongo poseen una media de entre 3 - 4 núcleos por espora y se ha comprobado que transcurridas cuatro horas de incubación en cultivo estático la mayor parte de las esporas han germinado y que en éstas el número medio de núcleos por espora se ha duplicado (Figura 34). Tomando como referencia esta descripción se llevaron a cabo observaciones al microscopio de fluorescencia de esporas a lo largo de las primeras horas del proceso de germinación de la cepa silvestre y de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en presencia y en ausencia de NO. Las células recogidas a los distintos tiempos fueron tratadas con el agente de tinción de núcleos DAPI siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 21 de Materiales y Métodos y analizadas al microscopio de fluorescencia.

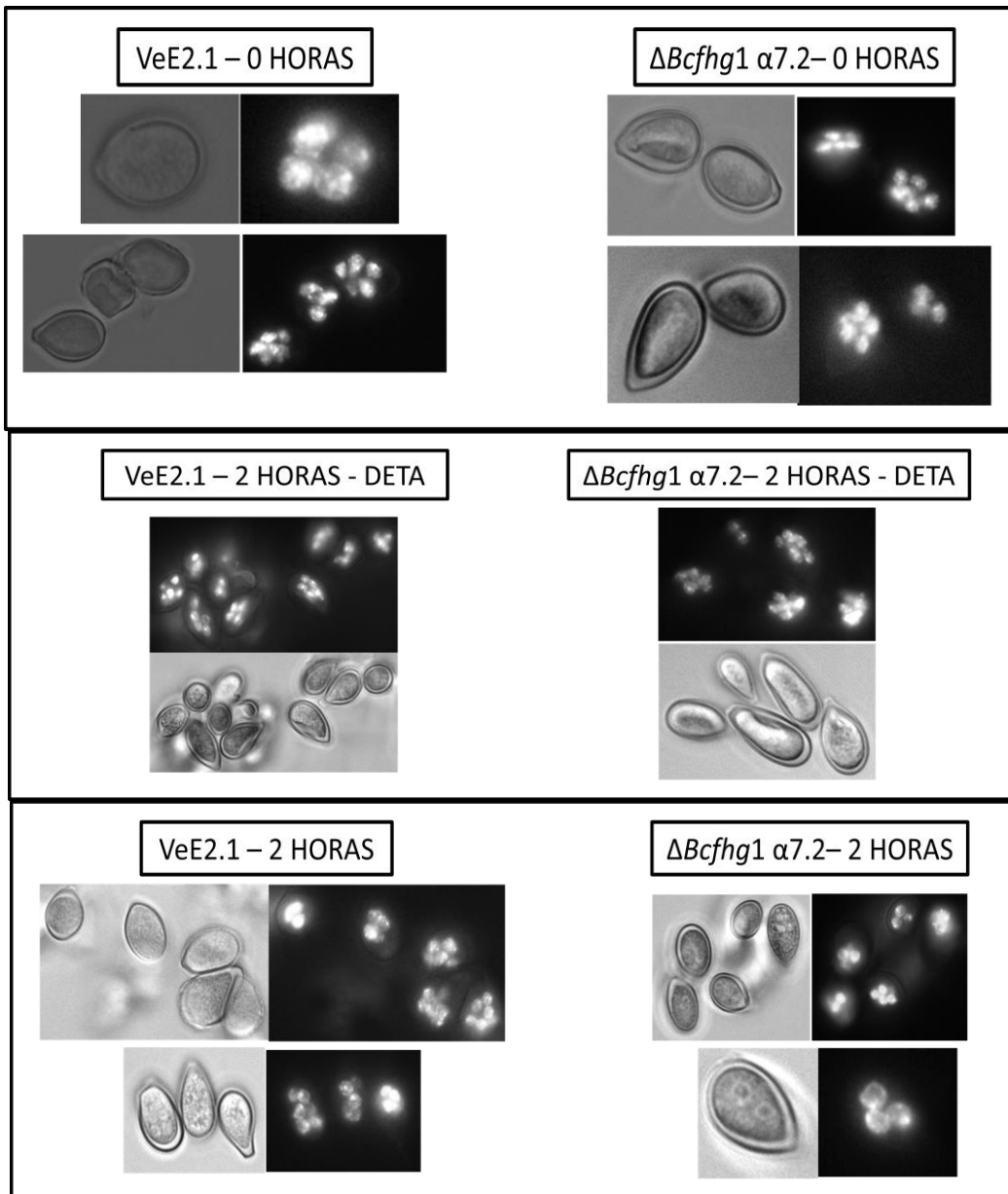


**FIGURA 38.** División nuclear de las esporas de *B. cinerea* durante la germinación. (A) Tinción de las esporas en proceso de germinación con el agente colorante Hoescht 33342. Se puede observar que conforme va avanzando el proceso de germinación, el promedio de núcleos por espora aumenta. (B) Histogramas del número promedio de núcleos en esporas incubadas sobre ceras de manzana en medio mínimo con fructosa 10 mM (Tomado de Leroch *et al.*, 2006).

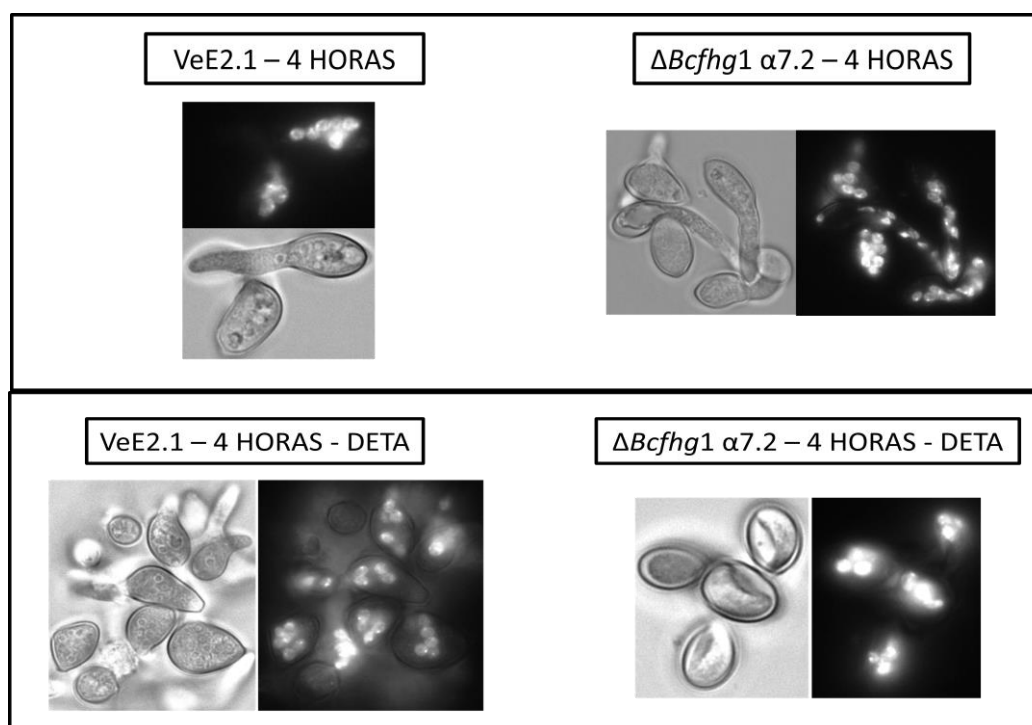
Los resultados sobre la cinética de la germinación en nuestras condiciones experimentales se presentan en la Figura 35. Se comprueba que son esencialmente los mismos que los observados por los autores antes mencionados. La cepa silvestre VeE2.1 y la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en ausencia de NO muestran el mismo comportamiento. A las 4 horas de cultivo prácticamente el 100% de las esporas de ambas cepas han germinado en esta serie de experimentos, los tubos germinativos se encuentran en crecimiento activo y el número de núcleos por espора al menos ha duplicado su número. Sin embargo, en el mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  la exposición a NO determina un bloqueo total en la germinación. No se identifica ninguna espора en germinación y el recuento del número de núcleos en cada espора parece no variar en relación con el número que se cuenta en las esporas recogidas a las 0 horas de incubación. Es posible concluir que en condiciones de exposición a NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  no hay división nuclear en absoluto.

Es interesante destacar que en la cepa silvestre a las 4 horas de incubación en presencia de NO se observa que sólo una fracción del total de esporas han germinado, resultado coherente con las observaciones realizadas en fases previas de este trabajo (ver sección 2.b.ii), y que los tubos germinativos de las esporas que han germinado alcanzan una longitud menor que en la muestra derivada de esporas no tratadas con NO. Las observaciones de las muestras teñidas con DAPI indican que en las esporas que germinan, aunque el tubo germinativo sea de menor longitud, sí hay división nuclear puesto que el número de núcleos, aunque resulta difícil de estimar con precisión, sí aumenta y sí se observa movilización de núcleos al tubo germinativo. Es decir, estas observaciones son coherentes con un retraso en germinación y una menor tasa de división nuclear.

Teniendo en cuenta estas observaciones y la información derivada del análisis de expresión diferencial, es posible concluir que la exposición a NO probablemente tenga consecuencias en todos los procesos que se llevan a cabo en las distintas fases del ciclo celular, entre ellos en particular el ensamblaje de los complejos necesarios para que la síntesis de ADN pueda efectuarse en la fase S. Este efecto es muy notable en el análisis de enriquecimiento funcional y ciertamente puede condicionar y determinar el fenotipo observado. A pesar de que tratamos con un sistema multinucleado en donde es difícil saber a ciencia cierta si la división nuclear ocurre de manera sincrónica o no, la inhibición de la replicación de ADN (porque los ORC no se forman al no poder reclutar al complejo MCM y por lo tanto no se puede iniciar la síntesis de ADN al no activarse la actividad helicasa del complejo MCM) produciría la parada del ciclo en todos los núcleos en la fase G1 o G1/S).



**FIGURA 39.** Tinción con DAPI de esporas de la cepa silvestre VeE2.1 y de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . El conteo de núcleos se llevó a cabo en cultivo estático con 15 ml de medio  $\frac{1}{2}$ PDB de esporas en reposo (0 horas), 2 y 4 horas de incubación a 22°C. El tratamiento de exposición a NO se realizó en una concentración final de DETA 250  $\mu$ M.



**FIGURA 40.** Tinción con DAPI de esporas de la cepa silvestre VeE2.1 y de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . El conteo de núcleos se llevó a cabo en cultivo estático con 15 ml de medio  $\frac{1}{2}$ PDB de esporas en reposo (0 horas), 2 y 4 horas de incubación a 22°C. El tratamiento de exposición a NO se realizó en una concentración final de DETA 250  $\mu$ M.

## ii. Estudio de la proteína Cdc25 en el mutante $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$

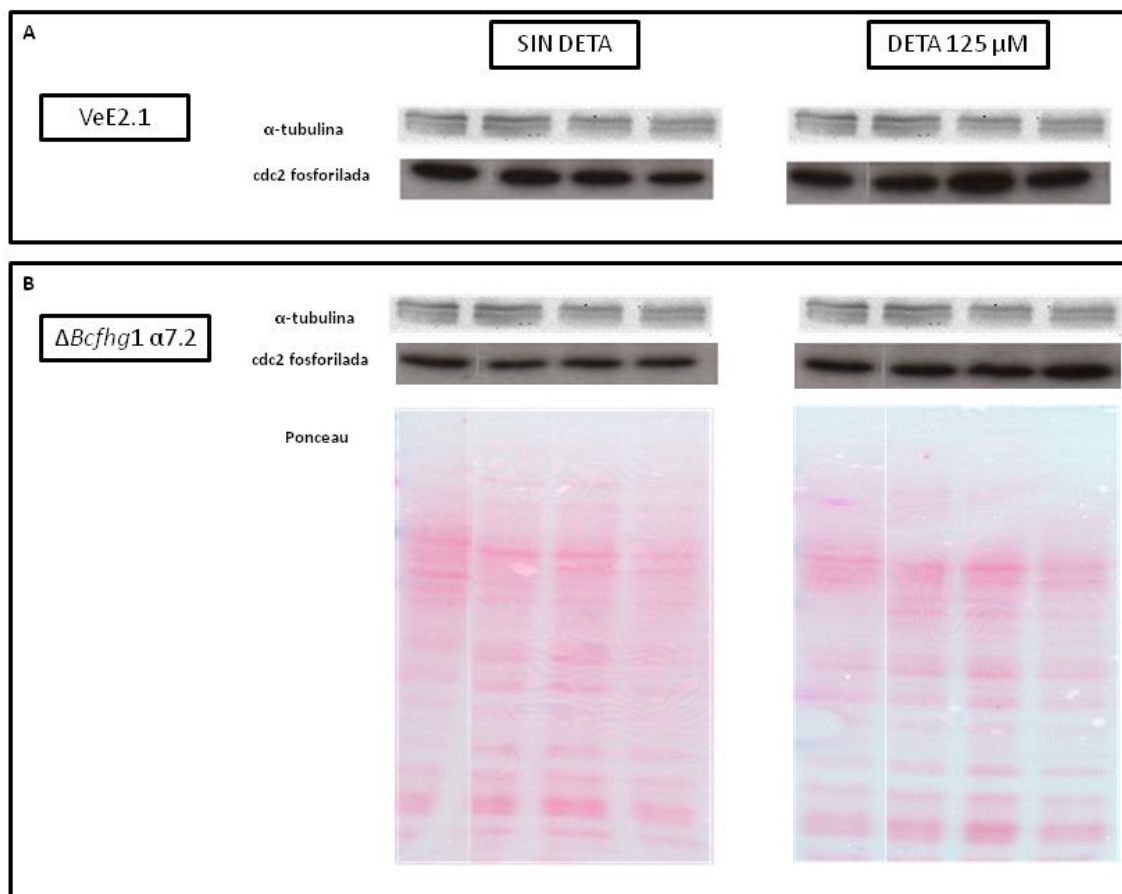
Hemos mencionado anteriormente que entre los genes reprimidos en mayor medida en condiciones de exposición a NO en la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  se encuentra el gen ortólogo de Cdc25. En *S. cerevisiae* este gen codifica una fosfatasa con un papel clave en el control de ciclo celular, ya que es la enzima responsable de la defosforilación de Y19 (tirosina en la posición 19), y la consecuente activación, de Cdk1 (Cdc2 en *S. pombe* y Cdc28 en *S. cerevisiae*) la cual, en su forma activa, promueve la entrada en mitosis (Russell *et al.*, 1989). Swe1 (Wee1 en *S. cerevisiae*) es una kinasa que fosforila Cdk1 en el residuo Y19, determinando su inactivación. La actividad de Cdk1 resulta, por lo tanto, de su nivel de fosforilación en Y19 como resultado del balance de la actividad kinasa de Swe1 y de la actividad fosfatasa de Cdc25. Además de controlar la entrada en mitosis, Cdk1 ha demostrado ser esencial en numerosos procesos del ciclo celular, identificándose durante la década pasada alrededor de 75 objetivos de Cdk1 que controlan eventos críticos dentro del mismo (Enserink *et al.*, 2010). Cdk1 interactúa con 9 diferentes ciclinas a lo largo del ciclo y aunque ésta ha probado ser necesaria y suficiente para dirigir el ciclo celular en *S. cerevisiae*, para un correcto funcionamiento del mismo se requiere de la expresión ordenada de las ciclinas (Bloom and Cross, 2007), lo que sugiere que los diferentes complejos de ciclinas-Cdk1 son importantes para la fosforilación de las proteínas correctas en el momento correcto.

Puesto que los niveles de cdc25 pueden modular los niveles de cdc2 activa y en consecuencia condicionar el progreso del ciclo celular a distintos niveles, decidimos tratar de evaluar la ocurrencia de variaciones en los niveles de acumulación del sustrato de la enzima fosfatasa cdc25, es decir, cdc2 fosforilada, en respuesta a NO exógeno tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . Aunque no existen anticuerpos específicos contra cdc2 de *B. cinerea*, sí existen anticuerpos contra el motivo Y19 de cdc2 de *S. cerevisiae*. Este motivo está estrictamente conservado en las proteínas cdc2 de todos los sistemas investigados y el anticuerpo comercial preparado contra el motivo descrito en *S. cerevisiae* ha demostrado ser funcional en distintos sistemas. Decidimos comprobar la validez de este anticuerpo en nuestro sistema en colaboración con el Dr. Pedro San Segundo, investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Pudimos comprobar en experimentos preliminares que el anticuerpo anti-cdc2 fosforilada de *S. cerevisiae* reconoce específicamente una única proteína del tamaño esperado en extractos de proteínas de *B. cinerea*, lo que permite considerar su utilización en nuestro sistema.

Se llevó a cabo entonces un experimento de tipo “time course” para evaluar posibles alteraciones en los niveles de cdc2 fosforilada en respuesta a la exposición a NO, en particular en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . Para que el sistema sea informativo necesitamos conocer los niveles de cdc2 fosforilada en una situación de referencia de no exposición a NO. Con este objeto se diseñó un experimento en el que tanto la cepa silvestre como la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  fueron incubadas en las condiciones de cultivo utilizadas en los experimentos de evaluación de germinación y de recuento de núcleos, tanto en ausencia como en presencia de NO. A las 0, 4, 6 y 8 horas se tomaron muestras del cultivo que se utilizaron para preparar los extractos de proteínas sobre los que llevar a cabo la evaluación de los niveles de cdc2 fosforilada. Siguiendo los procedimientos descritos en la sección 9 de Materiales y Métodos se prepararon las membranas correspondientes que fueron probadas con los anticuerpos anti-cdc2 fosforilada y anti  $\alpha$ -tubulina, utilizada en este caso como marcador de expresión constitutiva para comprobar la uniformidad de carga (con este mismo objeto se consideró la utilización de la tinción Ponceau de la membrana que permite realizar una estimación de la cantidad de proteína total cargada en cada carrera del gel).

En la Figura 36 se presentan los resultados obtenidos. La tinción Ponceau y la hibridación con el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina permiten comprobar que los niveles de carga de proteína total en todas las carreras son muy similares, lo que nos permite comparar los niveles de acumulación de cdc2 fosforilada en cada condición. Se comprueba que en la cepa silvestre en ausencia de NO exógeno no se observan variaciones apreciables en los niveles de cdk1 fosforilada en los tiempos correspondientes a la ventana de germinación, 4 a 8 horas de incubación, en relación con los niveles de acumulación en las esporas en estado de reposo (tiempo 0 horas). Se comprueba también que la adición de NO exógeno no determina cambios significativos obvios en relación con el comportamiento descrito en ausencia de NO. Y cuando se lleva a cabo el análisis equivalente en un time course con la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  el comportamiento observado es esencialmente el mismo que muestra la cepa silvestre. Es decir, tanto en ausencia como en presencia de NO no se observan cambios significativos en los niveles de acumulación de cdc2 fosforilada a lo largo del tiempo en la ventana de germinación. Todas estas observaciones indican que no existe un efecto directo del NO en la actividad de Cdc25, ni en la cepa silvestre ni en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ .





**FIGURA 41.** Western de Cdc2 fosforilada detectada en la cepa silvestre VeE2.1 (A) y en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (B). Las muestras de proteínas se tomaron a las 0 horas (1), 4 horas (2), 6 horas (3) y 8 horas (4) de cultivo  $\frac{1}{2}$ PDB en medio estático sin (SIN DETA) y con exposición a NO (DETA 125  $\mu$ M).

### c. Análisis del efecto en NO en esporas en germinación en la cepa silvestre (3vs4)

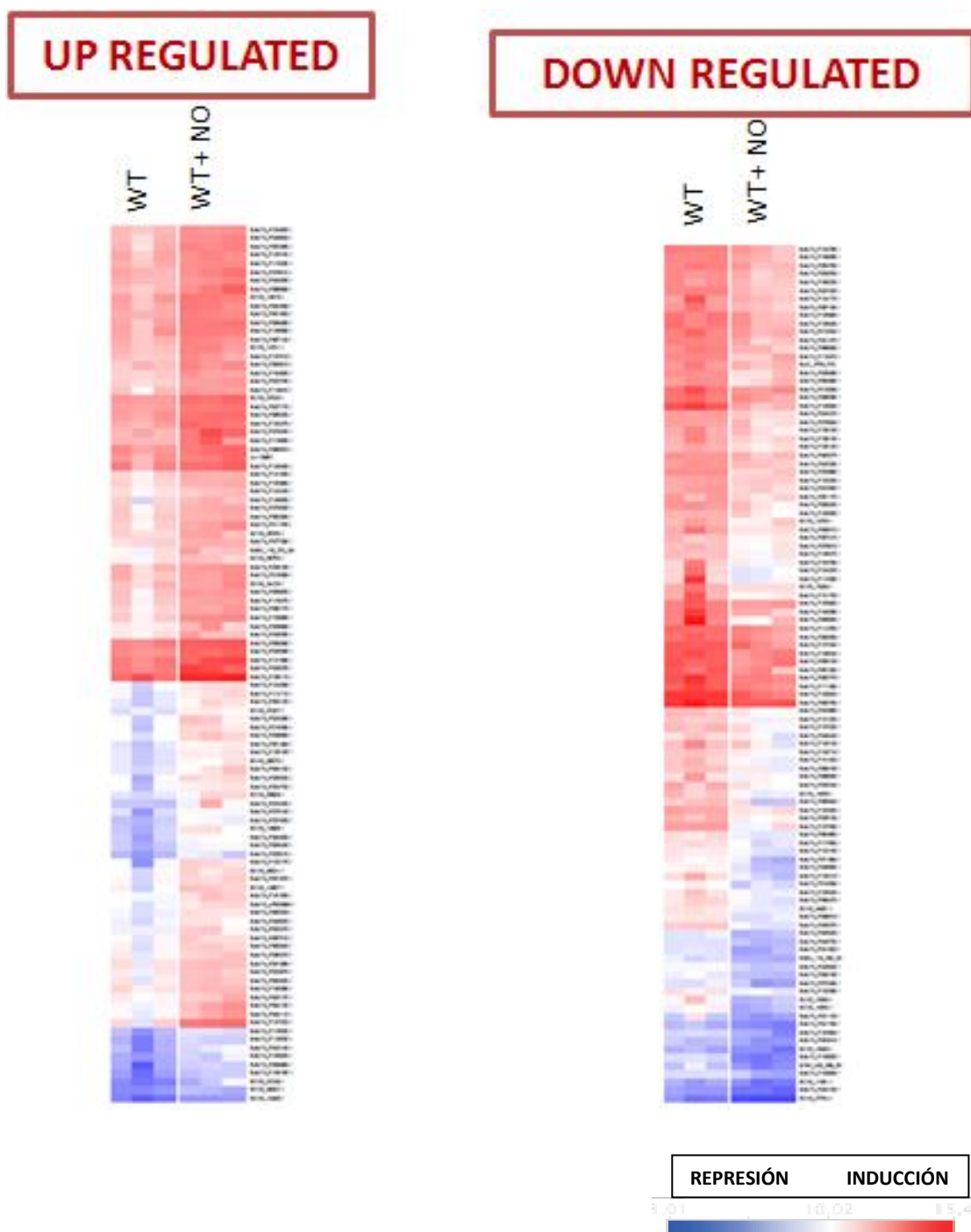
El objetivo de comparar esporas en germinación de la cepa silvestre no expuestas y expuestas al donador de NO es determinar cuáles son los efectos a nivel de expresión génica que se producen como consecuencia de la exposición a NO en los tiempos correspondientes a la ventana de germinación para tratar de obtener información sobre la naturaleza de los procesos fisiológicos que se ven alterados o modulados.

Al igual que en el caso de la comparación 5vs6vs7 descrita en las secciones anteriores, se utilizó como material de partida para la comparación las tablas de datos normalizados facilitadas por la empresa Nimblegen correspondientes a tres réplicas biológicas de cada condición. Previo al análisis de expresión diferencial propiamente dicho, se realizó un análisis de la reproducibilidad de las 3 réplicas biológicas de cada condición, 3 y 4, tomados 2 a 2, tal y como se hizo en el caso de las réplicas biológicas de las condiciones 5, 6 y 7. Los resultados

obtenidos en cada serie de réplicas (tomadas de dos en dos) indicaron también valores de correlación muy altos en todas las combinaciones, próximos a 1, lo que nos indica que los datos con los que se trabaja en estas dos condiciones también son fiables.

Se llevó a cabo un análisis de expresión génica diferencial utilizando el paquete bioinformático Limma y haciendo uso de las mismas condiciones de selección que se manejaron en el análisis de la comparativa 5vs6vs7 (nivel de inducción o represión de 8 y p-value <0,01). En estas condiciones, no se obtuvo ningún gen diferencialmente expresado, resultado que, teniendo en cuenta el número muy elevado de genes diferencialmente expresados en la comparativa en la que se ha trabajado con la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , indica que la enzima BCFHG1 ejerce realmente un papel protector frente a condiciones de estrés nitrosativo muy notable, al menos a nivel de expresión génica.

Se aplicaron entonces condiciones de selección más laxas, imponiendo como límite de inducción o represión un factor de 2 (es decir, un aumento al doble o reducción a la mitad) y un p-value <0,1 (BH-correctado). Con estos criterios de selección se generó una lista de genes regulados por NO integrada por 207 genes. A continuación, y para facilitar el análisis de la situación (como en el caso de la comparativa 5vs6vs7), se repitió el análisis buscando en primer lugar sólo genes cuya expresión se induce en respuesta a NO (comparativa 4 vs 3), generando una primera lista integrada por 104 genes, y en segundo lugar sólo genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO (comparativa 3 vs 4), generando una segunda lista integrada por 103 genes. En la Figura 37 se presentan ambas listas de genes representados en un heat map. Las listas completas con los valores de inducción o represión y los términos GO identificados para cada uno de los genes se incluyen en la sección de Anexos (Anexo 4 y Anexo 5).



**FIGURA 42.** Heatmap de los genes cuya expresión aumenta (up regulated) o disminuye (down regulated) en respuesta a la exposición a NO en la comparación 3vs4.

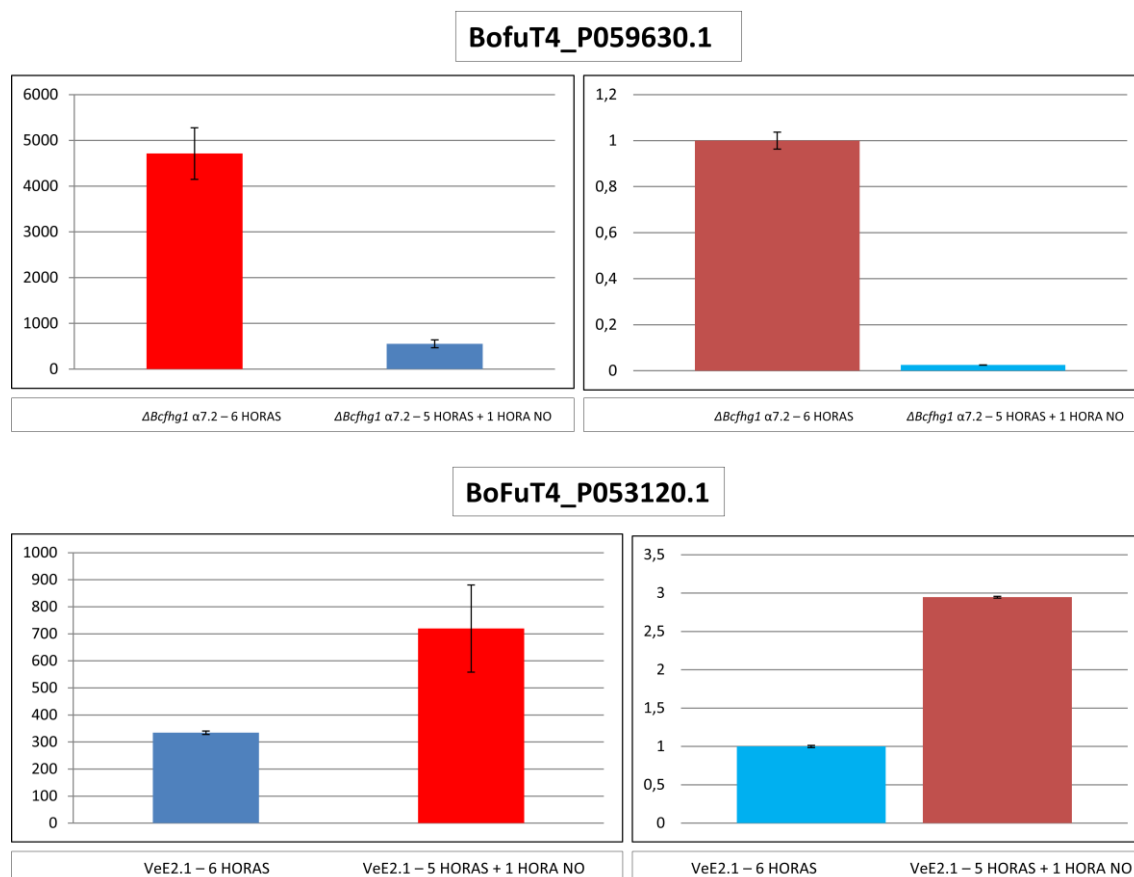
De igual manera que en la comparación 5vs6vs7, una vez obtenidas las listas de genes de cada comparación realizada, se procedió a seleccionar un grupo de genes, en este caso un grupo reducido, para la validación mediante qPCR de los valores de inducción o represión, según fuera el caso, que pudieran manifestar y cuantificados inicialmente mediante el análisis de hibridación de microarrays.

En esta ocasión los genes escogidos fueron sólo dos (en la comparación 5vs6vs7 hemos visto que en todos los casos considerados el análisis qPCR confirma la validez del análisis de microarray). Los genes seleccionados son los indicados en la tabla 12. Como veremos más adelante, estos genes han sido seleccionados para llevar a cabo la validación de los valores de inducción o represión porque son los genes que han sido seleccionados para llevar a cabo un análisis funcional de los mismos.

**Tabla 12.** Genes escogidos para su validación mediante PCR Cuantitativa que pertenecen a la comparación 3vs4.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN (PUTATIVA)	CATEGORÍA GO	Log2
<b>BoFuT4_P059630.1</b>	Hypothetical protein	Mycelium development	3,5
<b>BoFuT4_P053120.1</b>	C6 Zinc Finger Domain	Regulation of transcription	1,6

Para esta validación se utilizó una cuarta muestra de ARN total derivada de una cuarta réplica biológica de cada condición. La Figura 38 muestra en paralelo para cada uno de los dos genes considerados los histogramas con la cuantificación de las señales de hibridación en el análisis de hibridación de microarray y el nivel de expresión relativa determinado mediante PCR cuantitativa.



**FIGURA 43.** Comparación entre los histogramas que representan los cambios en los niveles de expresión de los 2 genes escogidos para su validación por PCR Cuantitativa. Los histogramas de la izquierda representan los datos obtenidos mediante la cuantificación de las señales de hibridación en las hibridaciones llevadas a cabo sobre el microarray y los de la derecha se generaron con los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa. Los 2 genes representados en ambos histogramas pertenecen a las listas de genes diferencialmente expresados que se detectan imponiendo como límite de inducción o represión un factor de 2 y un p-value<0,1 (BH-correctado).

El comportamiento (inducción o represión) de los 2 genes analizados en el análisis de microarray se corresponde con el comportamiento que se deduce de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa. Además, los niveles de inducción o represión cuantificados con ambas herramientas experimentales son muy similares en este caso. Es posible considerar, por lo tanto, que estamos trabajando con datos fiables y que las listas de genes obtenidas en cada comparación corresponde, en efecto, a genes cuya expresión está modulada por NO en la cepa silvestre VeE2.1.

A continuación se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional utilizando el paquete bioinformático MGSA. En esta ocasión no se detectó ninguna categoría funcional enriquecida. Un análisis detallado de las dos tablas de genes generadas y utilizadas para este análisis de enriquecimiento indica que tanto una como otra incluye una fracción muy significativa de genes con anotaciones ciertamente pobres y poco informativas. El hecho de trabajar con listas no muy numerosas (unos cien genes en cada caso) y en las que para una

fracción notable de los genes la información funcional es limitada probablemente condiciona la utilidad de un análisis de enriquecimiento funcional como el que hemos aplicado.

Por esta razón decidimos llevar a cabo un análisis particularizado de cada lista considerando de forma individual aquellos genes en relación con los cuales disponemos de alguna información de tipo funcional. Así, en primer lugar consideramos la fracción de genes que codifican proteínas hipotéticas o desconocidas. En la lista de genes cuya expresión resulta reprimida en condiciones de exposición encontramos 66 en esta categoría, lo que supone el 63,5% del total de genes identificados. Por su parte, en la lista de genes cuya expresión se induce en respuesta a NO encontramos 38 genes en esta categoría, que constituyen el 36,5% del total.

¿Qué información proporciona la consideración de la información de tipo funcional a nuestra disposición sobre los demás genes en una y otra tabla? De este estudio se derivan dos observaciones destacables. En primer lugar, en la lista de genes cuya expresión se reprime en condiciones de exposición a NO identificamos un número importante de genes (12 de 38) que codifican proteínas relacionadas con desarrollo, con división celular y con reparación de ADN. El listado de estos genes y los términos GO asociados a los mismos se presenta en la tabla 13. Curiosamente en este listado el número de genes codificadores de factores de transcripción es muy reducido. Sólo encontramos el gen BofuT4\_P131730.1, que codifica un factor de transcripción de tipo bhlh, factores de transcripción que están relacionados con desarrollo y diferenciación en animales, plantas y hongos. También encontramos dentro de este grupo de 38 genes, genes codificadores de distintos tipos de enzimas como alcohol deshidrogenasas, hidrolasas, oxigenasas, amidotransferasas y permeasas.

**Tabla 13.** Categorías funcionales relevantes derivadas del análisis manual de los genes reprimidos por NO en esporas en germinación en la cepa silvestre de *B. cinerea*.

ID	ANOTACIÓN BLAST O TÉRMINO GO	CATEGORÍA	NIVEL DE REPRESIÓN
<b>BofuT4_P059630.1</b>	Mycelium development	DESARROLLO	3,5
<b>BofuT4_P131730.1</b>	Transcription factor bhlh		2,6
<b>BofuT4_P025990.1</b>	Mycelium development		1,7
<b>BofuT4_P160020.1</b>	Neurogenic locus notch like protein 2		1,2
<b>BofuT4_P114250.1</b>	Brca1 c terminus domain- containing protein	DIVISIÓN CELULAR	1,0
<b>BofuT4_P057410.1</b>	mis12-mtw1 family protein		1,3
<b>BofuT4_P127320.1</b>	Saga complex component		1,5
<b>BofuT4_P156120.1</b>	Nuclear distribution protein		1,4
<b>BofuT4_P066880.1</b>	myb dna-binding domain containing protein		1,5
<b>BofuT4_P088470.1</b>	Kinetochore protein		1,4

<b>BofuT4_P089100.1</b>	kinetochore protein fta4		1,4
<b>BofuT4_P117550.1</b>	double-strand break repair	REPARACIÓN DE ADN	1,3
<b>BofuT4_P124100.1</b>	chromosomal organization and dna repair protein		1,1

Por su parte, en la lista de genes cuya expresión resulta inducida en respuesta a la exposición a NO encontramos 6 genes que codifican factores de transcripción (sobre un total de 55 genes de los cuales tenemos información de tipo funcional representa más de un 10%). Encontramos también varios tipos de genes codificadores de enzimas como NadH oxidasa, aminopeptidasas, oxidorreductasas, deshidrogenasas, hidrolasas, entre otras. Hay un gen muy interesante que codifica para una proteína denominada Orp1. El análisis funcional del gen ortólogo en *M. grisea* ha permitido demostrar que la función de la proteína pueda estar relacionada con patogenicidad, ya que el mutante alterado en este gen muestra incapacidad para infectar a la planta huésped.

La tabla 14 presenta los códigos identificativos de estos genes codificadores de factores de transcripción y una descripción del tipo de factor de transcripción de que se trata en cada caso.

**Tabla 14.** Tipos de factores de transcripción encontrados entre los genes inducidos por NO en esporas en germinación en la cepa silvestre de *B. cinerea*.

ID	ANOTACIÓN BLAST O TÉRMINO GO	NIVEL DE INDUCCIÓN
<b>BofuT4_P053120.1</b>	Zn(II)2 Cys6	1,6
<b>BofuT4_P112110.1</b>	C6 transcription	1,5
<b>BofuT4_P009990.1</b>	Transcription factor Cys6	1,8
<b>BofuT4_P077280.1</b>	C6 zinc finger domain protein	1,0
<b>BofuT4_P104380.1</b>	C6 zinc finger domain protein	1,3
<b>BofuT4_P063840.1</b>	Fungal specific transcription	1,4

i. Elección de genes expresados diferencialmente para la obtención de mutantes por reemplazamiento génico

No ha sido posible derivar información relevante del análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes inducidos y reprimidos por NO en esporas en germinación de la cepa silvestre de *B. cinerea*. No obstante, tanto en la lista de genes inducidos por NO como en la lista de genes reprimidos por NO en esporas en fase de germinación encontramos genes cuyo análisis funcional de forma individualizada nos puede proporcionar información sobre los procesos fisiológicos que pueden estar siendo regulados por NO. Con este objeto hemos revisado las listas generadas y hemos seleccionado genes individuales para iniciar su caracterización.

Entre los genes reprimidos por NO nos llamó la atención el gen BofuT4\_P059630.1. El análisis de los listados de genes con la herramienta informática Blast2GO determina que el gen codifica una proteína hipotética, pero le asigna un término GO, concretamente el término “mycelium development”, término indicativo de que el producto génico guarda alguna relación con procesos de germinación y desarrollo del hongo. Esta observación y esta consideración resulta muy sugestiva en el contexto de nuestro trabajo y dados nuestros intereses, puesto que hemos observado que el NO juega un papel en el proceso de germinación en *B. cinerea*. Teniendo en cuenta que este gen presenta un nivel de represión de 8 veces en respuesta a NO decidimos elegirlo para realizar su análisis funcional. Se le dio la designación *Bcmd1* (*Botrytis cinerea mycelium development 1*).

Entre los genes inducidos por NO tenemos varios que codifican factores de transcripción cuyo estudio funcional es una fuente valiosa de información dado que este tipo de genes son reguladores de la expresión génica, ya sea activando o reprimiendo la transcripción de genes bajo su control. Se ha descrito un papel regulador de la expresión génica para el NO mediado por su efecto sobre factores de transcripción, muy sensibles al estado redox celular que puede ser modulado por efecto del NO. Por esta razón seleccionamos para su análisis funcional un factor de transcripción de aquellos que responden a NO en nuestras condiciones experimentales aumentando su expresión. Este gen es el gen de código BofuT4\_P053120.1, que muestra un nivel de inducción de la expresión de 1,6. Asumimos que aunque los factores de transcripción detectados en nuestro análisis no presenten un nivel de inducción muy alto, tratándose efectivamente de elementos reguladores de la expresión génica que pueden controlar simultáneamente la expresión de grupos de genes más o menos numerosos, con un cambio de magnitud limitada en sus niveles de expresión pueden determinar efectos notables, en este caso en respuesta a NO. Estos efectos pudieran estar relacionados con la regulación de procesos que ocurren en los estadios iniciales de la germinación de *B. cinerea*. A este gen se le dio la designación de *BcNor2* (*Botrytis cinerea Nitric oxide responding gene 2*).



#### 4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES BofuT4\_P053120.1 Y BofuT4\_P059630.1

Para estudiar y caracterizar la función o funciones que las proteínas codificadas por los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1 pudieran desempeñar en la biología de *B. cinerea*, decidimos aplicar una estrategia basada en la obtención y caracterización de mutantes deficientes en cada uno de ellos. Con este objeto se diseñó una estrategia de reemplazamiento para cada gen en la que la copia genómica del alelo tipo silvestre es reemplazada por una copia de un alelo mutante, alelo en la que la región codificante del gen en cuestión ha sido sustituida por una fusión génica que permite la expresión de un marcador de resistencia a un antibiótico (en este caso la higromicina) en *B. cinerea*. Para hacer posible el reemplazamiento génico se preparó para cada gen una construcción en un plásmido en la que la fusión génica de resistencia a higromicina (cassette de resistencia) se clona de tal manera que queda flanqueada por las secuencias que representan las regiones localizadas inmediatamente aguas arriba (en dirección 5' de la región codificante del gen) y aguas abajo (en dirección 3' de la región codificante del gen) y que en ambos casos tienen un tamaño aproximado de 1 kb. Posteriormente estas construcciones se introducen en cada caso en la estirpe silvestre de *B. cinerea* mediante transformación y entre los transformantes obtenidos se trata de identificar aquellos transformantes en los que el alelo silvestre ha sido reemplazado por el alelo mutante como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' del gen. Obtenidos los mutantes, se procede a su caracterización fenotípica en comparación con las cepas control. Generalmente utilizamos como cepas control cepas de *B. cinerea* derivadas cada una de ellas de un protoplasto regenerado que ha sido sometido a los mismos tratamientos (de eliminación de la pared celular y de tratamiento con PEG) a los que han sido sometidos los protoplastos de los que derivan los transformantes generados, exceptuando, obviamente, la adición de ADN transformante.

##### a. Descripción general de los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1

Nos planteamos realizar un análisis funcional de los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1, escogidos por presentar características relevantes descritas en secciones anteriores, en el contexto del efecto del NO en la cepa silvestre de *B. cinerea* durante su proceso de germinación. A continuación presentamos una breve descripción de dichos genes.

La secuencia genómica de BofuT4\_P053120.1 posee 2071 nucleótidos y presenta 4 exones y 3 intrones (Figura 39). La región codificante (ORF) consta de 1608 nucleótidos. Este gen codifica una proteína de 535 aminoácidos y mediante un alineamiento tipo Blast se ha identificado un dominio Zn<sup>2</sup>-Cys<sub>6</sub>. Este tipo de dominios presentan un cluster binuclear de zinc en donde dos átomos de zinc están unidos por seis residuos de cisteína (Figura 40). Varios tipos de factores de transcripción presentan esta conformación incluyendo la proteína Gal 4 de

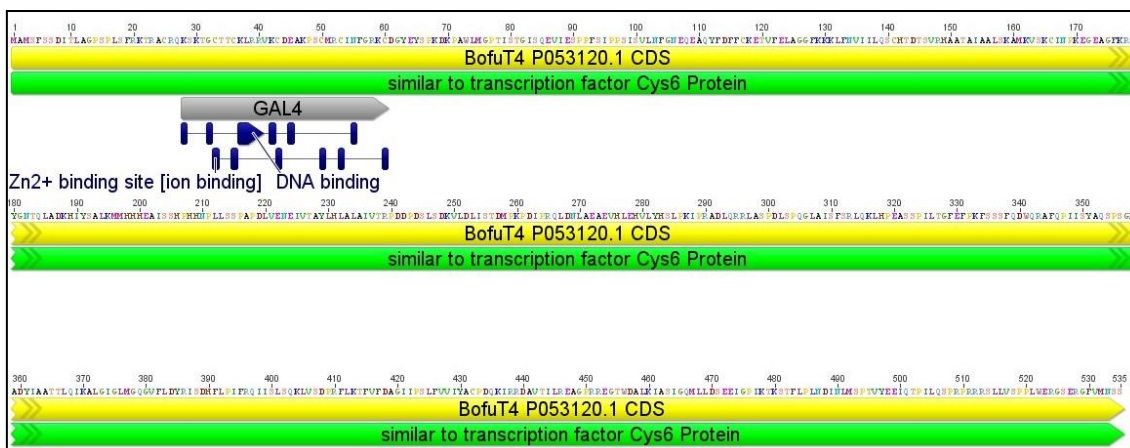
hongos, identificada en la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen cuyo estudio funcional nos planteamos llevar a cabo.

```

ATG GCAATGAGTTTCTCTTCAGATATCACGTTAGCAGGGCCATCTCCACTGTCTTTTAGGAAGA
CACGTGCGTGTAGGCAGAAGTCAAAGACAGGGTGTACCACCTGCAA GTGAGTAAAAGTGGTGAC
TGAGATGTTTCGATTGATCCACATGATCGATTGGGTGTTGATAGTATGAAGTTTGTGGTTTCTTT
CATCATACTGAAC TTTCTTATGTTGAAAAGATAACCCGTCGATCACTTACTAATAGTTCGTTCAA
TTGTAG GCTGCGAAGGGTCAAATGTGATGAGGCCAAACCATCGTGCATGCGATGTATAAACTTC
GGGAGGAAATGTGATGGCTACGAGTACAGCCCTAAG GTATATCTCCAATCTATTTTTTGATCAG
GTAATACTAATACCAATCTCAG GATAAGCCGGCCTGGCTGATGGGCCAACTATATCTACTGGC
ATATCTCAAGAAGTCATAGAATCCCCGCCGTTTTTCGATACCACCAGTATCTCCGTGCTGAACT
TTGGTAATGAACAAGAGGGCTCAATATTTTTGATTTCTTCTGTAAAGAGACCGTATTTGAGCTCGC
CGGAGGGTTTAAAAGAACTGTTTAATGTCATCATCCTCCAATCTTGTACATACCGATACGTCT
GTCCGGCATGCTGCCACCGCAATCGCTGCTTTGAGCAAAGCAATGAAAGTCTCGAAATGCATAA
ACCCGAAAGAAGGTGAAGCTGGTTTTCAAAGGATTT GTAAGTCTCAAGGATTACTTGATGATGT
AGTGCTAATCGCCTCATGATATAGCCGATCAGGTAGAAATGCACCGTCGATACGCTCTAAAGCA
GTATGGAAGATCCATTCGGTATCTTCGTAACCTTATTCAAACGAGTCAAATTTCTCTTCGCATA
CCTTTGCTTGTGTCTCTCATTATATTTTTGCTTTGAGAATTTTCGTAAGCTCCATTCTCTCTTCG
AGTGTCTCTGCTGAAAAATGACTGATTCCAACATCTGATAG ATGGCAACACTCAGTTGGCCGAC
AAGCACATTTACAGTGC ACTTAAGATGATGCACCATCATGAAGCAATTTTCGAGTCATCCTCACC
ACAATCCGTTATTGAGCTCTCCTGCGCCAGATTTAGTAGAAAATGAGATTGTTACCGCGTATCT
CCACCTTGCTCTGGCGATTGTGACACGACCAGATGATCCAGATTCATTGAGCGACAAGGTCCTT
GATCTTATATCAACCGACATGCCCAAACCGGACATTCCTCGACA AACTTGACAATCTTGAGAAG
CCGAAGTTCATTTAGAACATGTGCTATAACATTCTCTCCGAAGATACCAAGGGCAGACCTACA
AAGGCGCTTGGCATCGCCAGATCTTTCTCCTCAAGGTTTGGCAATCAGTTTCTCAAGACTTCAA
AAGCTTCATCCAGAAGCATCATCTCCTATCCTTACAGGGTTCGAGTTTCCAAGTTCAGCTCTA
GCTTTCAAGATTGGCAAAGAGCATTTACGCCAATCATTCTTATGCACAATCTCCTTCGGGCAA
AGCAGATTATATTGCTGCAACCACTCTTCAGATTAAGGCGCTCGGGATAGGACTCATGGGTCAA
GGAGTTTTCTTGATTACCGGATTTCCGATCACTTCCTTCCTATCTTCCGTCAAATAATCTCTC
TCAGTCAAAGCTTGTTTTCCGATCCTCGATTCTTGAAGACATTCGTCTTTGATGCGGGGATTAT
TCCTTCTCTTTTCGTTGTGATATACGCGTGTCTGATCAGAAGATAAGGAGAGATGCGGTCACT
ATCTTGAGGGAAGCAGGCCCTAGACGTGAAGGC ACTTGGGATGCTCTAAAATTGCTAGTATTG
GACAAATGCTGTTAGATTCCGAGGAAATAGGGCCAATTAAGACGAAATCGACCTTTTTGCCATT
GAATGATATAAATTTGATGTCGCCAACAGTATACGAGGAAATTCAAACCCATACTTCAATCT
CCACGGCCAAGACGAAGGTCTCTTCTTGTTCACCACCTCTGTGGGAGCGTGGTTCAGAGCGAG
GTTTTGTTATGAATTCGTCT TAA

```

**FIGURA 44.** Secuencia de nucleótidos del gen BoFuT4\_P053120.1. El codón de inicio (ATG) y el codón de terminación (TAG) se identifican de color verde y rojo, respectivamente. Los 3 intrones del gen están resaltados en gris y los 4 exones que posee este gen se encuentran resaltados en turquesa.

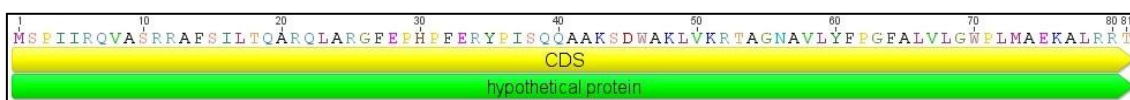


**FIGURA 45.** Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen BoFuT4\_P053120.1 e identificada como un factor de transcripción tipo Zn(II)<sub>2</sub> Cys6. La posición del dominio característico de este tipo de factor de transcripción se señala en la secuencia de aminoácidos.

En cuanto al gen BoFuT4\_P059630.1, el análisis del genoma de la cepa T4 indica que la región estructural del mismo consta de 336 nucleótidos y presenta 2 exones y 1 único intrón (Figura 41). Este gen codifica una proteína de pequeño tamaño, 81 aminoácidos y, mediante alineamiento tipo Blast, no se ha identificado ningún dominio característico conocido (Figura 42).

ATG TCCCAATAATCCGACAAGTCGCCTCACGTCGCGCCTTTTCCATCCTTACACAAGCTCGCC  
 AACTAGCACGTGGCTTCGAACCTCATCCATTCGAACGCTATCCCATTTCTCAACAAGCTGCTAA  
 ATCCGATTGGGCCAAACTAGTTAAGAGGACTGCTGGAAATGCTGTATTGTAAGTGTTCACTTT  
 TTCTCTTTCGAGGTTTTCCTTCAGAACTATTTTCGTACAAGAGTGATGAGATAGAGACTAATATA  
 ATGTTTATAGATATTTCCCCGTTTTGCACTTGTACTTGGATGGCCATTGATGGCCGAGAAGGC  
 CCTGAGGAGAACT TGA

**FIGURA 46.** Secuencia de nucleótidos del gen BoFuT4\_P059630.1. El codón de inicio (ATG) y el codón de terminación (TGA) del gen se identifican de color verde y rojo, respectivamente. La única secuencia intrónica del gen está resaltada en gris y los 2 exones que posee este gen se encuentran resaltados en turquesa.



**FIGURA 47.** Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen BoFuT4\_P059630.1.

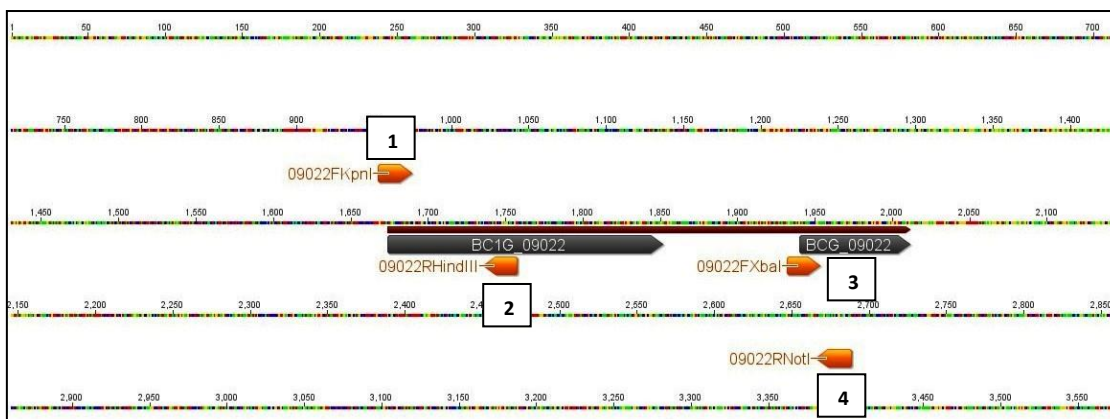
### b. Construcción de los plásmidos de transformación pDS13 y pDS90

Para la construcción de los 2 vectores de transformación en primer lugar se amplificaron mediante PCR las regiones flanqueantes del fragmento a reemplazar de cada gen en particular. Para ello se buscó en la base de datos del URGI (Unité de Recherche Génomique Info), en el apartado de Genome Report System, la secuencia genómica de los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1, descargando además 10.000 nucleótidos de sus secuencias flanqueantes, tanto aguas arriba como aguas abajo, de la región codificante.

Una vez que tuvimos identificadas cada una de las secuencias de nucleótidos, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las secuencias flanqueantes 5' y 3' de cada gen. Cada pareja de oligonucleótidos (especificados en la tabla 4) amplifica aproximadamente 1000 pares de bases de cada flanco y su disposición en torno a la región codificadora (ORF) de cada gen se encuentra detallada en las Figuras 43 y 44.

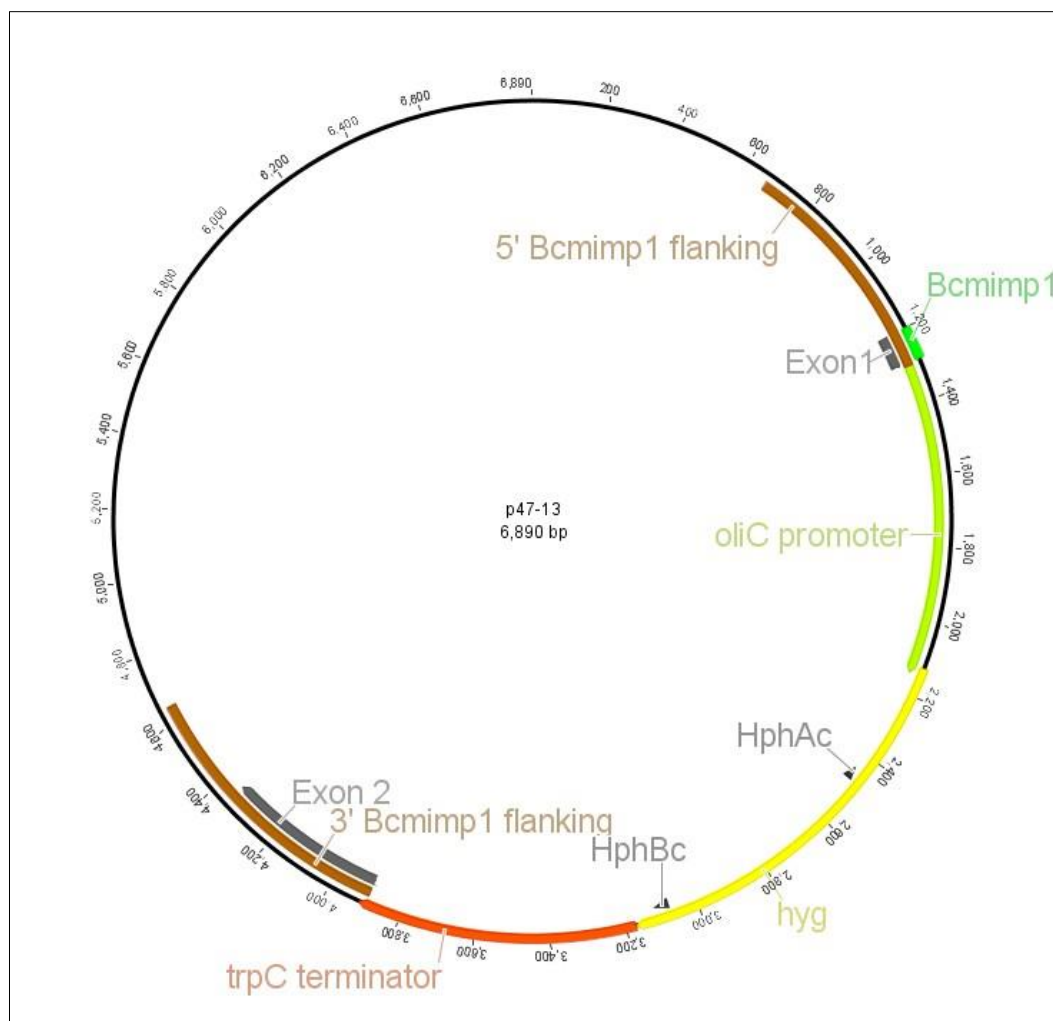


**FIGURA 48.** Secuencia genómica del gen BofuT4\_P053120.1. Se destaca la región codificante (ORF) con los oligonucleótidos para amplificar el flanco 5' (1 y 2) y 3' (3 y 4) cuyas secuencias se detallan en la tabla 4.



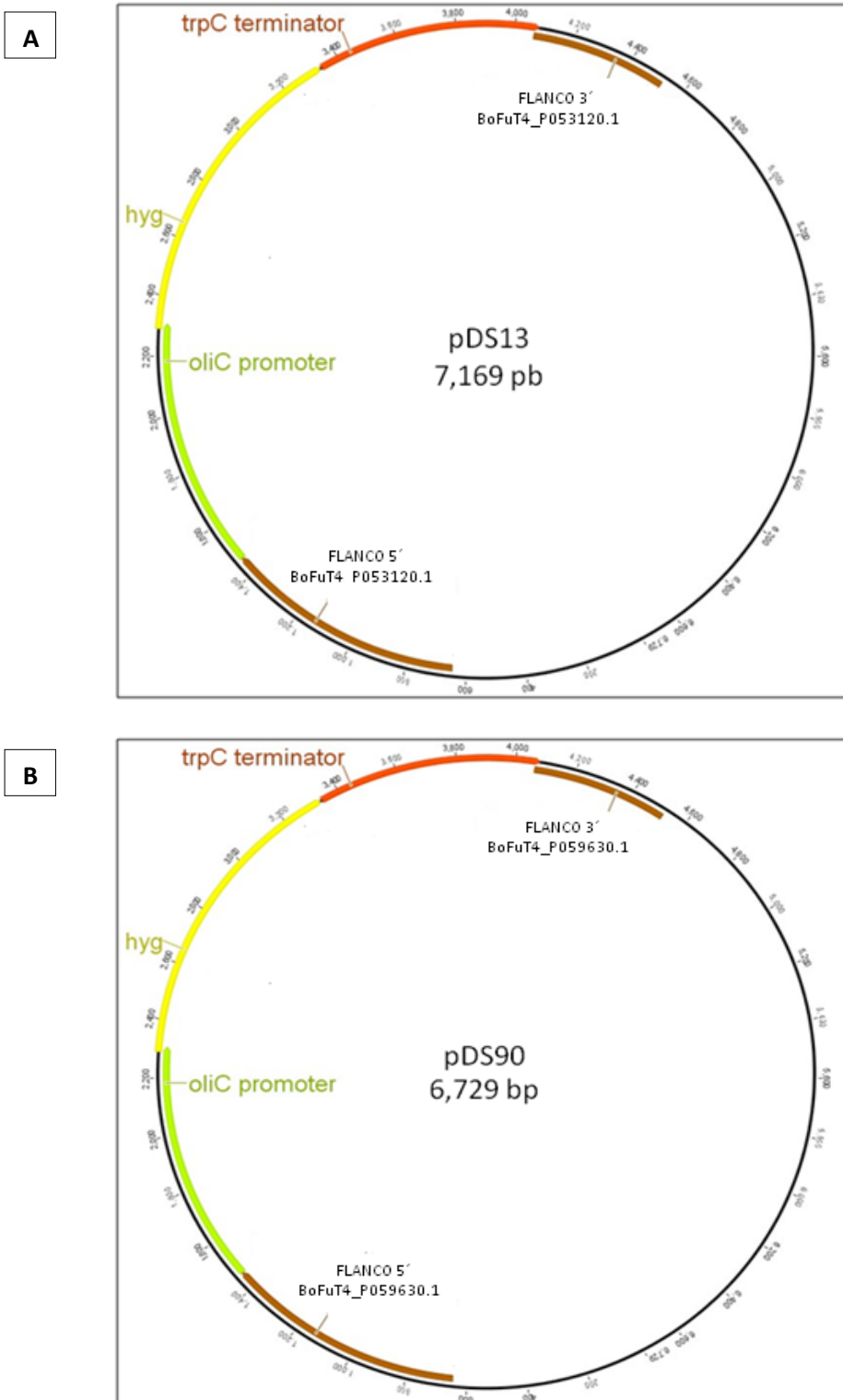
**FIGURA 49.** Secuencia genómica del gen BoFuT4\_P059630.1. Se destaca la región codificante (ORF) con los oligonucleótidos para amplificar el flanco 5' (1 y 2) y 3' (3 y 4) cuyas secuencias se detallan en la tabla 4.

Estos oligonucleótidos tienen la particularidad de poseer un sitio de restricción específico, introducido por nosotros mismos en el curso del diseño de cada amplicón (región flanqueante de cada gen de interés) con el objeto de facilitar posteriormente su clonación en el plásmido p47-13, para así finalmente obtener el plásmido completo con el cual transformar *B. cinerea* en cada caso. El plásmido p47-13 ha sido utilizado como plásmido base en la construcción de los plásmidos de reemplazamiento génico que hemos generado en el curso de este trabajo. Consta de un esqueleto básico derivado del plásmido pBluescriptII SK- (+) que tiene 3 kb de tamaño, en el cual se ha clonado el cassette de la fusión génica que permite la expresión del gen de resistencia a higromicina obtenido a partir del plásmido pOHT (Hilber *et al.*, 1994) flanqueado por dos secuencias de ADN genómico derivadas de las regiones flanqueantes en 5' y 3', respectivamente, del gen *Bcmimp1* (Benito-Pescador, Tesis Doctoral) localizadas inmediatamente aguas arriba y aguas abajo respectivamente, de la región codificante del mismo. Este plásmido se utilizó anteriormente en nuestro laboratorio con el mismo propósito, obtener mutantes por reemplazamiento génico, en este caso del gen *Bcmimp1*. La Figura 45 muestra un mapa de restricción simplificado del mismo. Las enzimas de restricción cuyas dianas se indican en este mapa son aquellas enzimas que se han considerado en nuestra estrategia de clonación basada en sustituir en el plásmido p47-13 primero el flanco 5' del gen *Bcmimp1* por el flanco 5' del gen de interés y a continuación, en el plásmido derivado, sustituir el flanco 3' del gen *Bcmimp1* por el flanco 3' del gen de interés. Con este objeto en los oligonucleótidos diseñados para amplificar las regiones flanqueantes de los dos genes objeto de estudio se incluyeron dianas de restricción para las enzimas de restricción indicadas.



**FIGURA 50.** Esqueleto del plásmido p47-13. El cassette de la fusión génica de la higromicina posee el promotor del *oliC*, la ORF del gen de la higromicina y el terminator *trpC*. Este cassette está flanqueado por las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *Bcmimp1*.

Los fragmentos de PCR de las regiones flanqueantes de cada gen se clonaron en el vector pGEM-T-Easy para asegurarnos que los extremos queden completos y el corte posterior con las enzimas de restricción sea eficiente. Los fragmentos así clonados en pGEM-T-Easy fueron entonces digeridos con las enzimas *HindII* y *KpnI* (flanco 5') y *XbaI* y *NotI* (flanco 3') para luego proceder a su purificación de acuerdo a lo descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos. Con esta estrategia se obtuvieron los 2 vectores de transformación denominados pDS13 y pDS90 descritos en las Figura 46, pertenecientes a los genes BoFuT4\_P053120.1 y BoFuT4\_P059630.1, respectivamente.



**FIGURA 51.** Esqueleto del plásmido pDS13 y pDS90. (A) La fusión génica de la higromicina, en el plásmido pDS13 se encuentra flanqueada por las secuencias flanqueantes 5' (flanco 5' BoFuT4\_P053120.1) y 3' (flanco 3' BoFuT4\_P053120.1) del gen BoFuT4\_P053120.1. (B) La fusión génica de la higromicina, en el plásmido pDS90 se encuentra flanqueada por las secuencias flanqueantes 5' (Flanco 5' BoFuT4\_P059630.1) y 3' (Flanco 3' BoFuT4\_P059630.1) del gen BoFuT4\_P059630.1.



### c. Transformación de *B. cinerea* con los plásmidos pDS13 y pDS90

Se llevaron a cabo en paralelo 4 transformaciones de protoplastos de la cepa silvestre B05.10 de *B. cinerea* con los plásmidos pDS13 y pDS90 y una transformación control sin añadir ADN. Después de 2 días en incubación con higromicina fue posible detectar la aparición de colonias resistentes a higromicina. A lo largo de los días siguientes se fueron rescatando transformantes de las placas de MEA 70 µg/ml higromicina. Algunos transformantes resultaron ser falsos positivos ya que fueron incapaces de desarrollarse en el medio selectivo y se desecharon. Se seleccionaron finalmente alrededor de 100 transformantes de cada transformación para posterior purificación y análisis. Las placas se dejaron incubar hasta que el micelio alcanzó el borde de la placa Petri. Se transfirieron entonces pequeños bloques de agar del borde de la colonia en crecimiento a una nueva placa de medio selectivo. Debido a la naturaleza multinucleada de *B. cinerea* se realizaron réplicas sucesivas (4-6) para enriquecer las hifas con núcleos transformados. Finalmente, se extrajo ADN del micelio aéreo desarrollado en placa para su análisis y selección.

### d. Análisis genéticos de los transformantes de *B. cinerea* B05.10 obtenidos con pDS13 y pDS90 e identificación de mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta BcCmd1$ .

Todos los transformantes purificados fueron analizados tratando de identificar cepas portadoras de núcleos derivados de un proceso de doble recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de los genes BoFuT4\_P053120.1 y BoFuT4\_P059630.1 y que, en la medida de lo posible, no presentaran, además, núcleos portadores del alelo silvestre de los genes en cuestión. Es decir, el objeto es identificar cepas portadoras de la mutación en homocariosis. Serán estas cepas las que consideremos cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta BcCmd1$ , respectivamente, y las que utilizaremos en todos los análisis de caracterización fenotípica posteriores.

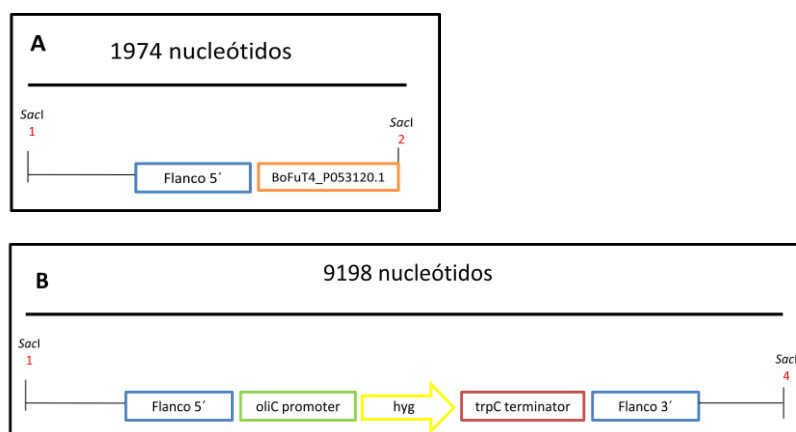
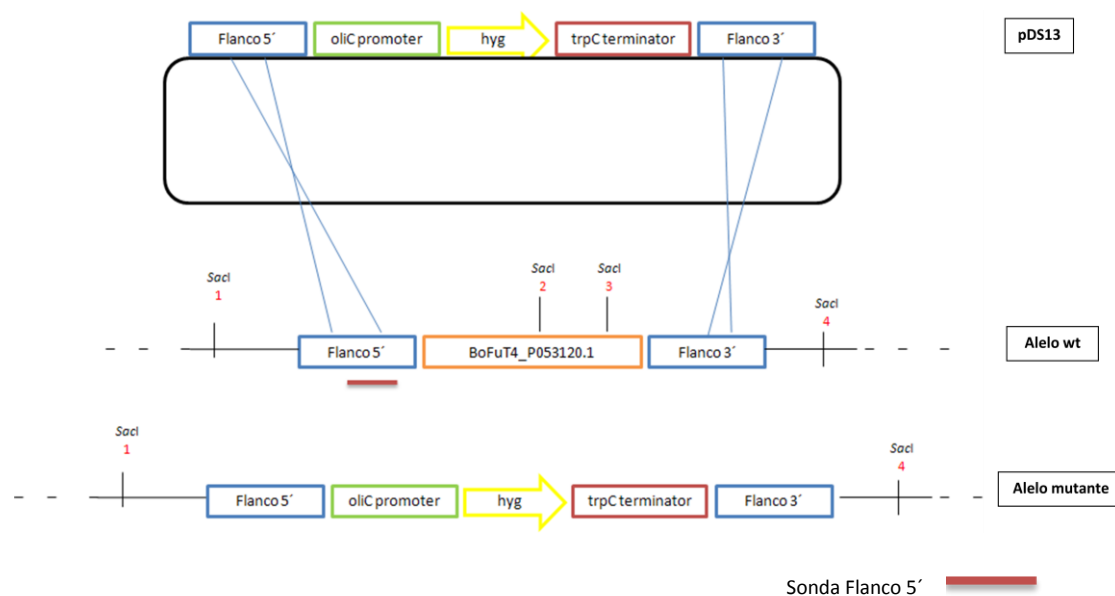
Para ello se extrajo ADN genómico del micelio aéreo recolectado directamente de la placa Petri de cada cepa transformante purificada haciendo uso del método de extracción de ADN rápido, descrito en el apartado 8.a.ii de Materiales y Métodos. A continuación se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN, derivado de la región 5' flanqueante con una combinación de cebadores que permitía su amplificación únicamente si se ha producido un evento de recombinación homólogo en el extremo 5' flanqueante del gen en cuestión. Con aquellas cepas en las que hubo amplificación para el extremo 5', se realizó una segunda reacción de PCR con una combinación de cebadores que permitía determinar si ha existido un evento de recombinación homólogo en el extremo 3'.

Muchos de los transformantes analizados presentaron la integración de la construcción sólo en la región 5' o sólo en la región 3', teniendo en cuenta los resultados del escrutinio mediante PCR llevado a cabo. A partir de los transformantes originales en los que fue posible detectar un doble evento de recombinación homóloga en los extremos flanqueantes, se obtuvieron cultivos monospóricos que fueron seleccionados y replicados



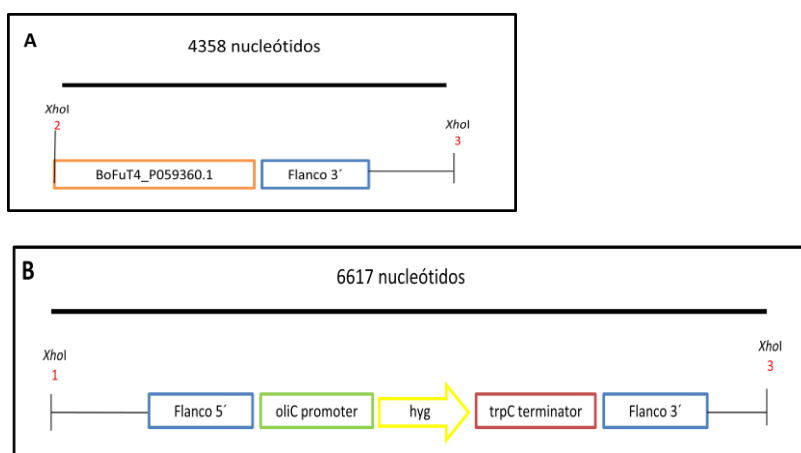
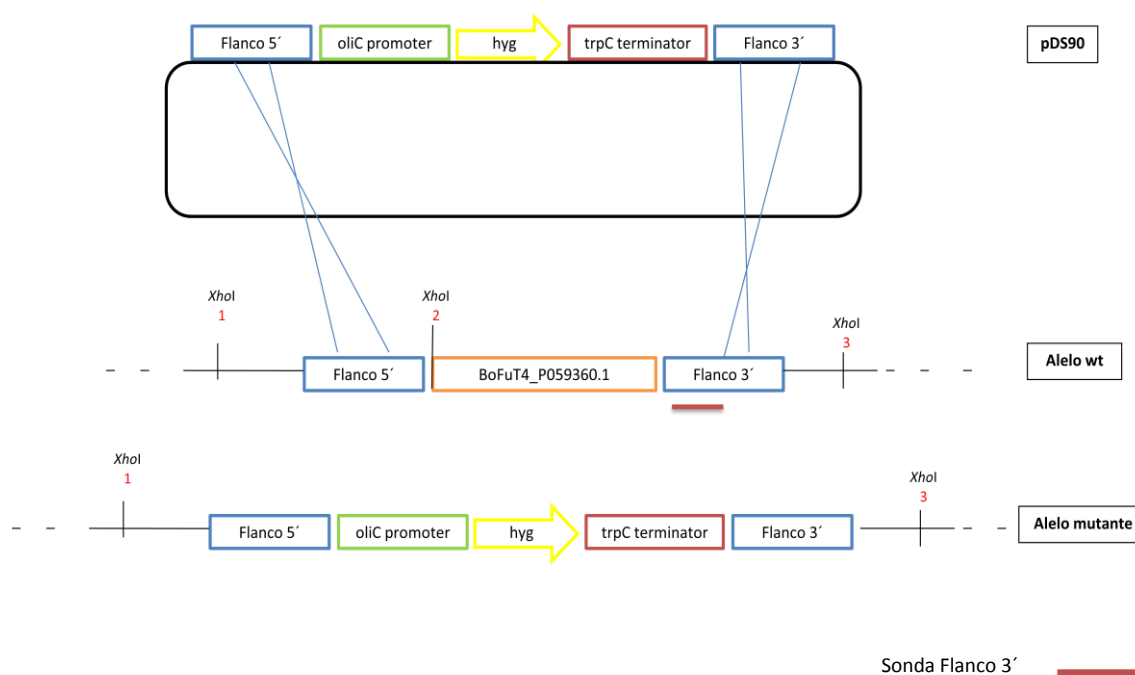
posteriormente en medio selectivo. Ambos procedimientos tenían por objeto garantizar, en la medida de lo posible, la homocariosis de las mutaciones correspondientes en los transformantes candidatos seleccionados. Para comprobar esta situación se extrajo ADN genómico de los mismos con la metodología descrita en el apartado 8.a.i y las muestras de ADN obtenidas se utilizaron en un análisis tipo Southern llevado a cabo utilizando las sondas adecuadas en cada caso.

Las Figuras 47 y 48 presentan de forma esquemática, en cada caso, la estructura del alelo silvestre en la copia genómica, la estructura del alelo mutante del gen objeto de estudio clonado bien en el plásmido pDS13, bien en el plásmido pDS90, y la estructura que debe presentar el alelo que resulta del doble evento de recombinación homóloga en las cepas transformantes, en cada caso. La enzima utilizada en cada caso y los resultados de los Southern de cada gen se presentan en las figuras 47 y 48. En el caso de los transformantes obtenidos con el plásmido pDS13 para tratar de eliminar el gen BoFuT4\_P053120.1, la enzima elegida fue *SacI* y la sonda utilizada para discriminar los transformantes positivos fue la sonda derivada de la región flanqueante 5' (ver Figura 47). En estas condiciones, el alelo silvestre se caracterizará por ser detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 1974 nucleótidos y el alelo mutante en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 9198 nucleótidos.



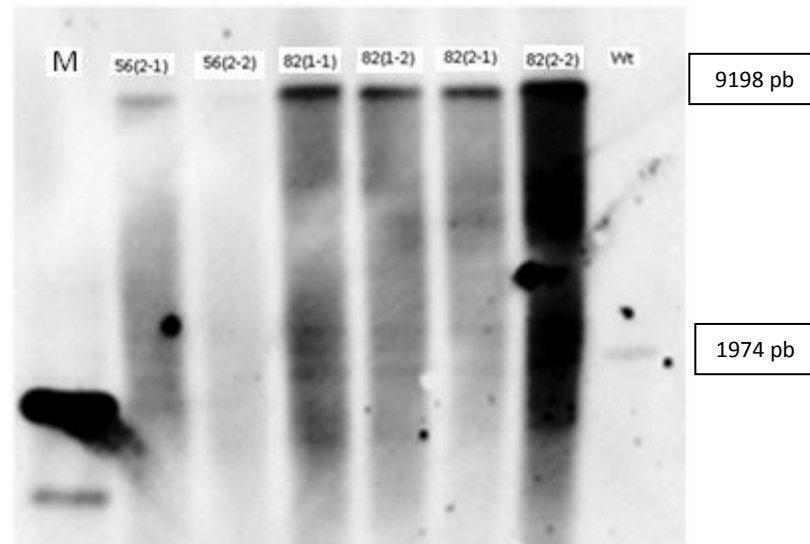
**FIGURA 52.** Estrategia de reemplazamiento génico de *BoFuT4\_P053120.1* mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen y del alelo mutante construido artificialmente y clonado en el plásmido pDS13. El alelo silvestre presenta una banda de 1974 pb nucleótidos (A) y el alelo mutante presenta una banda de 9198 nucleótidos (B).

En el caso de los transformantes obtenidos con el plásmido pDS90 para tratar de eliminar el gen *BoFuT4\_P059630.1*, la enzima elegida fue *XhoI* y la sonda utilizada para discriminar los transformantes positivos fue la sonda derivada de la región flanqueante 3' (ver Figura 48). En estas condiciones, el alelo silvestre se caracterizará por ser detectado en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 4358 nucleótidos y el alelo mutante en una banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN de 6617 nucleótidos.



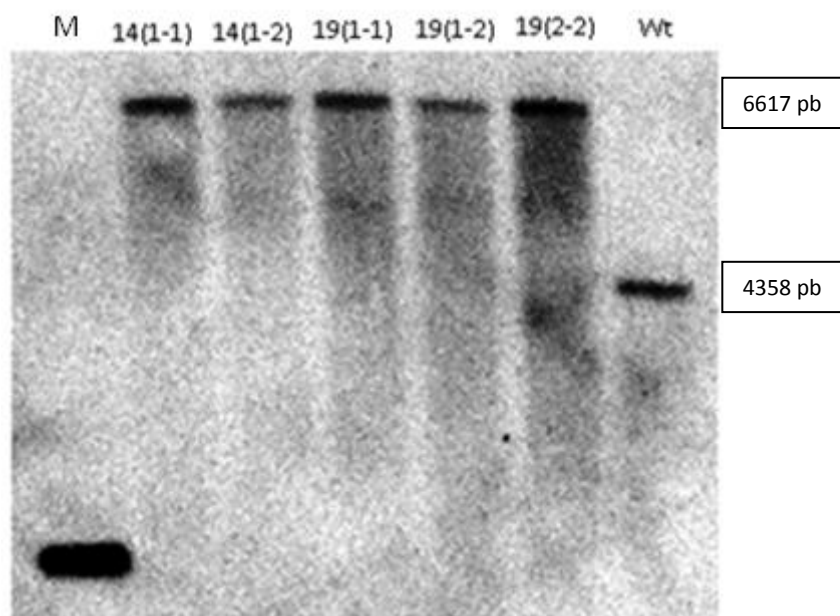
**FIGURA 53.** Estrategia de reemplazamiento génico de *BoFuT4\_P059360.1* mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen y del alelo mutante construido artificialmente y clonado en el plásmido pDS90. El alelo silvestre presenta una banda de 4358 nucleótidos (A) y el alelo mutante presenta una banda de 6617 nucleótidos (B).

En el caso de los candidatos a cepas mutantes  $\Delta BcNor2$ , se comprueba que todos los transformantes analizados poseen el alelo mutante, de manera que podemos escoger cualquiera como representante de un auténtico mutante en el gen *BoFuT4\_P053120.1*. Cabe mencionar que los candidatos provienen de dos cepas originales, 56 y 82, de los cuales se han obtenido cultivos monospóricos denotados con números colocados entre paréntesis (como por ejemplo: 2-1), para garantizar, como habíamos mencionado anteriormente, la homocariosis de las mutaciones correspondientes en los transformantes candidatos seleccionados (Figura 49).



**FIGURA 54.** Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes candidatos de *B. cinerea* a ser auténticos mutantes  $\Delta BcNor2$ . El ADN genómico de los 6 candidatos y el wt fue digerido con la enzima *SacI*. El filtro resultante de la electroforesis y transferencia de los fragmentos derivados de la digestión fue hibridado con la sonda 5', generada mediante PCR con los oligos 53120FKpnI y 53120RHindIII.

En el caso de los candidatos a cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$ , en la hibridación con la sonda 3' se comprueba que ningún transformante analizado tiene el alelo silvestre (Wt), es decir que podemos elegir cualquiera de ellos como auténticos mutantes en el gen BoFuT4\_P058630.1. Como en el caso de los mutantes  $\Delta BcNor2$ , los candidatos provienen de dos cepas originales, 14 y 19, de los cuales se han obtenido también cultivos monospóricos denotados igualmente con números colocados entre paréntesis (Figura 50).



**FIGURA 55.** Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes candidatos de *B. cinerea* a ser auténticos mutantes  $\Delta Bcmd1$ . El ADN genómico de los 5 candidatos y el wt fue digerido con la enzima *XhoI*. El filtro resultante de la electroforesis y transferencia de los fragmentos derivados de la digestión fue hibridado con la sonda 3', generada mediante PCR con los oligonucleótidos 09022RNotI y 09022FXbaI.

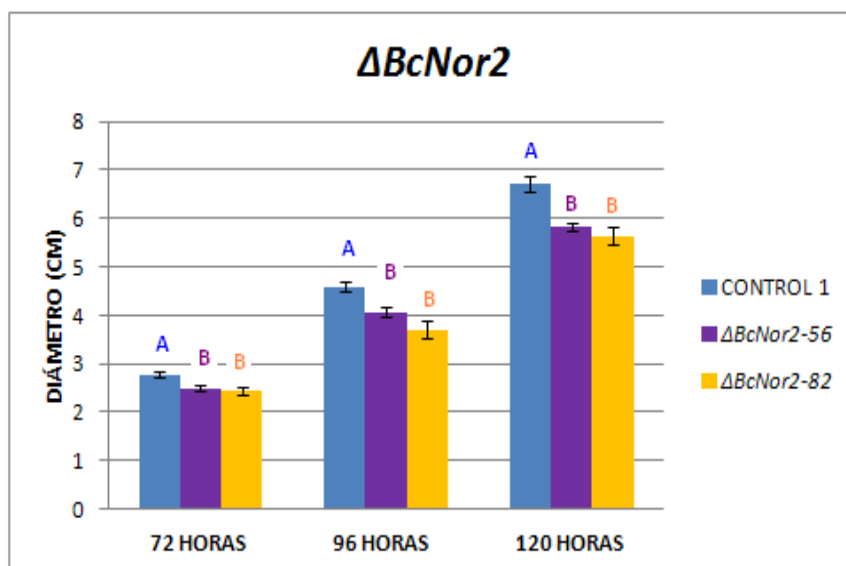
#### e. Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta BcNor2$ y $\Delta Bcmd1$ .

Para la caracterización fisiológica de los mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  se seleccionaron dos de los candidatos positivos obtenidos en las hibridaciones de Southern para constatar que observamos el mismo fenotipo en los dos, lo que sería indicativo de las alteraciones que pudieran observarse son consecuencia de la mutación introducida y no de otros factores. Esta caracterización se llevó a cabo con el objeto de obtener información sobre la función que los correspondientes productos génicos codificados por cada gen puedan tener a la luz de las alteraciones fenotípicas que los mutantes puedan manifestar. En el caso del gen BoFuT4\_P053120.1 (mutantes  $\Delta BcNor2$ ), asumiendo que codifica un factor de transcripción cuya expresión se induce en respuesta a NO, cabría considerar varias posibilidades, entre ellas que sea inducido como parte de la batería de respuestas que el hongo activa en respuesta a condiciones de estrés nitrosativo. Su caracterización podría proporcionar claves sobre la naturaleza de algunas de estas respuestas. Por su parte, en relación al gen BoFuT4\_P059630.1 (mutantes  $\Delta Bcmd1$ ), consideramos que su posible función puede estar relacionada con procesos de desarrollo, pero no disponemos de ningún tipo de evidencias derivadas del análisis *in silico* ni de estudios previos en genes ortólogos en otros organismos. Como parte del análisis fenotípico de los mutantes en cada uno de estos genes se decidió analizar su capacidad

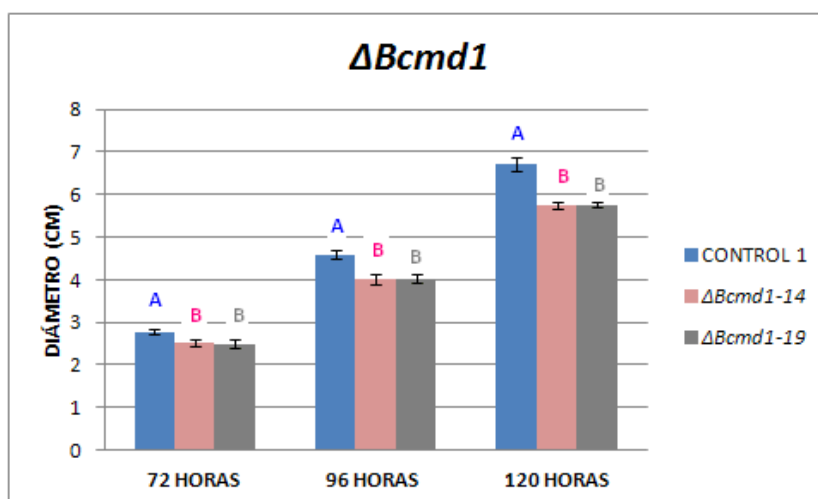
de crecimiento saprofítico, la sensibilidad a diferentes tipos de estrés (nitrosativo, oxidativo, salino y osmótico), y la capacidad de infectar a la planta huésped.

### i. Análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico

La capacidad de crecimiento saprofítico de las cepas  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  se analizó evaluando el crecimiento de cada cepa en medios sintéticos, crecimiento que fue cuantificado estimando el diámetro medio de la colonia en desarrollo sobre placas de cultivo siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.b.i de Materiales y Métodos. Para cada cepa se sembraron tres placas de Petri y como control se utilizó la cepa Control 1, obtenida en el mismo experimento de transformación a partir de un protoplasto regenerado de la cepa silvestre. Los resultados con las comparativas realizadas con los datos tomados a las 72, 96 y 120 horas de tiempo de incubación se pueden ver en las figuras 51 y 52. El análisis estadístico ANOVA demuestra que en los dos casos, es decir, para los dos genes, se detectan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el crecimiento saprofítico entre el Control 1 y los mutantes correspondientes. Tanto los mutantes  $\Delta BcNor2$  como los mutantes  $\Delta Bcmd1$  muestran una reducción en el diámetro de la colonia y, por lo tanto, una reducción en la capacidad de crecimiento saprofítico. Considerando los datos tomados a las 96 horas de tiempo de cultivo, momento en el que se aprecian ya muy bien las diferencias, esta reducción es de un 15% para los mutantes  $\Delta BcNor2$  y de un 10% para los mutantes  $\Delta Bcmd1$  en relación con la cepa Control C1.



**FIGURA 56.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y de la cepa Control 1 a las 72, 96 y 120 horas de crecimiento en medio MEA. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias de tres placas en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 57.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$  y de la cepa Control 1 a las 72, 96 y 120 horas de crecimiento en medio MEA. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias de tres placas en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para facilitar la comparación del crecimiento saprofito de cada cepa mutante con la cepa control C1, la diferencia del diámetro medio de la colonia se expresó en forma del porcentaje que supone la diferencia observada sobre el diámetro medio de la colonia de la cepa control C1. Dichos porcentajes para cada cepa mutante se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15.** Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 a las 72, 96 y 120 horas.

	TIEMPO DE INCUBACIÓN	$\Delta BcNor2-56$	$\Delta BcNor2-82$	$\Delta Bcmd1-14$	$\Delta Bcmd1-19$
% REDUCCIÓN SOBRE CONTROL 1	72 horas	10%	12%	9,5%	10%
	96 horas	11%	19%	12%	12%
	120 horas	13%	16%	14%	14%

## ii. Sensibilidad a diferentes tipos de estrés

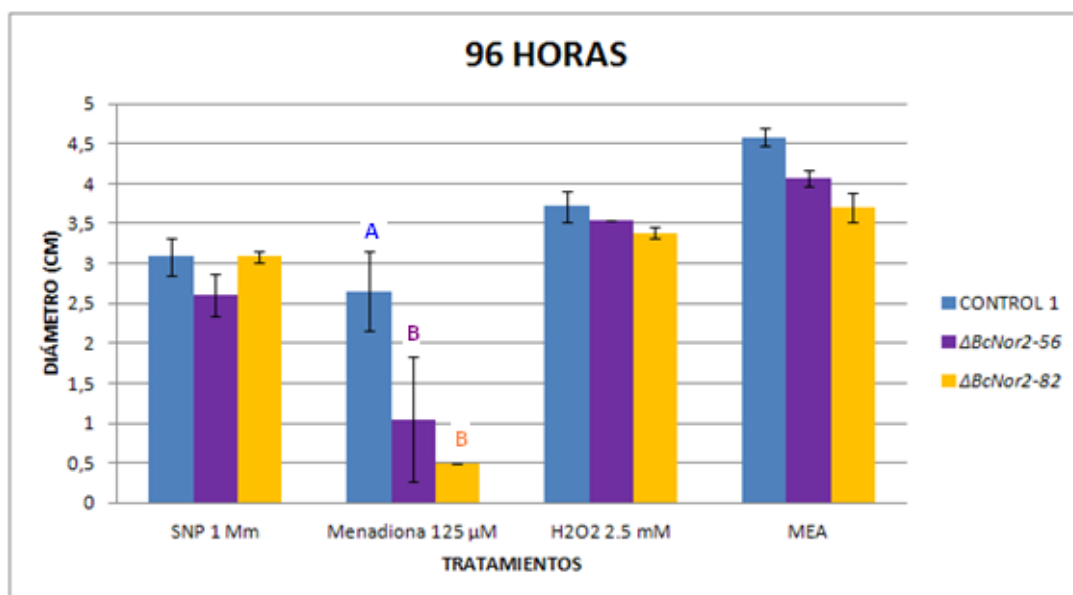
Tomando como referencia la capacidad de crecimiento saprofítico de las distintas cepas en medio sintético MEA, se analizaron los efectos de la exposición a varios tipos de estrés. A continuación se describen los resultados obtenidos con cada tipo de estrés y se resumen los mismos en las figuras correspondientes.

### 1. Estrés nitrosativo y oxidativo

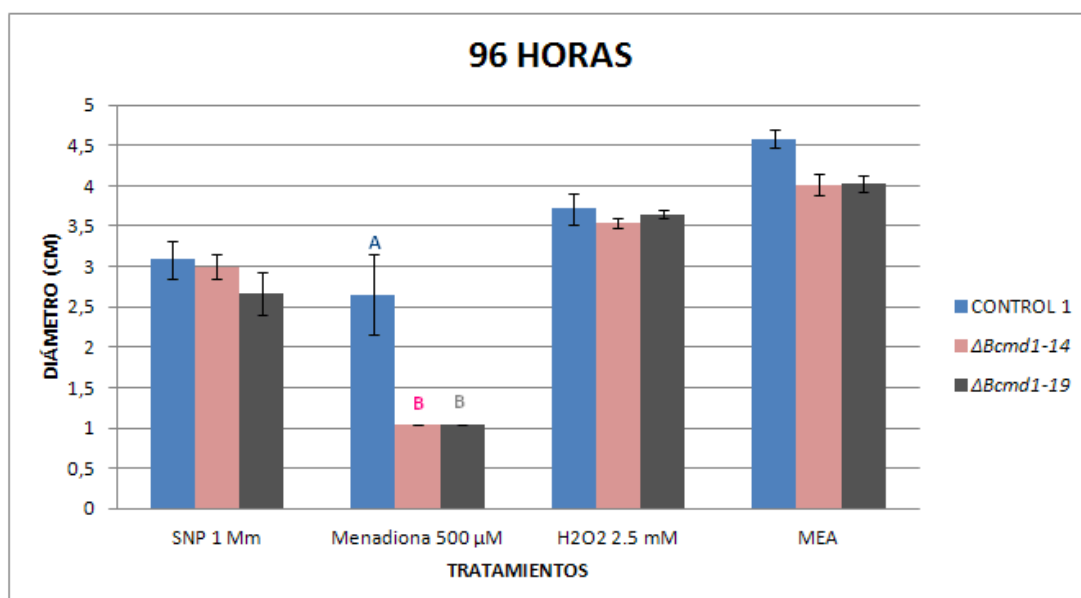
La sensibilidad a estrés nitrosativo y oxidativo de los mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  y de la cepa Control 1 se analizó en medio MEA al que se añadió, después de ser esterilizado, bien SNP 1 mM para determinar una situación de estrés nitrosativo, bien Menadiona 500  $\mu$ M o  $H_2O_2$  2.5 mM para determinar una situación de estrés oxidativo. Posteriormente, se cuantificó la capacidad de crecimiento en cada condición del mismo modo en que se estimó la capacidad de crecimiento saprofítico en ausencia de un agente causante de estrés es decir, estimando el diámetro de la colonia a tiempos establecidos: 72, 96 y 120 horas de incubación. Para cada cepa y condición se trabajó con tres placas de cultivo. Los datos tomados a las 96 horas de incubación se utilizaron para construir los histogramas que se presentan en las Figuras 53 y 54.

Una primera inspección de los resultados obtenidos en estos análisis indica que ni el estrés nitrosativo impuesto por la presencia de SNP 1 mM ni el estrés oxidativo impuesto por  $H_2O_2$  2,5 mM determinan una restricción evidente en la capacidad de crecimiento de los mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$ , lo que indica que los mutantes no presentan una mayor sensibilidad a estas condiciones de estrés en comparación con la cepa control C1 (silvestre). Tanto unos mutantes como los otros sí muestran, sin embargo, una menor capacidad de crecimiento en presencia de menadiona, lo que indica que los mutantes en los dos genes que estamos analizando son más sensibles al estrés oxidativo determinado por el radical superóxido (liberado por menadiona). El análisis estadístico ANOVA demuestra que las diferencias observadas en este caso, el tratamiento con menadiona, son significativas para los dos tipos de mutantes. Por lo tanto, tanto los mutantes  $\Delta BcNor2$  como los  $\Delta Bcmd1$  son hipersensibles al estrés oxidativo impuesto por menadiona, pero son tipo silvestre en relación con la sensibilidad al estrés oxidativo impuesto por  $H_2O_2$  y al estrés nitrosativo impuesto por SNP.





**FIGURA 58.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  (56 y 82) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con SNP 1 mM, Menadiona 500  $\mu$ M y  $H_2O_2$  2.5 mM. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias de tres placas en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 59.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$  (14 y 19) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con SNP 1 mM, Menadiona 500  $\mu$ M y  $H_2O_2$  2.5 mM. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias de tres placas en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para facilitar la comparación de la sensibilidad a condiciones de estrés oxidativo y osmótico de cada cepa mutante con la cepa control C1, la diferencia del diámetro medio de la colonia se expresó en forma del porcentaje que supone la diferencia observada sobre el diámetro medio de la colonia de la cepa control C1. Dichos porcentajes para cada cepa mutante se presentan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Porcentajes de la reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 frente a condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo.

	CONDICIÓN	$\Delta BcNor2-56$	$\Delta BcNor2-82$	$\Delta Bcmd1-14$	$\Delta Bcmd1-19$
% REDUCCIÓN SOBRE CONTROL 1	SNP 1 mM	16%	0,1%	2,6%	13%
	Menadiona 500 $\mu$ M	60%	80%	60%	60%
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2.5 mM	5%	9%	23%	20%

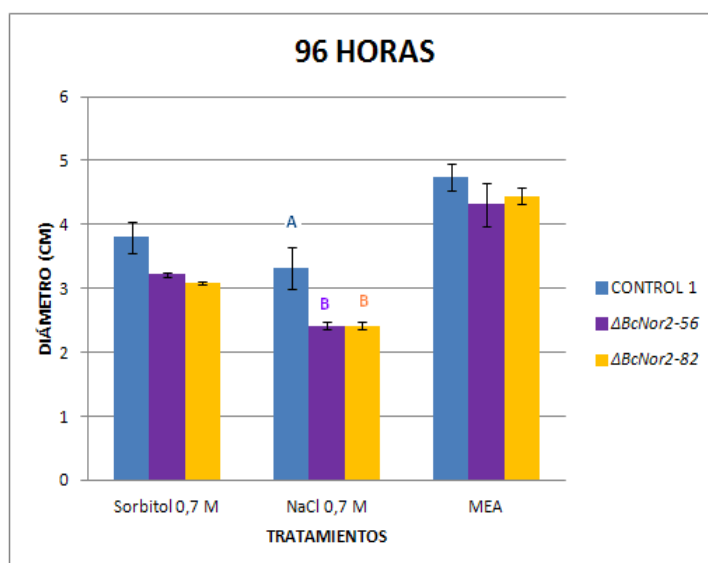
## 2. Estrés osmótico y salino

La sensibilidad a estrés osmótico y salino de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  y de la cepa Control 1 se analizó en medio MEA al que se añadió, después de ser esterilizado, bien Sorbitol 0.7 M para determinar una situación de estrés osmótico, bien NaCl 0.7 M para determinar una situación de estrés salino. Posteriormente, se cuantificó la capacidad de crecimiento saprofítico en ausencia del agente causante de estrés es decir, estimando el diámetro de la colonia a los tiempos establecidos: 72, 96 y 120 horas de incubación. Para cada cepa y condición se trabajó con tres placas de cultivo. Los datos tomados a las 96 horas de incubación se utilizaron para construir los histogramas que se presentan en las Figuras 55 y 56.

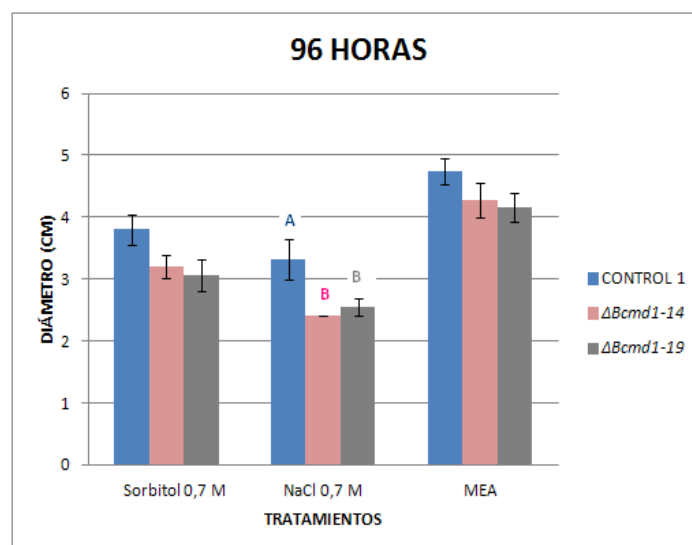
Una primera inspección de los resultados obtenidos en estos análisis indica que tanto las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  como las cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$  muestran una reducción en la capacidad de crecimiento en presencia de Sorbitol y NaCl. En el primer caso esta reducción representa entre un 15% y un 20%, lo que indica que de acuerdo al porcentaje de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes en los dos genes que estamos analizando en comparación con los de la cepa Control 1, son mínimamente sensibles al estrés osmótico determinado por el Sorbitol. En el segundo caso esta reducción es en promedio de un 25%, lo que indica que de acuerdo al porcentaje de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes en los dos genes que estamos analizando en comparación con los de la cepa Control 1, son medianamente sensibles al estrés salino determinado por el NaCl.

El análisis estadístico ANOVA demuestra que las diferencias observadas para los dos tipos de estrés, tanto osmótico como salino, son significativas para los dos tipos de mutantes. Por esta razón podemos decir que tanto las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  como las cepas mutantes

$\Delta Bcmd1$  son medianamente sensibles al estrés osmótico impuesto por el Sorbitol y mínimamente sensibles al estrés salino impuesto por NaCl.



**FIGURA 60.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  (56 y 82) y de la cepa Control 1 en medio de cultivo MEA suplementado con 0,7 M de Sorbitol y 0,7 M de NaCl. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 61.** Crecimiento radial de las cepas mutantes  $\Delta Bcmd1$  (14 y 19) y de la cepa Control 1 en el medio de cultivo MEA suplementado con 0,7 M de Sorbitol y 0,7 M de NaCl. Los datos representados corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las colonias en los tiempos y condiciones indicados. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para facilitar la comparación de la sensibilidad a condiciones de estrés osmótico y salino de cada cepa mutante con la cepa control C1, la diferencia del diámetro medio de la colonia se expresó en forma del porcentaje que supone la diferencia observada sobre el diámetro medio de la colonia de la cepa control C1. Dichos porcentajes para cada cepa mutante se presentan en la tabla 17.

**Tabla 17.** Porcentajes de la reducción del diámetro de la colonia de cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1 frente a condiciones de estrés osmótico y salino.

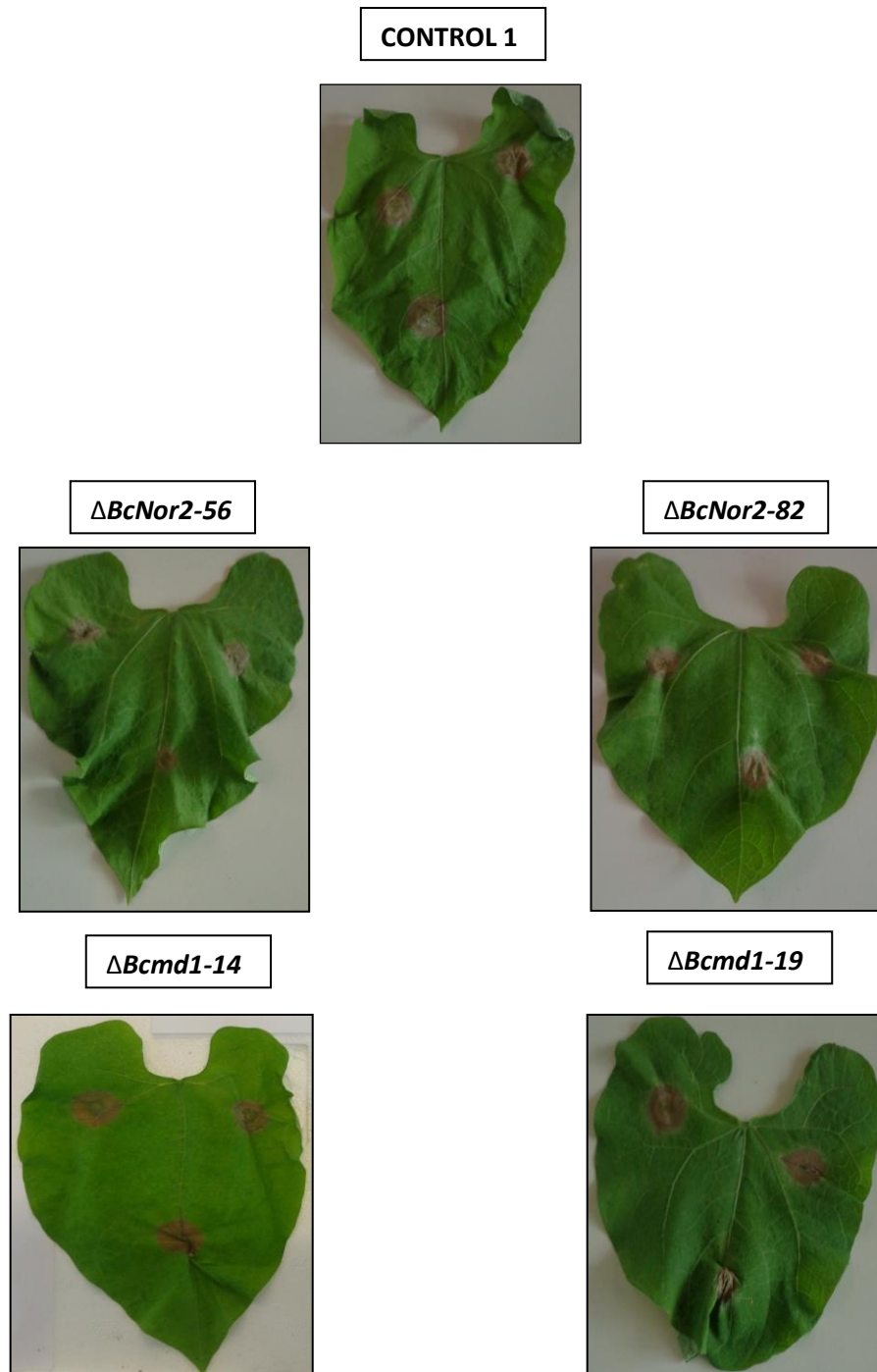
	TRATAMIENTO	$\Delta BcNor2-56$	$\Delta BcNor2-82$	$\Delta Bcmd1-14$	$\Delta Bcmd1-19$
% REDUCCIÓN SOBRE CONTROL 1	Sorbitol 0,7 M	15%	18%	16%	19,5%
	NaCl 0,7 M	27%	27%	27%	23%

### iii. Análisis de la agresividad sobre plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*)

Finalmente, para completar la caracterización fenotípica de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  decidimos evaluar la existencia o no de alteraciones en las mismas en relación a su capacidad de infección. En nuestro laboratorio la estimación de la capacidad de infección de las cepas dadas de *B. cinerea* se realiza llevando a cabo inoculaciones controladas sobre hojas de plantas intactas o cortadas y estimando el diámetro medio de la lesión producida a tiempos que oscilan entre las 96 y 120 horas desde la inoculación. En el caso concreto de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  debemos tener en cuenta que estas cepas muestran una ligera reducción (10%-20%) en su crecimiento saprofítico en medios de cultivo sintéticos en relación con la cepa utilizada como control (Control 1), como demuestran los resultados descritos en el apartado 4.d.i de este capítulo. Siendo así, si existieran diferencias entre las cepas mutantes y la cepa control (Control 1) en relación con su capacidad para infectar a la planta huésped, la cuantificación de dichas diferencias debe tener en cuenta este efecto.

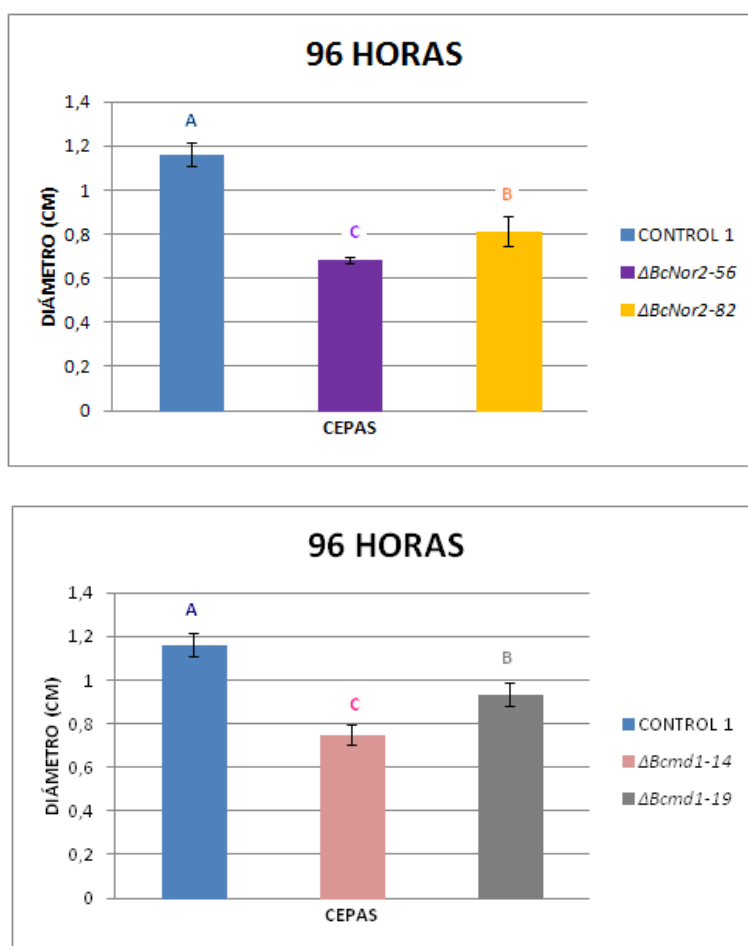
Para analizar la agresividad en las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  y en la cepa Control 1, se llevaron a cabo ensayos de infección en hojas de judía para cada una de ellas. Se realizaron tres repeticiones para cada cepa y los resultados presentados a continuación corresponden a un experimento representativo de cada ensayo/cepa. Las inoculaciones se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 7 de Materiales y Métodos y los datos fueron recolectados a las 96 h.p.i. De igual forma que para el análisis de sensibilidad a distintos tipos de estrés en medios de cultivo sintéticos, para cada lesión se tomaron los valores de dos diámetros perpendiculares y se tomó como diámetro de una lesión la media de los dos diámetros perpendiculares medidos. La figura 57 muestra hojas de judía

representativas de las inoculaciones llevadas a cabo con la cepa control C1, con las cepas mutantes  $\Delta BcNor2-56$  y  $\Delta BcNor2-82$  y  $\Delta Bcmd1-14$  y  $\Delta Bcmd1-19$ .



**FIGURA 62.** Imágenes representativas de hojas de judía infectadas con los mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  y la cepa Control 1. Las imágenes fueron tomadas a las 96 h.p.i.

Para cada cepa se calculó entonces la media de lesión como la media de los diámetros de todas las lesiones generadas en cada experimento. Se sometieron los datos obtenidos a un análisis ANOVA ( $p < 0.05$ ) para determinar la existencia o no de diferencias significativas en los diámetros de lesión generados por cepas diferentes y entre cepas. Los resultados obtenidos en un experimento representativo con las mediciones realizadas a las 96 horas después de la inoculación se presentan en la Figura 58. El diámetro medio de lesión generado por las cepas mutantes es significativamente menor que el generado por la cepa control C1 tanto para los mutantes  $\Delta BcNor2$  como para los mutantes  $\Delta Bcmd1$ . En los dos casos, el comportamiento de los mutantes analizados es ligeramente diferente. De hecho, en los dos casos el análisis ANOVA detecta diferencias significativas entre los dos mutantes analizados para cada gen, lo que introduce un elemento de dificultad adicional a la hora de comparar la patogenicidad de los mutantes de cada gen con el control.



**FIGURA 63.** Diámetro de la lesión producida en hojas de judía por los mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$ . Se realizaron tres repeticiones para cada cepa y los resultados presentados en la figura corresponden a un experimento representativo de cada ensayo/cepa. Los datos se tomaron a las 96 h.p.i. y corresponden a las medias aritméticas de los 2 diámetros de las lesiones en las condiciones indicadas. Las letras A y B indican grupos entre los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para facilitar la comparación de la patogenicidad de cada cepa mutante con la cepa control C1, la diferencia del diámetro medio de lesión se expresó en forma del porcentaje que supone la diferencia observada sobre el diámetro medio de lesión de la cepa control C1. Dichos porcentajes para cada cepa mutante se presentan en la tabla 18.

**Tabla 18.** Porcentajes de la reducción del diámetro de lesión producida por cada cepa mutante en comparación con la cepa control C1.

	$\Delta BcNor2-56$	$\Delta BcNor2-82$	$\Delta Bcmd1-14$	$\Delta Bcmd1-19$
% REDUCCIÓN SOBRE CONTROL 1	41%	30%	35,5%	20%

El análisis funcional de las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  nos ha permitido identificar varios aspectos fenotípicos en los cuales los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1, respectivamente, pudieran estar implicados en la fisiología de *B. cinerea*. Si tomamos en conjunto todos los resultados obtenidos del comportamiento de las cepas mutantes en los dos genes analizados en cuanto a su crecimiento saprofitico en comparación con la cepa Control 1, a su respuesta a los distintos tipos de estrés a los cuales los hemos sometido y a su agresividad en plantas de judía, llama la atención que exhiben el mismo comportamiento tanto unos como otros. Es decir, que al parecer tanto el gen BofuT4\_P053120.1, que codifica para un factor de transcripción que se induce en presencia de NO, como el gen BofuT4\_P059630.1, que codifica para un gen que al parecer está implicado en desarrollo y se reprime en respuesta a la exposición a NO, están implicados directa o indirectamente en la capacidad de crecimiento saprofitico del hongo, en su respuesta a distintos tipos de estrés, como el oxidativo mediado por el radical superóxido (liberado por Menadiona), osmótico y salino, y además en su capacidad para infectar a la planta huésped.

## 5. Sobreexpresión del gen de la flavohemoglobina

Para complementar el estudio de las posibles funciones fisiológicas en las que el NO pueda participar en *B. cinerea*, en particular en aquellos procesos en los que hemos podido comprobar en fases previas de nuestro trabajo que participa, concretamente en germinación, decidimos analizar las alteraciones que pudieran derivarse de la sobreexpresión del gen *Bcfhg1*. En principio es posible asumir que una sobreexpresión del gen *Bcfhg1* determine un aumento de actividad de detoxificación de NO y, por lo tanto, la eliminación en mayor medida del NO que el propio patógeno puede producir durante su desarrollo, es decir, del NO endógeno. Nos planteamos por esta razón generar transformantes que sobreexpresen este gen a partir de una construcción que incluya una fusión génica de la región estructural del gen *Bcfhg1* unido al promotor del gen de la actina (*ActA*) de *B. cinerea*, promotor de expresión fuerte y constitutiva. Esta construcción será posteriormente introducida en *B. cinerea* mediante transformación de protoplastos y se seleccionarán para su análisis funcional transformantes en los que sea posible confirmar la sobreexpresión del gen *Bcfhg1*.

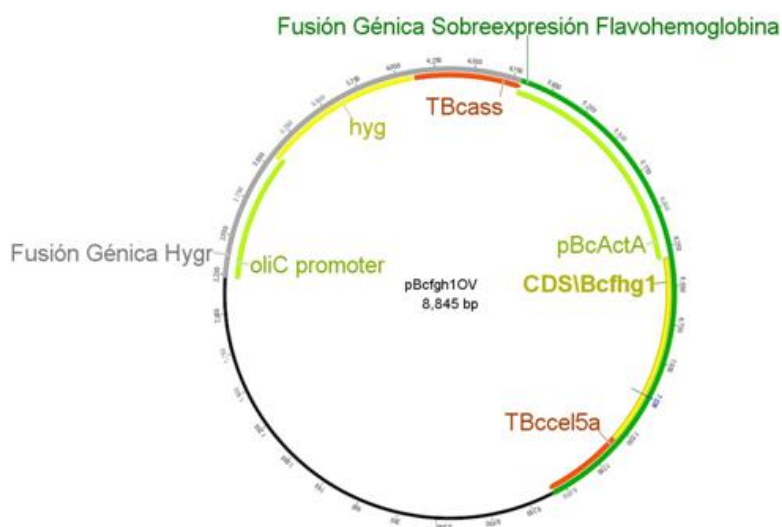
### a. Construcción del plásmido p*Bcfhg1*OV

Para la construcción del plásmido de sobreexpresión se utilizó como plásmido de partida y esqueleto base el plásmido KSHAIG (Shlezinger *et al.*, 2011), cedido amablemente por el Dr. Amir Sharon, de la Universidad de Tel Aviv. Este plásmido incluye una fusión del gen bacteriano que determina resistencia a higromicina fusionado al promotor *OliC* de *A. nidulans*. Como terminador esta fusión incluye un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* que incluye la parte final de la región codificante del gen *Bcass1* y su terminador. Este cassette permite la expresión eficiente del gen de resistencia a higromicina, aunque se ha descrito que en algunos transformantes puede determinar el silenciamiento del gen *Bcass1* (Patel *et al.*, 2010), determinando auxotrofia. Esta construcción deriva de un problema en la identificación del fragmento de ADN que incluye el terminador que en realidad se deseaba clonar inmediatamente a continuación del gen de resistencia a higromicina. Este fragmento debía incluir el terminador del gen codificador de la  $\beta$ -tubulina (*tubA*) de *B. cinerea*, pero en realidad se clonó el fragmento indicado que incluye la región terminal del gen *Bcass1* y su terminador (Patel *et al.*, 2010). Detectado el problema y comprobado que la construcción permite la expresión de la resistencia a higromicina, el plásmido ha sido utilizado por diversos autores.

KSHAIG incluye además un cassette en el que el promotor del gen *BcactA* y el terminador del gen *Bcce15A* han sido clonados a ambos lados, y en la orientación adecuada, de un pequeño polilinker que incluye los sitios de restricción *PacI* y *Ascl* que permite la clonación orientada de cualquier fragmento de ADN cuya expresión se pretende que sea dirigida por el promotor *BcactA*. En este polilinker decidimos clonar la región codificante del gen *Bcfhg1*. Con este objeto se sintetizaron los oligonucleótidos oFHOVEXF, de 26 nucleótidos, diseñado sobre la secuencia localizada en los alrededores del codón de iniciación del gen *Bcfhg1* e incluyendo un sitio de restricción para la enzima *PacI*, y oFHOVEXR, también de 26 nucleótidos de



longitud, diseñado sobre la secuencia en los alrededores del codón de terminación del gen *Bcfhg1* e incluyendo una diana de restricción para la enzima de restricción *Ascl* (la secuencia de ambos oligonucleótidos se presenta en la tabla 4). Con estos oligonucleótidos se amplificó la región codificante del gen *Bcfhg1* y el fragmento resultante fue clonado en pGEMT-Easy. A partir del plásmido derivado se purificó el fragmento una vez digerido con las enzimas *PacI* y *Ascl*, y el fragmento resultante se clonó en el plásmido KHSAG digerido con las mismas enzimas. Se generó así el plásmido *pBcfhg1OV*, que tiene un tamaño de 8845 nucleótidos (figura 59).



**FIGURA 64.** Mapa del plásmido *pBcfhg1OV*. Se destacan las dos fusiones génicas clonadas en el mismo, la primera para sobreexpresar el gen *Bcfhg1* y la segunda para la expresión de la resistencia a higromicina.

#### b. Transformación de *B. cinerea* con el plásmido *pBcfhg1OV*

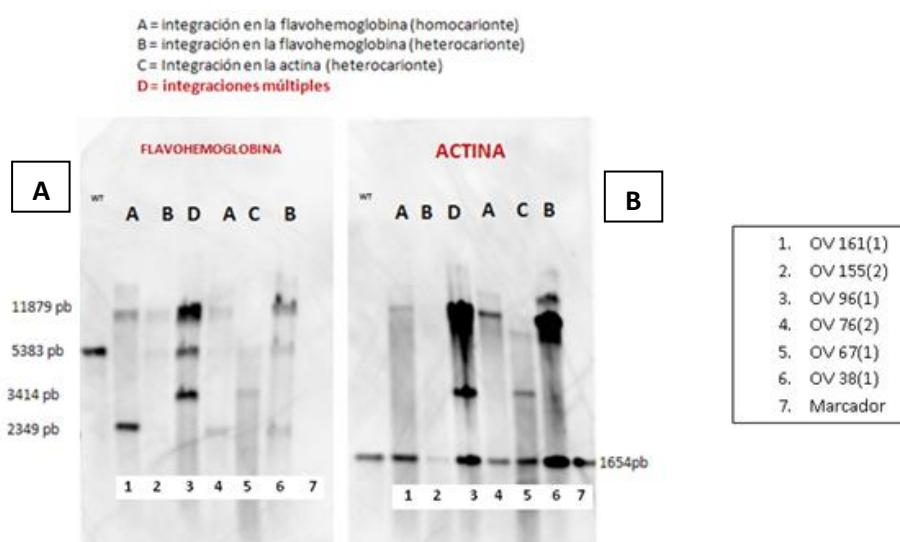
La transformación de *B. cinerea* con el plásmido *pBcfhg1OV* se realizó en paralelo con las transformaciones llevadas a cabo con los plásmidos *pDS13* y *pDS90*. El procedimiento se detalla en el apartado 4.b de este capítulo. A partir de las placas Petri con medio MEA con 70  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina originales se recolectaron 200 transformantes primarios de los cuales fueron seleccionados 20 para su purificación y análisis. Estos fueron replicados a placas frescas de medio selectivo de forma individualizada. En total se realizaron tres réplicas sucesivas en medio selectivo.

c. Análisis genético de los transformantes obtenidos con *pBcfhg1OV* e identificación de distintos eventos de integración del plásmido en el genoma de *B. cinerea*

Previo al análisis mediante hibridación tipo Southern de los 20 transformantes seleccionados inicialmente para identificar distintos eventos de integración del plásmido *pBcfhg1OV*, se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de las cepas originales. Una vez obtenidos, se eligió un derivado monospórico de cada transformante seleccionado para su utilización en todos los análisis posteriores.

Se preparó ADN genómico de cada transformante. Muestras de ADN genómico de todos ellos, junto con ADN de la cepa tipo silvestre, fueron digeridas con la enzima *HindIII* y transferidas a un filtro de nylon. La membrana resultante fue probada en una hibridación tipo Southern con una sonda derivada de la región codificante del gen *Bcfhg1* obtenida mediante PCR con los oligonucleótidos FH1A y FH1B descritos en la tabla 4.

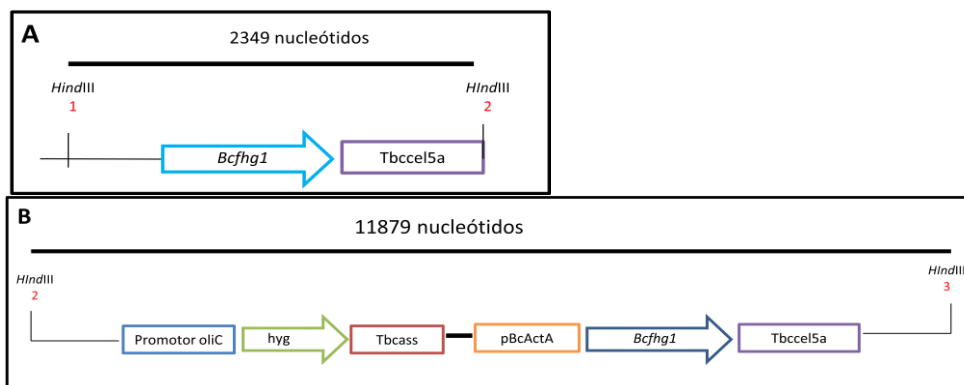
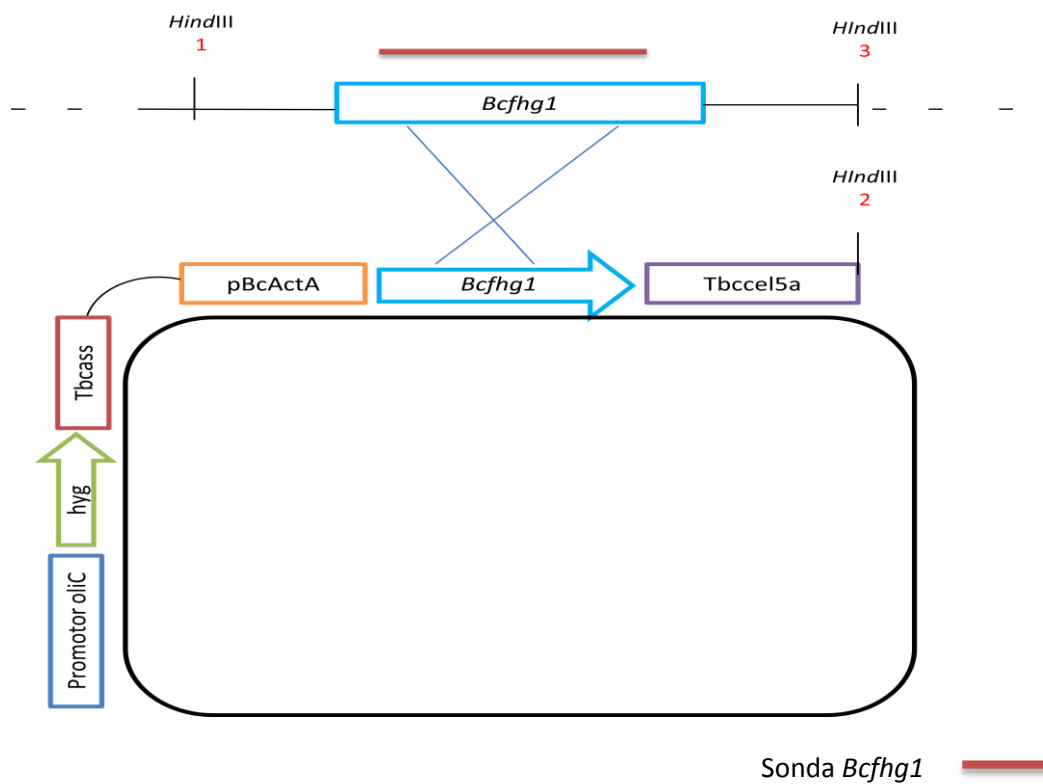
De los 20 transformantes seleccionados inicialmente se eligieron 6 transformantes como representantes de los distintos eventos de integración que pudieron ser identificados en función de los patrones de hibridación detectados en las hibridaciones llevadas a cabo con la sonda derivada de la región codificante del gen *Bcfhg1*. Los patrones de hibridación obtenidos con estos 6 transformantes se presentan en la Figura 60. En esta figura se presentan también los resultados obtenidos en una hibridación llevada a cabo con una membrana equivalente con una sonda derivada de la región codificante del gen *BcActA* marcada mediante amplificación con los oligonucleótidos BcActAF y BcActAR.



**FIGURA 65.** Análisis mediante hibridación tipo Southern de 6 transformantes de *B. cinerea*, representantes de los distintos eventos de integración del plásmido *pBcfhg1OV*. El ADN genómico de las 6 cepas elegidas y de la cepa del silvestre EB05.10 fue digerido con la enzima *HindIII*. Los filtros resultantes de las electroforesis y transferencias de los fragmentos derivados fueron hibridados con la sonda derivada de la región codificante del gen *Bcfhg1* (Panel A) y con la sonda derivada del gen *BcActA* (Panel B). Los números en la parte inferior de cada membrana representa un transformante (según los códigos presentados en la caja de la parte derecha de la figura) y las letras A, B, C y D, en la parte superior de cada membrana representa un tipo de evento de integración particular (ver texto).

Estos eventos de integración representan 4 situaciones particulares: integración en el gen de la flavohemoglobina en homocariosis, integración en el gen de la flavohemoglobina en heterocariosis, integración en el gen de la actina en heterocariosis e integraciones múltiples. En las Figuras 60 y 61 se presentan esquemas ilustrativos de lo que sucede en los dos tipos de integración principales identificados: uno correspondiente a la integración del plásmido p*Bcfhg1OV* en el gen *Bcfhg1* por recombinación homóloga (Figura 61) y el otro correspondiente a la integración en el gen *BcActA* también por recombinación homóloga (figura 62).

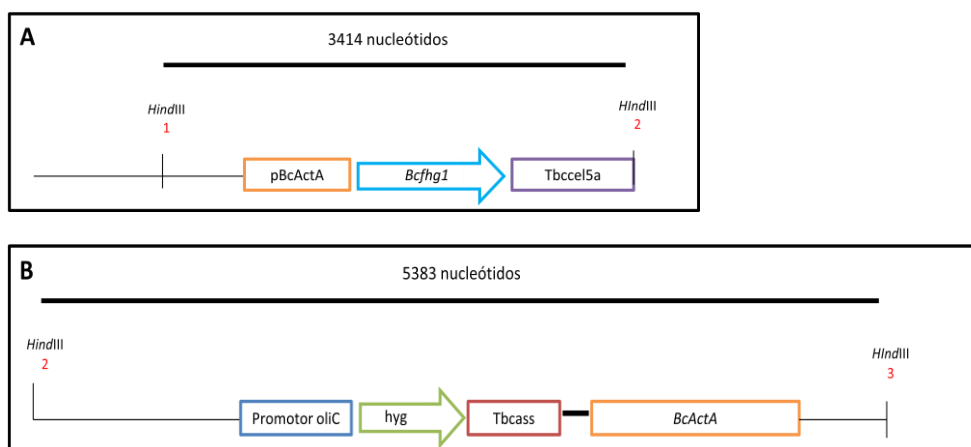
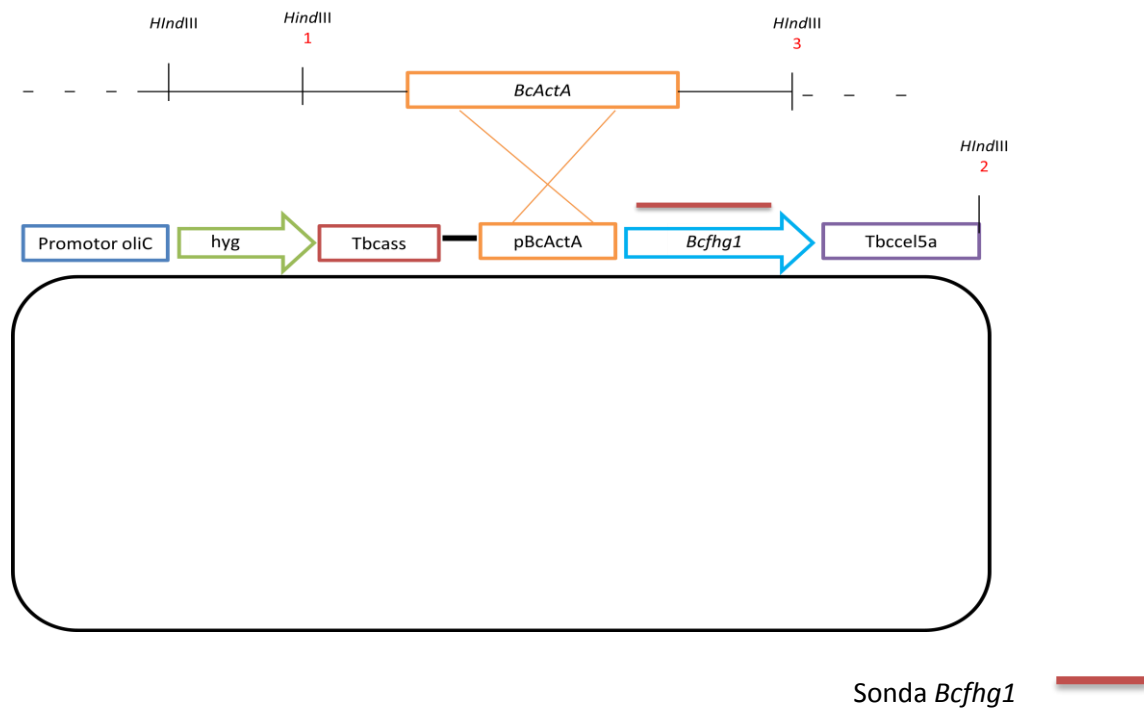
En el primer caso, una vez que se alinean, la copia genómica nativa del gen *Bcfhg1* presente en el genoma de *B. cinerea* con la secuencia del mismo clonada en el plásmido p*Bcfhg1OV*, se produce la integración de una copia completa del plásmido transformante en el locus homólogo del gen *Bcfhg1* como consecuencia de un único evento de recombinación homóloga entre ambas copias. Esta integración en un análisis tipo Southern con una sonda derivada de la región codificante del gen *Bcfhg1* se caracteriza por la presencia de dos bandas: (A) una primera con un tamaño de 2349 nucleótidos correspondiente al fragmento de ADN que comienza en el sitio *HindIII* 1 situado en la secuencia genómica flanqueante aguas arriba del gen *Bcfhg1* y termina en el sitio *HindIII* 2 situado en el plásmido p*Bcfhg1OV* y (B) una segunda con un tamaño de 5383 nucleótidos y correspondiente al fragmento de ADN que comienza desde el sitio *HindIII* 2 y termina en el sitio *HindIII* 3 presente en la secuencia genómica flanqueante aguas abajo del gen *Bcfhg1* de *B. cinerea*.



**FIGURA 66.** Esquema de la integración del plásmido *pBcfhg1OV* en el gen *Bcfhg1*.

En el segundo caso, una vez que se alinean, la copia endógena del gen *BcActA* con la secuencia del mismo incluido en el plásmido *pBcfhg1OV*, que corresponde únicamente a la región promotora del mismo, se produce un único evento de integración. El resultado es la integración de una copia del plásmido en el locus *BcActA*. En el análisis tipo Southern con la sonda derivada de la región codificante del gen *Bcfhg1* este tipo de integración se detecta también mediante la presencia de dos bandas, cuyos tamaños en este caso son: (A) una

primera banda derivada de un fragmento de ADN con un tamaño de 3414 nucleótidos que comienza en el sitio *HindIII* 1 situado en la secuencia genómica flanqueante aguas arriba del gen *BcActA* y termina en el sitio *HindIII* 2 situado en el plásmido *pBcfhg1OV* y (B) una segunda banda derivada de un fragmento de ADN con un tamaño de 5383 nucleótidos y que comienza en el sitio *HindIII* 2 y termina en el sitio *HindIII* 3 presente en la secuencia genómica flanqueante aguas abajo del gen *BcActA* de *B. cinerea*.



**FIGURA 67.** Esquema de la integración del plásmido *pBcfhg1OV* en el gen *BcActA*.

El análisis de los patrones de hibridación obtenidos indica que los transformantes OV161 y OV76 son transformantes en los que se ha producido una única integración, que ésta ha tenido lugar en el locus *Bcfhg1* y que todos los núcleos del micelio transformante son idénticos (son homocariontes para este tipo de integración), puesto que se detectan únicamente dos bandas de hibridación de 2349 y 11879 nucleótidos. Estos transformantes muestran el patrón de hibridación que denominamos A. En los transformantes OV155 y OV38, además de estas dos bandas se identifica la banda del alelo silvestre del gen *Bcfhg1*, lo que es compatible con la presencia de núcleos derivados de la integración en el locus *Bcfhg1* y de núcleos no transformados (en términos genéticos pueden ser considerados como heterocariontes para la integración en el locus homólogo). Estos transformantes muestran el patrón de hibridación que denominamos B. El transformante OV67 muestra un patrón de hibridación compatible con la integración en el locus *BcActA*, ya que se detectan dos bandas de hibridación de 3414 y 5383 nucleótidos de tamaño en la hibridación con la sonda derivada de *Bcfhg1*. Puesto que en la hibridación con la sonda derivada del gen *BcActA* también se detecta la banda que representa el alelo silvestre de este gen, es posible concluir que este es un transformante en el que coexisten núcleos transformados y núcleos no transformados. Este es el patrón de hibridación que denominamos C. Finalmente, el transformante OV96 es un transformante en el que se han producido varias integraciones. La presencia de las bandas diagnósticas de la integración en el locus *BcActA* indica que en algunos núcleos, al menos, la integración se ha producido en el locus homólogo. Se detecta, además, una banda de mayor tamaño y de mayor intensidad que las dos bandas anteriores, indicativa de una posible integración múltiple del plásmido en una posición dada del genoma. Este es el patrón que denominamos de tipo D.

Con un transformante representativo de cada uno de los cuatro tipos de integración descritos nos proponemos determinar en fases futuras de este trabajo en primer lugar el número de copias del cassette de sobreexpresión del gen *Bcfhg1* y en segundo lugar el nivel de expresión del gen *Bcfhg1* en distintas fases de desarrollo de los transformantes en comparación con la cepa silvestre. Con estos transformantes se llevará a cabo, además, un análisis fenotípico preciso, en particular en relación con su capacidad de germinación y con la cinética de germinación. Desafortunadamente, no ha sido posible completar este análisis en el marco temporal de esta tesis doctoral.

# DISCUSIÓN

---





## 1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. cinerea* y *C. graminicola*

El estudio que se desarrolla a lo largo de esta tesis doctoral se centra principalmente en el análisis de las funciones fisiológicas del NO en hongos filamentosos, un grupo de organismos en el que los trabajos realizados en este contexto son muy escasos. Hemos considerado particularmente dos especies distintas como sistema de trabajo. En primer lugar *B. cinerea* por tratarse del sistema sobre el que centramos nuestra actividad investigadora en muy distintos aspectos en nuestro grupo de investigación. Y en segundo lugar, *C. graminicola*, especie que presenta para nosotros importantes ventajas como sistema modelo en particular porque es uno de los pocos hongos filamentosos en los que se ha detectado mediante herramientas bioinformáticas la presencia de un gen codificador de una enzima NOS del tipo de las enzimas NOS de animales. Esta consideración resulta muy interesante en el contexto de nuestra actividad investigadora dado que uno de los principales objetivos que tratamos de alcanzar es desvelar los mecanismos mediante los cuales los hongos filamentosos producen NO. Creemos que ambos sistemas pueden ofrecer información relevante y en cierta medida complementaria en relación con este problema, ya que sabemos que *B. cinerea* produce NO, pero no posee en su genoma un gen codificador de una enzima tipo NOS animal y que *C. graminicola*, como hemos podido determinar en este trabajo de tesis doctoral, también produce NO pero, a diferencia de *B. cinerea*, sí posee un gen codificador de una enzima que estructuralmente responde al tipo de enzimas NOS de animales

Con los resultados derivados de los estudios descritos a lo largo de este trabajo pretendemos contribuir al conocimiento de la fisiología de los hongos filamentosos en relación con NO y su metabolismo en este grupo de organismos. En su análisis hemos propuesto la aplicación de aproximaciones genéticas, bioinformáticas y farmacológicas. Todas ellas han probado ser muy útiles en diferentes estudios relacionados con NO en otros sistemas vivos, principalmente la aplicación farmacológica, cuyas herramientas han resultado ser totalmente válidas y susceptibles de ser aplicadas en nuestros sistemas.

La producción de NO ha sido descrita en numerosos sistemas vivos representantes de los distintos grupos taxonómicos. El principal modelo por el cual se rigen los estudios centrados en la producción de NO es aquel representado por las enzimas tipo NOS, específicas del reino animal y cuya caracterización está ampliamente respaldada por numerosos trabajos de investigación (Schmidt and Walter, 1994; Nathan and Xie, 1999; Tatoyan and Giulivi, 1998, Mayer and Hemmens, 1997, Beck *et al.*, 1999). En hongos filamentosos los estudios son escasos y las descripciones en general muy limitadas. Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek (2013) ofrecen una revisión reciente sobre el tema.

En estudios previos y en ensayos realizados en este trabajo, se ha determinado concretamente que *B. cinerea* produce NO (Conrath *et al.*, 2004; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; van Baarlen *et al.*, 2004; van Baarlen *et al.*, 2007; Turrión-Gómez and Benito, 2011). Se trata de trabajos esencialmente descriptivos en los que se demuestra que este patógeno necrótrofo produce NO. Sólo el trabajo de Turrión-Gómez and Benito (2011) presenta algunos resultados sobre los posibles mecanismos de producción de NO en *B. cinerea*.

Estos autores han considerado la posible participación de las dos rutas enzimáticas conocidas de producción de NO, aquella basada en las enzimas tipo NOS y aquella basada en las enzimas NR, y cuya contribución a la producción de NO del microorganismo fue evaluada con ayuda de un electrodo de NO. Los resultados obtenidos inicialmente son indicativos de que la capacidad de *B. cinerea* de producir NO de forma inducible es independiente de una enzima NOS de tipo convencional y que el posible sistema basado en una enzima NR no es el principal responsable de la misma en este sistema (Turrión-Gómez *et al.*, 2011).

Entendiendo que la utilización de un electrodo de NO presenta algunas limitaciones técnicas, en una extensión de nuestro trabajo orientado a tratar de obtener información acerca de los posibles mecanismos de producción de NO en *B. cinerea* decidimos aplicar una aproximación genética basada en la utilización de mutantes deficientes en genes que participan en las rutas implicadas en los sistemas enzimáticos antes mencionados. Disponemos concretamente de mutantes deficientes en el gen codificador de la enzima NR, y de mutantes deficientes en el gen codificador de la enzima argininosuccinato sintasa. En este último caso hemos utilizado dos tipos de cepas deficientes en esta actividad enzimática, bien mutantes nulos obtenidos mediante reemplazamiento génico ( $\Delta BcAss1-54$  y  $\Delta BcAss1-68$ ) bien cepas que muestran silenciamiento génico del gen diana, *Bcass1* (cepa pLOB 14.3). La utilización de estos mutantes debe ofrecer, en principio, un sistema más “limpio” e informativo para determinar la implicación de uno y otro mecanismo en la producción de NO.

La aplicación de esta aproximación genética para obtener información sobre la determinación de los mecanismos de producción de NO exige disponer de un sistema de detección y de cuantificación de NO eficiente. La utilización de procedimientos fluorimétricos basados en el empleo de agentes fluorescentes (el derivado de la reacción de NO con DAF-2DA en nuestro caso) ha permitido detectar producción de NO mediante microscopía de fluorescencia (Räthel *et al.*, 2003; Planchet and Kaiser, 2006; Laxalt *et al.*, 2007; Prats *et al.*, 2008; Turrión-Gómez and Benito, 2011) y *a priori* resultaba ser una metodología prometedora a la hora de considerar la posible cuantificación de los niveles de NO en función de la cantidad de fluorescencia detectada en cada momento. Con este objeto se trataron de poner a punto y de optimizar las condiciones experimentales básicas y la metodología apropiada para la utilización del fluorímetro. Realizamos numerosos experimentos evaluando distintas condiciones experimentales en relación con el tipo de medio de cultivo utilizado (medios de cultivo ricos como PDB y medios de cultivo pobres como Gamborg's B5S), y el tiempo de incubación de las esporas (esporas en germinación o micelio en desarrollo), concentración de esporas y concentración de DAF-2DA. Los resultados obtenidos durante la puesta a punto parecían válidos y fiables, puesto que fue posible detectar fluorescencia, determinar que era una fluorescencia específica de la producción de NO por parte de las esporas y que se generaba de forma consistente y reproducible en un rango de valores que permitía su medida y cuantificación. Siendo así decidimos trabajar con las cepas mutantes de interés, llevar a cabo las cuantificaciones y tratar de valorar diferencias entre cepas. Desafortunadamente, a pesar de nuestro empeño en intentar obtener datos reproducibles de cuantificación de NO con estas cepas, no fue posible obtener conclusiones claras en relación a la detección de diferencias significativas entre la cantidad de NO producido por las cepas mutantes seleccionadas en comparación con la cepa silvestre de referencia. Los resultados resultaron ser muy erráticos y en absoluto reproducibles. No tenemos explicación para estas observaciones, pero no

descartamos un fallo técnico del equipo producido una vez ajustadas las condiciones de trabajo iniciales, fallo técnico que ha dado problemas de forma generalizada posteriormente. Esta limitación ciertamente nos obliga a considerar la reparación del equipo y a la realización de una nueva serie completa de experimentos de calibración y de análisis de las muestras de interés, trabajo que queda fuera de las posibilidades reales de ejecución en el contexto de esta tesis doctoral. De los resultados obtenidos no es posible derivar información relevante sobre la implicación o no de la ruta dependiente de la enzima NR o de la ruta dependiente de una posible enzima NOS convencional en la producción de NO en *B. cinerea*. Sí es posible concluir que mediante la utilización del fluorímetro ha sido posible detectar producción de NO en esporas de *B. cinerea* en distintos estadios de desarrollo, en particular en fases tempranas del proceso de germinación, observaciones que confirman resultados previos obtenidos mediante microscopía de fluorescencia por nuestro grupo y por otros grupos de investigación.

Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio con ayuda de un electrodo de NO, sugieren que en *B. cinerea* la participación de una enzima NOS de tipo animal no es responsable, al menos de forma mayoritaria de la producción de NO (Turrión-Gómez *et al.*, 2011) y nuestro trabajo basado en la utilización de cepas mutantes y métodos de fluorimetría no ha permitido obtener resultados clarificadores. Sin embargo, disponemos de algunas evidencias de tipo funcional que sugieren que en *B. cinerea* sí existe un sistema enzimático que responde a algunas de las características bioquímicas que definen a las enzimas tipo NOS animal. Nos referimos concretamente al efecto de aceleración en la germinación que determina la adición de un inhibidor de estas enzimas, el L-NNA, efecto similar al determinado por la adición de un secuestrador de NO.

A diferencia de *B. cinerea*, *C. graminicola* presenta en su genoma un gen que muestra una alta homología estructural con el gen codificador de una enzima tipo NOS de mamíferos, hecho que señalamos en un inicio como una gran ventaja para nuestro estudio y una excelente herramienta en nuestro intento por desentrañar los mecanismos de producción de NO en hongos.

Mediante la observación de preparaciones de esporas y micelio de *C. graminicola* al microscopio de fluorescencia, y la detección y cuantificación de NO a partir de esporas y micelio por fluorimetría, comprobamos que efectivamente *C. graminicola* produce NO. Este no es el primer reporte de la producción de NO por parte de hongos pertenecientes a este género. Wang y Higgins describieron en 2005 mediante una combinación de técnicas de microscopía y farmacología que *C. coccodes* produce NO. Confirmada la producción de NO por parte de *C. graminicola*, nos planteamos entonces comprobar hasta qué punto la enzima NOS identificada en este organismo participa si es el caso en la producción de NO. Y para ello decidimos tratar de generar un mutante nulo en el gen codificador de la misma y llevar a cabo una caracterización funcional del mismo. A pesar del tiempo y esfuerzo dedicados a conseguir este objetivo, no fue posible obtener una cepa mutante deficiente en el gen de interés. Uno de los argumentos que barajamos para explicar las razones por las cuales no logramos obtener una cepa mutante de *C. graminicola* deficiente en el gen de la NOS es que quizás el gen resulte ser un gen esencial para el hongo. Es esta una explicación que no podemos descartar en esta fase de nuestro trabajo.

Es posible considerar también que no hayamos identificado un mutante entre los transformantes analizados porque el reemplazamiento génico (la doble recombinación homóloga) ocurre en *C. graminicola* con baja frecuencia y que todavía no se ha analizado un número suficientemente grande de transformantes. Cabe indicar en este contexto que nuestros compañeros del grupo de *Colletotrichum* que trabajan en nuestro laboratorio han llevado a cabo experimentos para la obtención de mutantes en genes de su interés y han detectado una tasa de recombinación homóloga para efectuar un reemplazamiento génico de alrededor del 2%. En el trabajo realizado por Weld *et al.* (2006) se plantea que la eficiencia de recombinación homóloga en hongos filamentosos puede variar mucho en función de la especie, la posición dentro del genoma de la secuencia diana y del nivel de homología entre las secuencias flanqueantes del gen que queremos reemplazar y aquellas que presentes en el vector de transformación. En nuestro trabajo hemos encontrado numerosos transformantes en los que identificamos recombinación homóloga sólo en las secuencias correspondientes a uno de los flancos del gen diana. Es decir, parece que la recombinación homóloga es frecuente, pero la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga entre regiones separadas por una distancia dada (la característica de los cassettes de expresión de resistencia a higromicina que manejamos) es muy poco frecuente o se encuentra altamente desfavorecida. Quizás sea una característica particular del sistema de *C. graminicola*. Sea cual sea la razón limitante, ciertamente en el curso de nuestro trabajo, y después de analizar más de 200 transformantes, no ha sido posible generar el mutante deficiente en el gen NOS de *C. graminicola* cuya caracterización consideramos que puede proporcionar información relevante sobre los mecanismos de producción de NO en microorganismos en general y en filamentosos en particular.

La consideración de las observaciones llevadas a cabo en *B. cinerea* y en *C. graminicola*, y la integración de esta información en el contexto de los trabajos realizados en otros sistemas, nos permite hacer algunas reflexiones y consideraciones que consideramos interesantes en relación con los mecanismos de producción de NO en microorganismos, en particular con la participación de posibles enzimas de tipo NOS animal.

Hemos mencionado en párrafos anteriores que la producción de NO ha sido descrita en numerosos sistemas vivos y las plantas no son la excepción. Su mecanismo de producción ha sido intensamente estudiado y pese a los enormes esfuerzos dedicados a este tema, ha sido imposible identificar una enzima tipo NOS en el reino vegetal. En *A. thaliana* se identificó una enzima que poseía ciertas similitudes bioquímicas con la enzima NOS de mamíferos pero cuyas secuencias genómicas no exhibían una homología significativa con aquellas (Guo *et al.*, 2003). La cepa mutante en el gen codificador de esta “nueva” enzima tipo NOS, denominado *Atnos1*, mostró una disminución en sus niveles de producción de NO pero posteriormente se demostró que el gen codificador de esta enzima (*AtNOS1*) no tiene actividad oxido nítrico sintasa y se le renombró como *AtNOA1* (Nitric Oxide Associated1; Zemojtel *et al.*, 2006).

Se ha establecido, sin embargo, que la producción de NO es consecuencia, al menos en condiciones aeróbicas, de la actividad de la enzima NR presente en el citoplasma que genera NO en el proceso de reducción del nitrato (Mur *et al.*, 2013). Numerosos estudios han determinado que las enzimas NR son las encargadas de producir NO implicado en funciones importantes de la planta como en la regulación de la apertura de los estomas (Srivastava *et al.*,

2009), el desarrollo de mecanismos de defensa inducidos por bacterias (Modolo *et al.*, 2005), supervivencia a diferentes tipos de estrés abióticos (Freschi *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009), el inicio de la floración (Seligman *et al.*, 2009) entre otras.

En bacterias se ha reportado la producción de NO mediante la oxidación de la L-arginina a L-citrulina con la participación de una enzima denominada bNOS. Estructuralmente estas enzimas carecen del dominio C-terminal reductasa, elemento esencial en la función de las enzimas NOS de mamíferos, por lo que existen ciertas dudas acerca de la habilidad de las bacterias en cuanto a la producción de NO mediada por esta enzima. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que en bacterias como *Bacillus subtilis*, existen ciertas moléculas como las flavodoxinas que realizan las funciones que le corresponderían al dominio C-terminal reductasa, si lo tuvieran, y que por lo tanto la síntesis de NO podría llevarse a cabo (Wang *et al.*, 2007). En este mismo contexto está enfocado el estudio presentado por Gusarov *et al.* (2008) en donde se determinó que la enzima bNOS utiliza reductasas celulares como donadores de electrones para producir NO *in vivo*. En el estudio presentado por Correa-Aragunde *et al.* (2013) se realizó una comparación entre la enzima tipo NOS convencional de animales y las enzimas NOS de procariontes. Los autores detectaron una ligera diversidad estructural muy limitada en el dominio N-terminal oxigenasa, observación que ellos sugieren pudiera significar que este dominio constituye el núcleo principal de las enzimas con actividad óxido nítrico sintasa. Es importante señalar que no se conoce a ciencia cierta las funciones de la enzima bNOS en bacterias (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2014).

Curiosamente, la estructura particular que presentan las enzimas bNOS descrita en el párrafo anterior, no es el único caso en el que se ha encontrado una enzima que presenta el dominio N-terminal oxigenasa característico de la enzima NOS de mamíferos pero que carece de su dominio C-terminal reductasa. En el hongo necrótrofo *Macrophomina phaseolina* se ha descrito muy recientemente una situación similar. En este caso el análisis bioinformático del genoma de *M. phaseolina* permitió detectar una secuencia de nucleótidos codificadora de una proteína que muestra homología estructural con la región carboxilo terminal de las enzimas NOS de mamíferos y que incluye una secuencia que muestra homología con el dominio “flavodoxin/nitric oxide synthase” y con el dominio “Ferredoxin reductase” característico de este tipo de enzimas (Sarkar *et al.*, 2014). Los autores llevaron a cabo un análisis bioinformático que incluyó un alineamiento de 22 secuencias de aminoácidos pertenecientes a organismos de diferentes grupos taxonómicos que poseen una enzima tipo NOS en su genoma y para complementar los resultados obtenidos en el alineamiento, realizaron un test de enriquecimiento de motivos. Con esta aproximación bioinformática, los autores lograron identificar secuencias y motivos característicos de los dominios funcionales del extremo carboxilo terminal de las proteínas NOS de mamíferos que también están presentes en algunas proteínas correspondientes de algunas especies de hongos, curiosamente, hongos necrótrofos entre ellos *C. graminicola* y *A. oryzae*. Analizando la secuencia aguas arriba en el genoma de *M. phaseolina* de la fase abierta de lectura que codifica esta proteína con los dominios “flavodoxin/nitric oxide synthase” y “ferredoxin reductase”, los autores encontraron una fase abierta de lectura que codifica una secuencia de aminoácidos con homología con el dominio “nitric oxide oxygenase” característico del extremo amino terminal de las enzimas de tipo NOS de mamíferos. Con estos resultados los autores finalmente concluyeron que los dominios C-

terminal reductasa y el N-terminal oxigenasa, están presentes en *M. phaseolina* pero que son codificados por ORFs diferentes.

En este trabajo se comprobó, además, que *M. phaseolina* produce NO, NO que es detectado *in vitro* dentro del micelio y en el medio de cultivo circundante, y que la adición de un inhibidor de la enzima NOS bloquea esta producción. Esta observación estaría indicando que el NO detectado en este hongo podría producirse mediante un mecanismo enzimático representado por una enzima tipo NOS. Sarkar *et al.* (2014) sugieren que la producción de NO puede efectuarse en este sistema aún a pesar de que los dominios característicos de las enzimas tipo NOS se encuentren en proteínas diferentes, ya que al estar presentes los cofactores y los sustratos correspondientes, se puede reconstituir la holoenzima activa. Constituiría ésta una situación similar a la descrita en los sistemas bacterianos considerados anteriormente en la que módulos proteicos codificados por genes diferentes interactúan en “trans” para generar o dar lugar a la formación de un complejo funcional que produce NO. Técnicamente, si este es el caso, la identificación del gen o genes implicados en la determinación de estos módulos es indudablemente mucho más compleja y difícil, en particular si el análisis se lleva a cabo considerando, *a priori*, que el objeto de la búsqueda es una proteína única con actividad NOS.

Si tenemos en cuenta las variaciones estructurales que presentan las enzimas bNOS y aquella enzima detectada en *M. phaseolina*, en comparación con la enzima NOS de mamíferos, podemos decir que este tipo de enzimas presentan una diversidad estructural que sugiere que no existe un esquema rígido en los hongos filamentosos para la producción de NO. Quizás en *B. cinerea* sea posible considerar una situación como la descrita. La determinación de los sistemas enzimáticos (y quizás no enzimáticos) responsables de la producción de NO en *B. cinerea* (y en otros hongos) sigue siendo objeto de nuestro trabajo.

## 2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL NO EN *B. cinerea* y *C. graminicola*

Desde su descubrimiento como un factor de relajación derivado del endotelio en animales, el NO ha demostrado ser una molécula muy versátil implicada en un sinnúmero de procesos en los organismos vivos. Las investigaciones relacionadas con el NO han dejado entrever el importante rol que tiene esta molécula como factor señalizador y regulador tanto en animales, plantas e incluso en hongos filamentosos, donde las observaciones llevadas a cabo en *B. cinerea* y *C. graminicola* recogidas y presentadas en la presente tesis doctoral, están enfocadas en el análisis de los efectos fisiológicos en los que el NO puede participar en este tipo de microorganismos.

A la luz de las investigaciones llevadas a cabo por Wang y Higgins (2005) en el hongo fitopatógeno *C. coccodes* en relación al efecto del NO en la germinación de las esporas de este microorganismo, nos planteamos determinar si existe un efecto regulador de la germinación por parte del NO similar en *B. cinerea* y *C. graminicola*. Con este objetivo, se llevaron a cabo una batería de experimentos diseñados para determinar, mediante una aproximación farmacológica, el efecto sobre germinación que el NO pudiera tener en ambos sistemas. Cabe mencionar que utilizamos al hongo *C. graminicola* como sistema paralelo por varias razones, entre las que podemos destacar el hecho de que *C. graminicola* es uno de los pocos hongos filamentosos en donde, mediante análisis bioinformáticos, se ha demostrado la existencia en su genoma de un gen ortólogo del gen codificador de la NOS de animales (Turrión-Gómez and Benito, 2011), sistema modelo de producción de NO por excelencia, y que por lo tanto, su utilización, nos permite llevar a cabo un análisis comparativo muy interesante. Además, en nuestro laboratorio contamos con colaboradores que posee una amplia experiencia en *C. graminicola*.

Nuestras observaciones, al igual que en el trabajo de Wang y Higgins (2005) en *C. coccodes*, mostraron que la adición de NO determina un retraso en la germinación de las esporas tanto de *B. cinerea* como de *C. graminicola*. Pero además, nuestros experimentos llevados a cabo con un secuestrador de NO y con un inhibidor de la enzima NOS, se ha observado que éstos producen el efecto contrario, es decir, una aceleración del proceso de germinación determinando un ligero adelanto de la germinación que nosotros detectamos como un aumento del porcentaje de esporas germinadas a los tiempos considerados en relación con la situación de no exposición a los fármacos. Es decir, los resultados obtenidos con fármacos que tienen efectos opuestos, por un lado aumentar la concentración de NO exógeno a la que el organismo está expuesto (donador de NO), o reducir la cantidad de NO endógeno que en principio el organismo produce y al que indudablemente está expuesto desde el mismo momento de su síntesis (un secuestrador de NO o un inhibidor de la NOS de animales), son coherentes y apuntan en la misma dirección: el NO tiene un efecto sobre germinación en los dos hongos que analizamos. Un efecto similar al que ha sido descrito en otros hongos (Wang and Higgins, 2005). Probablemente se trate de un efecto general en este grupo de organismos. La germinación de las esporas en hongos es un proceso morfogénico y de desarrollo clave y fundamental en el ciclo de vida de estos organismos. El estudio del metabolismo del NO en relación con estos procesos cobra entonces, creemos, una importancia fundamental.

Es interesante destacar que la participación del NO en procesos de desarrollo y morfogénesis se ha descrito en muy distintos sistemas, en particular en plantas (Beligni and Lamattina, 2000; Pagnussat et al., 2002, 2003; He et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Lee et al., 2008; Fernandez-Marcos et al., 2011; Giudice et al., 2011; Kwon et al., 2012). Nuestras observaciones cobran particular importancia si las cotejamos con resultados presentados en el trabajo de Wang et al. (2012), realizado bajo un contexto similar pero analizando procesos de desarrollo en la especie vegetal *Camellia sinensis*. Los autores de este trabajo estudian la participación del NO en la inhibición de la germinación del grano de polen por el frío y en el crecimiento del tubo polínico mediante una aproximación farmacológica para lo cual utilizan, al igual que nosotros, un secuestrador de NO, un donador de NO y un inhibidor de la enzima NOS. Basados en sus observaciones con el donador de NO, Wang et al. (2012) sugieren que el NO retrasa tanto la germinación del polen como el desarrollo del tubo polínico en *C. sinensis*. Como experimento complementario y para confirmar que el efecto de inhibición en la germinación del polen es debido al NO, ellos realizaron una exposición simultánea del polen al donador de NO, al secuestrador de NO y al inhibidor de la enzima NOS. Sus resultados muestran que el efecto inhibitorio del donador de NO en la germinación se minimiza en presencia del secuestrador de NO y del inhibidor de la enzima NOS, situación que indica que el NO es quien ejerce el retraso en la germinación del polen en *C. sinensis*. Cabe mencionar que en su caso, la exposición del polen al secuestrador de NO y al inhibidor de la enzima NOS en ausencia del donador de NO, situación comparable con nuestros experimentos en *B. cinerea* y *C. graminicola*, no tiene efectos en la germinación del polen y la elongación del tubo polínico.

Como mencionamos anteriormente, su trabajo está centrado en la germinación del grano de polen de esta planta en relación al frío. Este tipo de estrés abiótico supone, al igual que el NO, una reducción en la elongación del tubo polínico, reducción que se ve reforzada cuando al polen expuesto a condiciones de frío se le aplica el tratamiento con el donador de NO. Muy interesantes resultan también las observaciones realizadas en este estudio derivadas del tratamiento con el secuestrador de NO y el inhibidor de la enzima NOS a polen expuesto a condiciones de frío. Ambos fármacos promueven significativamente la germinación del polen que presenta de antemano un retraso en su germinación por efecto del frío. Es decir, tanto la eliminación del NO endógeno por parte del secuestrador de NO como el tratamiento con el inhibidor de la enzima NOS revierten el retraso en la germinación del grano de polen provocado por la exposición del mismo a condiciones de frío.

El hecho de observar los mismos efectos del NO en germinación en especies pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes, plantas y hongos, nos hace reflexionar sobre el papel regulador de esta molécula desde una perspectiva mucho más amplia y considerando su papel sobre procesos similares en organismos incluso de reinos diferentes. Aunque no ha sido posible hasta el momento identificar una enzima con actividad "NOS-like" propiamente dicha ni en hongos ni en plantas, las características bioquímicas descritas del sistema productor de NO y los efectos biológicos y señalizadores que tiene el NO en estos sistemas sugieren fuertemente que dicho sistema enzimático existe en estos dos grupos de organismos.



### 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN RESPUESTA A NO EN *B. cinerea*

En las fases iniciales de este trabajo de tesis doctoral nos propusimos analizar la producción y el metabolismo del NO en *B. cinerea* en relación con la regulación de procesos biológicos importantes en la fisiología del patógeno, en particular con la germinación de las esporas. En base a las observaciones derivadas de los experimentos enfocados en esta temática, hemos formulado una hipótesis que plantea que tanto la exposición a NO exógeno como la eliminación del NO endógeno generado por el propio patógeno deben producir cambios en los patrones de expresión génica que deben ser informativos de la naturaleza de los procesos y de las funciones fisiológicas en las que el NO participa en este microorganismo. Esta hipótesis se sustenta también en las reflexiones derivadas de trabajos previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, a partir de los cuales se ha propuesto que el papel del sistema de detoxificación de NO basado en la flavohemoglobina BCFHG1 debe ser considerado desde una perspectiva más global, específicamente su participación en la regulación de la germinación de las esporas de *B. cinerea*.

Para comprobar esta hipótesis planteamos la identificación de los factores genéticos implicados en los procesos fisiológicos en los que el NO participa mediante un análisis de expresión génica diferencial con microarrays en respuesta a la exposición a NO exógeno y a secuestradores de NO endógeno. Teniendo en cuenta los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio y los resultados obtenidos mediante la aproximación farmacológica propuesta, nos planteamos ocho condiciones experimentales que pudieran proporcionar respuestas a algunas de las incógnitas planteadas. Todas ellas se han ejecutado simultáneamente para recoger materiales que puedan ser utilizados en distintas comparativas en un futuro próximo. En el presente trabajo nos hemos centrado en el análisis de dos comparativas concretas que implican muestras biológicas de cinco condiciones o tratamientos diferentes, pero dado que se han recogido materiales sometidos a tratamientos homogéneos, será posible en el futuro comparar y analizar conjuntamente los resultados generados en nuestro análisis en este trabajo con los derivados de las comparativas que se realicen en el futuro.

En los párrafos siguientes les dedicaremos a cada comparativa la atención debida resumiendo y discutiendo los resultados generados. Como consideración previa es importante destacar que del análisis de reproducibilidad realizado con las 3 réplicas de las 8 condiciones que incluye nuestro diseño, se confirma que las réplicas realizadas para cada condición son verdaderas réplicas biológicas que generan datos reproducibles, por lo que es posible considerarlas totalmente válidas para llevar a cabo nuestro estudio de análisis de expresión génica diferencial propuesto sobre una base firme.

Dos de las condiciones establecidas y de las cuales hemos realizado el correspondiente análisis de expresión diferencial incluyen la cepa  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , deficiente en el gen codificador de la flavohemoglobina. Dado que el efecto sobre germinación es mucho más evidente en esta cepa mutante de *B. cinerea*, consideramos que resulta muy interesante su utilización para estudiar los efectos del NO teniendo en cuenta que se trata de un sistema desprovisto de su

sistema de detoxificación de NO y, por lo tanto, desprotegido. Asumimos que la sensibilidad a esta sustancia y a las condiciones de estrés nitrosativo que genera en el hongo se ve maximizada en este sistema, al no resultar enmascarados sus efectos por la línea de defensa natural que supone para el hongo la flavohemoglobina. Estos efectos a los cuales hacemos referencia y en los cuales nos encontramos particularmente interesados, se ponen de manifiesto nada más iniciar nuestro análisis de expresión diferencial. Y es que en la comparativa 5vs6vs7 (esporas de 5 horas de cultivo de la cepa mutante en el gen de la flavohemoglobina  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , expuestas y no expuestas a un donador de NO) se aplican inicialmente las condiciones estándar de análisis de expresión génica diferencial utilizadas en este tipo de análisis de expresión con microarrays, obteniéndose un listado muy numeroso, que incluye aproximadamente 6000 genes. Es este un número elevadísimo de genes que que complica el análisis de enriquecimiento funcional posterior. Pero en sí mismo es un dato ilustrativo, muy informativo del potentísimo efecto sobre expresión génica que tiene la exposición a NO de un sistema carente del mecanismo fundamental para su detoxificación.

Adicionalmente se analizó la comparativa 3vs4 (esporas de 5 horas de cultivo de la cepa silvestre B05.10 expuestas y no expuestas a NO), en la cual, como resultado de la búsqueda de genes diferencialmente expresados realizada aplicando condiciones menos restrictivas, se obtuvo una cantidad mucho menor de genes que en la comparativa 5vs6vs7. Este hecho nos permite confirmar que el acceso a la información acerca del posible papel señalizador del NO en la fase de germinación y de los mecanismos que puedan explicar el retraso en la misma que se observa cuando las esporas en germinación son expuestas a NO, se ve facilitado en un sistema desprotegido frente al NO, como es la cepa mutante deficiente en el gen de la flavohemoglobina  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ .

En cuanto al análisis de enriquecimiento funcional posterior llevado a cabo sobre las listas obtenidas, cabe destacar que cuando se llevó considerando conjuntamente los genes inducidos y los genes reprimidos, es decir, todos los genes que responden a NO como parte de una misma lista, la identificación de categorías funcionales enriquecidas no resultó informativa. La consideración simultánea de ambos tipos de genes desdibuja la imagen que puede derivarse de este análisis de enriquecimiento funcional. Sin embargo, una revisión manual de los listados obtenidos era indicativa de que algunos procesos biológicos parecían estar particularmente representados en los mismos, en particular si se analizaban de manera independiente los genes inducidos y los genes reprimidos. Se decidió entonces llevar a cabo el análisis de enriquecimiento funcional con las listas de genes inducidos y reprimidos por separado, es decir, en dos grupos diferentes en cada comparativa. De esta manera, efectivamente, se obtuvieron varias categorías funcionales enriquecidas que mencionaremos más adelante.

Una de las razones por las que comenzamos nuestro análisis con la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  se basa en las observaciones derivadas de la exposición de esporas de esta cepa a NO. En ella vemos no un retraso, sino un bloqueo en germinación, probablemente porque se maximizan los efectos del NO sobre los sistemas de regulación implicados en este proceso. En la lista de los genes inducidos por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (6vs5) aparecen como categorías funcionales enriquecidas las relacionadas con la regulación de la utilización del nitrógeno. Nos llama particularmente la atención un par de genes: BoFuT4\_P026640.1 y

BoFuT4\_P055410.1. Ambos están relacionados con la familia nmr-A, un regulador transcripcional negativo implicado en la modificación post-traduccional del factor de transcripción AreA. Este factor de transcripción ha sido descrito en el sistema modelo de hongos ascomicetes, *A. nidulans*, en el que está implicado en el control transcripcional del sistema de asimilación de nitrato en este microorganismo (Kudla *et al.*, 1990). Varios autores sugieren que el factor transcripcional AreA no solamente está implicado en la expresión de genes pertenecientes al metabolismo del nitrato sino que es un regulador positivo de la expresión de genes que codifican para permeasas y otras enzimas catalíticas encargadas de reclutar fuentes alternativas de nitrógeno, como nucleótidos, aminoácidos y amidas (Caddik *et al.*, 1994; Scazzocchio, 2000).

Investigaciones sobre la respuesta transcripcional de *A. nidulans* relacionada con la asimilación de nitrato han revelado que los genes codificadores de flavohemoglobinas (*fhbA* y *fhbB*) están co-regulados con los genes implicados en la asimilación de nitrógeno (Schinko *et al.*, 2010). Otros sistemas de detoxificación han sido identificados como regulados por menadiona, como la tiorredoxina, proteína reportada como factor regulador del estrés oxidativo y nitrosativo en los patógenos *Cryptococcus neoformans* (Missall and Lodge, 2005) y *Ascochyta rabiei* (Singh *et al.*, 2012); y en *A. thaliana*, se ha encontrado un cDNA correspondiente al compuesto fructosa 1-6 bifosfatasa (FBF), principal objetivo del sistema de la tiorredoxina, inducido por un donador de NO (Polverari *et al.*, 2003). En este mismo contexto, se reportó en el hongo fitopatógeno *Histoplasma capsulatum* que el gen *NOR1*, cuya secuencia guarda similitud con el gen de *Fusarium oxysporum* P450nor implicado en la detoxificación de RNS, está inducido por el tratamiento con NO (Nittler *et al.*, 2005). También encontramos genes relacionados con la detoxificación de NO en otros patógenos de humanos como el hongo *Candida albicans* y la bacteria *Salmonella Typhimurium*. En el primero se reportó al gen que codifica la flavohemoglobina *YHB1* como el gen más inducido en un estudio sobre la respuesta transcripcional de este microorganismo a NO (Hromatka *et al.*, 2005). En el segundo, se identificó al represor transcripcional que actúa como sensor de NO y controla la expresión del gen que codifica para la flavohemoglobina *hmp* como un gen que se inactiva en presencia de NO incluso a bajas concentraciones y que por consiguiente reprime la expresión del gen *hmp* (Karlinsky *et al.*, 2012). En el organismo modelo *S. cerevisiae* se ha reportado la inducción de un set de genes en respuesta a la exposición a NO, entre los cuales se encuentra un gen codificador de una flavohemoglobina *YHB1* (Sarver and DeRisi, 2005). Además en este estudio se determinó que el factor de transcripción Fzf1 regula una respuesta inducida por estrés nitrosativo en este microorganismo.

El análisis manual de la lista de genes inducidos en respuesta a NO en esta comparativa indica que son muy numerosos los productos génicos relacionados con procesos redox que figuran en la misma. Esta observación es indicativa de la alteración del estado redox de la célula que determina la exposición a NO en un sistema que no detoxifica NO. Precisamente el gen que muestra un mayor nivel de inducción en estas condiciones es un gen codificador de una enzima Glutation S-transferasa (GST), el gen BoFuT4\_P057260.1 (BC1G\_10073.1 en la anotación del Broad Institute para la cepa B05.10). Las enzimas GST son enzimas multifuncionales, presentes en todos los organismos, muy importantes en el metabolismo celular, sobre todo en procesos de detoxificación de compuestos tóxicos y en respuesta a estrés oxidativo (Hayes *et al.*, 2000; Balogh *et al.*, 2008). La grandísima sobreexpresión de este

gen en ausencia del principal sistema de detoxificación de NO nos hace pensar en la importancia de esta proteína frente al estrés nitrosativo. Tal función de una proteína para la que en principio se suponía sólo una actividad detoxificadora y de resistencia a estrés oxidativo nos lleva a considerar el estudio en profundidad de su posible papel e importancia en el metabolismo del NO en *B. cinerea*. Es esta una línea de investigación que nos proponemos abordar en el futuro.

Por otra parte, en la lista de genes reprimidos por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  (5vs6), todas las categorías funcionales obtenidas como enriquecidas en este caso están relacionadas con ciclo celular y síntesis de ADN, aunque sólo dos de ellas (“Replicación de ADN” y “Nucleolo”) superan el límite considerado como aceptable para reconocer a una categoría funcional como enriquecida. El resto de categorías funcionales encontradas son: “Fase de ciclo celular”, “Fase M”, “Procesos de ciclo celular”, “Ciclo celular mitótico”. De forma similar, encontramos varios términos GO relacionados con ADN y reparación de ADN (“Unión de ADN”, “Reparación de mismatch”, “Unión a ADN de doble cadena”). Como podemos comprobar todas ellas tienen relación o están incluidas en las dos categorías funcionales encontradas como las que presentan un enriquecimiento propiamente dicho en esta comparativa.

El hecho de que los genes encontrados como reprimidos por NO en una cepa deficiente en el sistema de detoxificación de NO estén relacionados con estas categorías sugiere que existe una relación entre exposición a NO exógeno y regulación de ciclo celular, proceso vital en todos los sistemas vivos cuya regulación ha sido un tema extensamente documentado en organismos modelo como *S. cerevisiae*, lo que facilita, en parte, el estudio del efecto que podría tener el NO en la regulación de dicho proceso. Además de contar con organismos modelo como el anteriormente mencionado, se conoce que tanto el ciclo celular propiamente dicho como su regulación son procesos que se encuentran muy conservados en los seres vivos por lo que toda la información obtenida a partir de ellos constituye una base realmente útil en el estudio del ciclo celular en el resto de organismos vivos, en este caso específico, en *B. cinerea*.

Llama nuestra atención el hecho de que en este listado de genes reprimidos encontremos genes adscritos a, o relacionados con, procesos característicos de cada una de las etapas que componen el ciclo celular (G1, S, G2 y M). Esto supone que en nuestro sistema experimental a las 6 horas de cultivo en agitación el programa de germinación ciertamente se ha disparado y que, tratándose de esporas (y tubos germinativos) de naturaleza multinucleada las divisiones de los distintos núcleos se produzcan de forma no sincrónica.

Se conoce desde hace mucho tiempo que el ciclo celular es un conjunto de procesos en los que participan numerosos genes cuya expresión determina la correcta ejecución y desarrollo ordenado de cada una de las fases del ciclo celular, razón por la cual es un proceso altamente regulado. Dicha regulación es muy compleja y en buena medida depende de la actividad de CDK1 (Ciclin dependent Kinase, siglas en inglés), para lo cual interactúa con 9 diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular (Enserink y Kolodner, 2010). Vale la pena mencionar que las ciclinas son las subunidades catalíticas reguladoras que forman parte de las

quinasas, las cuales son las proteínas reguladoras por excelencia del ciclo celular (Evans *et al.*, 1983).

En la lista de genes reprimidos por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , aquellos que presentan los niveles más altos de represión son un grupo muy particular de genes cuyos productos codificados forman parte del complejo hexamérico MCM. Seis de las proteínas codificadas por estos genes y que conforman este complejo (Mcm2-Mcm7) han sido identificadas en *S. cerevisiae* y están altamente conservadas entre los organismos vivos. Estas proteínas interactúan unas con otras para formar el complejo antes mencionado que tiene un papel fundamental en el inicio de la síntesis de ADN en los orígenes de replicación (Chong *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1993) y su expresión está regulada por el factor de transcripción Mcm1. Además, se ha reportado que cuando el complejo MCM inactivo es fosforilado por la kinasa Cdc7-Dbf4, éste sufre un cambio conformacional que lo convierte en una helicasa enzimáticamente activa cuya estructura permite su asociación con el ADN (Tye and Sawyer, 2000). El hecho de que los genes del cluster MCM sean los que presenten un nivel de represión muy alto, permite sugerir que en las condiciones experimentales analizadas, y como consecuencia de la exposición a NO, no se van a poder formar orígenes de replicación funcionales para que la síntesis y replicación de ADN pueda llevarse a cabo, dado que los ORC no podrían reclutar dicho complejo. Esta observación indicaría que en la cepa mutante, después de la exposición a NO probablemente la eficiencia del progreso del ciclo celular en los distintos núcleos de la espora en germinación progresa más lentamente y probablemente a expensas de los productos génicos de los genes MCM traducidos antes de la exposición a NO. Esta situación no ha sido evaluada, pero forma parte de la batería de experimentos que nos proponemos abordar en fechas próximas. Pero en esta línea apuntan las observaciones llevadas a cabo al tratar de valorar la germinación y de estimar el número de núcleos a lo largo del proceso de germinación cuando la cepa mutante es expuesta a NO desde los momentos iniciales del establecimiento del cultivo. En estas condiciones se observa un bloqueo de germinación y ausencia total de división nuclear, lo cual es coherente con nuestra reflexión ya que si no hay síntesis y replicación de ADN, porque los genes MCM están reprimidos, no es posible iniciar el proceso de división celular. No debemos perder de vista el hecho de que *B. cinerea* es un organismo multinucleado y que por lo tanto es muy posible que la división nuclear no ocurra de manera sincrónica en todos los núcleos de la espora en germinación.

Otros genes encontrados en la lista de genes que se reprimen en condiciones de exposición a NO codifican productos relacionados con la formación del huso acromático y del kinetocoro. Entre ellos encontramos al gen BofuT4\_P032680.1, que codifica la proteína del kinetocoro ndc80, implicada en el mecanismo que asegura la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular. Si durante la progresión de las etapas iniciales del ciclo celular esta proteína detecta cromosomas que no están alineados correctamente, provoca una parada a nivel de metafase hasta que éstos se coloquen en la posición correcta (Chen *et al.*, 1997). Otro gen encontrado que participa en procesos relacionados es el gen BofuT4\_P069680.1, que codifica el componente cnd2 del complejo de la condensina, proteína que tiene un papel central en el ensamblado y segregación de los cromosomas en las células eucariotas. Este componente, o subunidad cnd2, tiene un papel doble: participa tanto durante

la interfase como en la condensación de los cromosomas que ocurre durante la mitosis (Aono *et al.*, 2002).

Otros genes identificados son los relacionados con la fase de mitosis propiamente dicha, entre los que podemos mencionar BofuT4\_P118800.1, que codifica para la subunidad Cut9 del complejo promotor de la anafase denominado también ciclosoma (APC/C, Anaphase promoting complex/cyclosome, por sus siglas en inglés) (Yamada *et al.*, 1997). La función principal de este complejo es la de desencadenar la transición de metafase a anafase mediante la identificación de proteínas específicas para su degradación, dado que el complejo es básicamente una enzima ubiquitina ligasa E3, como las ciclinas (Murray *et al.*, 1989; Félix *et al.*, 1990).

Interesante resulta el hecho de que otro grupo de genes pertenecientes al listado de genes reprimidos por NO son los que codifican para proteínas de checkpoint, como el gen BofuT4\_P077740.1, que codifica una quinasa de serina y treonina denominada bub1 que se une al kinetocoro y tiene un papel central como proteína checkpoint relacionada con el establecimiento del huso mitótico (Roberts *et al.*, 1994).

Finalmente podemos mencionar a 3 genes diferencialmente expresados que forman parte de la categoría funcional “Nucleolo”, una de las dos categorías detectadas como enriquecidas por el paquete informático MGSA entre los genes reprimidos por NO en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ . El primero es el gen BofuT4\_P011760.1, que codifica una proteína con un dominio Sda1, identificada en *S. cerevisiae* como una proteína altamente conservada y esencial para la viabilidad de las células. Su inactivación o eliminación produjo el arresto de la célula en la fase G1 (Buscemi *et al.*, 2000). El segundo gen es BofuT4\_P007900.1, que codifica una proteína def (Digestive organ expansión factor), la cual ha sido reportada por Chen *et al.* (2005) como proteína que guarda relación con el factor de transcripción p53, que regula ciclo celular y apoptosis en respuesta a varios tipos de estrés ambiental. El tercero y último gen es BofuT4\_P070420.1 que codifica la proteína ytm1, la cual es una de las 17 proteínas que tienen un papel central en la organización de otro tipo de moléculas necesarias para la biogénesis de ribosomas (Miles *et al.*, 2005).

Como podemos comprobar, todos los genes de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  reprimidos por NO descritos anteriormente cumplen funciones importantes relacionadas con procesos que se suscitan en las distintas fases del ciclo celular. Pero destaca un gen que llamó particularmente nuestra atención debido al papel fundamental que cumple dentro del proceso de división celular y porque además, presenta una nivel de represión importante, razones por las cuales le dedicamos un estudio más detallado.

Se trata del gen BofuT4\_P118300.1, anotado como un gen que codifica una proteína similar a la denominada “M-phase inducer phosphatase” de *S. cerevisiae*. Este gen es el ortólogo de Cdc25 en *S. pombe* y Mih1 en *S. cerevisiae* y es el encargado de defosforilar y activar a Cdk1 (Cdc2 en *S. pombe*) para que la célula pueda pasar de la fase G2 a la fase M (mitosis) (Dunphy and Kumagai, 1991).

La actividad de Cdk1 resulta de su nivel de fosforilación en Y19 como resultado del balance de la actividad quinasa de Swe1 (Booher *et al.*, 1993) y de la actividad fosfatasa de

Cdc25 (Russell *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta este balance se deduce que los niveles de Cdc25 modulan los niveles de Cdk1 activa, situación que limita el progreso del ciclo celular y que por lo tanto podría explicar el paro en germinación de las esporas del mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  en respuesta a NO detectado en nuestros experimentos.

Se ha mencionado anteriormente que la regulación del ciclo celular es un proceso muy conservado en los organismos eucariotas y que la información obtenida a partir del organismo modelo *S. cerevisiae* puede proporcionar un marco de trabajo muy útil en otros sistemas en los que el nivel de caracterización de estos procesos es más limitado. En nuestro caso, hemos podido comprobar que el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de cdc2 de *S. cerevisiae*, reconoce una única proteína y del tamaño esperado en *B. cinerea*. Por esta razón hemos decidido utilizar el anticuerpo anti-cdc2 fosforilado (Y19) de este organismo para determinar los niveles de la proteína cdc2 de *B. cinerea* en su forma fosforilada, tanto en la cepa silvestre VeE2.1 como en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , y tanto en ausencia como en presencia de un donado de NO. Los resultados del experimento llevado a cabo con este objeto indican que no existe un efecto directo del NO en la actividad de Cdc25, ni en la cepa silvestre ni en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , ya que no detectamos variaciones significativas en los niveles de cdc2 fosforilada a lo largo del tiempo (ventana de germinación) en ninguna de las condiciones analizadas. Este resultado nos sorprendió en un principio por varias razones. En primer lugar, porque se ha reportado que cuando existe daño en el ADN, y la exposición a NO puede causar daño en ADN, puede haber un incremento en los niveles de fosforilación de Cdk1, o lo que es lo mismo una disminución en su forma defosforilada activa, lo que culminaría en un paro en ciclo celular en humanos para minimizar la incorporación de mutaciones en el ADN (Blasina *et al.*, 1999). Por otra parte, en *S. pombe* se ha descrito que la exposición a un donador de NO provoca un retraso en el ciclo celular mediado por la activación del mecanismo de checkpoint en la transición G2/M. Este retraso en mitosis es consecuencia de una regulación postranscripcional de la actividad de Cdc25 por nitrosilación que determina que en condiciones de exposición a NO exógeno cdc2 sea retenida fundamentalmente en su forma fosforilada inactiva (Majumdar *et al.*, 2012). La consecuente disminución de la forma activa de cdc2 determina el retraso en mitosis. Teniendo en cuenta estas observaciones y además, la observación derivada de nuestro análisis de expresión diferencial según la cual el nivel de expresión de cdc25 disminuye muy notablemente en respuesta a la exposición a NO, esperábamos detectar un aumento de la cantidad de cdc2 fosforilada, inactiva, en respuesta a la exposición a NO. Pero no ha sido así y ha sido posible detectar este aumento de cdc2 en forma fosforilada. Esto quiere decir que en *B. cinerea* el efecto del NO sobre síntesis de ADN, división nuclear y ciclo celular es independiente de cdc2. Es interesante destacar, que durante el proceso de germinación en la cepa silvestre, así como en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$ , no se observan variaciones significativas de los niveles de cdc2. Valorar el significado de estas observaciones ciertamente exigirá en el futuro importantes esfuerzos de investigación.

En el trabajo realizado por Tomko *et al.* (2009) se explica una situación parecida en células humanas y que podría ayudarnos a comprender lo que puede estar ocurriendo. Ellos reportaron que el estrés nitrosativo inhibe la síntesis de ADN con un efecto asociado a la pérdida de función de Cdc25A (Cdc25 en *S. pombe*) pero que no guarda relación con los niveles de éste o de Cdk2. Además, ellos observaron que la inhibición de la síntesis de ADN mediada por estrés nitrosativo no activaba los mecanismos de checkpoint específicos de la fase S del

ciclo, lo que supondría que las células pueden continuar con el ciclo a pesar de que los errores (inhibición de la síntesis de ADN) no hayan sido corregidos. Este fallo en la activación de los mecanismos de checkpoint se debe, según indican los autores, a una supresión de la iniciación de estos mecanismos en respuesta a los efectos del estrés nitrosativo provocado en las células. Esto quiere decir que cuando exista un fallo durante la progresión del ciclo celular, específicamente por exposición a estrés nitrosativo, éste podría pasar desapercibido al no activarse los mecanismos de checkpoint, con consecuencias graves en los organismos vivos. En nuestro caso, al no detectar acumulación de Cdk1 fosforilada, no quiere decir que no exista daño en el ADN sino que podría suceder lo mismo que en lo descrito por Tomko *et al.* (2009). Lo que podemos sacar como principal conclusión en cuanto a nuestro estudio de la proteína cdc25 en *B. cinerea*, es que al parecer el bloqueo en germinación, muy evidente en la cepa mutante deficiente en su sistema de detoxificación de NO, no depende de la actividad de Cdk1 ya sea porque los sistemas de checkpoint fallan, situación muy probable dado que en nuestros listados de genes inducidos por NO encontramos genes que codifican proteínas de checkpoint como BofuT4\_P077740.1 o BofuT4\_P122160.1, o porque se activan otros mecanismos desconocidos hasta el momento que permiten solventar los efectos que puede provocar el NO en la progresión del proceso de división celular.

Nuestro análisis de expresión diferencial continúa con la comparativa entre esporas en germinación de la cepa silvestre expuestas y no expuestas a NO (3vs4). En esta comparativa encontramos un número de genes mucho más reducido que en la comparativa descrita anteriormente, lo que indica, como hemos comentado anteriormente, que la flavohemoglobina BCFHG1 modula de forma muy notable los efectos a nivel de alteración de la expresión génica que tiene la exposición a NO en la cepa tipo silvestre. Ciertamente, BCFHG1 tiene un papel protector frente a condiciones de estrés nitrosativo, en donde los efectos a nivel de expresión génica que se producen como consecuencia de la exposición a NO, son mucho más atenuados por la acción de la flavohemoglobina, sistema eficiente de detoxificación de NO en *B. cinerea*.

La búsqueda de genes diferencialmente expresados en esta comparativa se realizó en condiciones menos restrictivas que en la comparativa 5vs6vs7. Estas comparativas proporcionaron también resultados informativos, aunque más difíciles de valorar e interpretar, en este caso sobre el efecto del NO en la fisiología de las esporas en germinación de *B. cinerea*. Cabe destacar que el número de genes identificados, aunque se relajaron las condiciones del análisis, es reducido (unos 100 genes inducidos y otros tantos reprimidos). Y en ambas categorías, una parte muy significativa de genes carecen de información adicional en relación con anotaciones sobre su función. La información a nuestra disposición, por lo tanto, es más limitada. Pero sí es posible obtener elementos de información de interés. Dado que no fue posible detectar enriquecimiento funcional en esta comparativa utilizando herramientas bioinformáticas, como las utilizadas anteriormente, llevamos a cabo un análisis particularizado de la lista de genes inducidos y de la lista de genes reprimidos por NO. De esta manera, en la lista de genes reprimidos se encontró que aproximadamente un 32% codifican proteínas relacionadas con desarrollo, división celular y reparación de ADN.

Dentro de los genes relacionados con desarrollo destacamos a dos de ellos que se encuentran entre los que presentan los niveles más altos de represión: BofuT4\_P059630.1 y BofuT4\_P025990.1. Estos no presentan una función determinada pero se encuentran incluidos



en la categoría GO denominada “Mycelium development”, categoría particularmente interesante en el contexto de nuestro trabajo y su identificación abre una posible línea de investigación. Otro gen incluido en esta categoría es BofuT4\_P131730.1, que codifica para el factor de transcripción bhlh, denominado así por la presencia de un dominio estructural bhlh (basic hélix loop hélix, por sus siglas en inglés), que caracteriza una familia de factores de transcripción relacionadas con morfogénesis en hongos, levaduras y mamíferos (Ferré-D’Amare *et al.*, 1993; Ellenberger, 1994; Ma *et al.*, 1994). El gen BofuT4\_P160020.1 codifica una proteína denominada “Neurogenic locus notch like protein 2”, que funciona como un receptor de membrana y está implicado en diversos procesos durante el desarrollo en humanos (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Hemos mencionado que también encontramos en las listas de genes reprimidos por NO a un grupo relacionado con división celular y reparación de ADN. Estas observaciones son coherentes con las observaciones derivadas de análisis de expresión diferencial en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1 \alpha 7.2$  entonces, en un sistema desprotegido frente a estrés nitrosativo, el efecto sobre la fisiología de la espora se maximiza y esto determina un efecto muy notable sobre expresión génica, detectándose un gran número de genes relacionados con división celular y reparación de ADN. En un sistema que sí posee un mecanismo de detoxificación de NO, este efecto se ve modulado. No hay bloqueo de germinación, pero sí retraso. El desarrollo se ve afectado, pero en menor medida. Y se detectan genes reprimidos relacionados con estos procesos, pero en menor número, y con variaciones en los niveles de expresión menores. Hablaremos a continuación un poco sobre los genes de estas categorías que son detectados.

El gen BofuT4\_P114250.1 codifica una proteína en donde se ha identificado el dominio BRCT (BRCA1 C Terminus). Las proteínas que presentan este dominio están implicadas en los sistemas de checkpoint del ciclo celular que se activan cuando detectan daño en el ADN (Miki *et al.*, 1994). Este gen encajaría en nuestras listas de la comparativa 3vs4 tanto dentro del grupo de división celular como del de reparación de ADN. Varios genes codifican proteínas relacionadas con el kinetocoro, elemento esencial del ciclo celular implicado en la distribución espacial de los cromosomas. Entre ellos podemos mencionar a BofuT4\_P057410.1, que codifica una proteína que presenta el complejo mis12-mtw1, que junto con los complejos NDC80 y KNL1, forman lo que se denomina “el sistema KMN”, núcleo del sitio de unión de los microtúbulos (Cheesman *et al.*, 2006). Los genes BofuT4\_P088470.1 y BofuT4\_P089100.1 también codifican para proteínas del kinetocoro, aunque su anotación no presenta mayor especificación. Otro gen relacionado con ciclo celular es BofuT4\_P127320.1, que codifica una proteína con un complejo SAGA, inicialmente descrito como una histona, pero que en el transcurso de diversas investigaciones, ha probado estar formando parte de numerosos procesos como regulación de la estabilidad de las proteínas, mantenimiento de los telómeros, todas ellas implicadas en desarrollo (Koutelou *et al.*, 2010).

En el grupo de genes relacionados con reparación de ADN encontramos dos representantes: BofuT4\_P117550.1, que codifica una proteína implicada en el mecanismo de reparación de las roturas dobles en el ADN (double-strand break repair, DSBR), que constituye el daño de ADN más peligroso dado que puede dar cabida a reordenamientos cromosómicos (Hoeijmakers, 2001), y BofuT4\_P124100.1, que codifica para una proteína genérica implicada en organización de los cromosomas y reparación de ADN.

En la lista de genes inducidos en esporas de la cepa silvestre expuestas a NO, encontramos una situación particular: más de un 10% de aquellos genes de los cuales tenemos alguna información sobre su función, codifican para factores de transcripción. Sabemos que el NO tiene un papel señalizador en sistemas vivos (Marshall *et al.*, 2000; Pineda-Molina *et al.*, 2001; Polverari *et al.*, 2003; Meiser *et al.*, 2011; Meiser and Bauer; 2012). En concentraciones fisiológicas el NO señala y modula la expresión génica, y esta señalización y este efecto sobre expresión génica tiene lugar en gran medida mediada por factores de transcripción que responden a NO. Estas concentraciones fisiológicas de NO derivan del balance entre producción y detoxificación en la célula. Pero es a concentraciones fisiológicas de NO a las que el NO desempeña una función esencialmente señalizadora regulando numerosos procesos (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2012). En concentraciones elevadas de NO se manifiestan con claridad su toxicidad y las alteraciones que se producen en el contexto de las modificaciones del estado redox celular, que determinan diversas disfunciones en la célula. En nuestro sistema, en la cepa silvestre de *B. cinerea* y en la comparativa que llevamos a cabo con esporas en germinación expuestas y no expuestas a NO, el análisis de expresión génica diferencial es indicativo de que el sistema natural de detoxificación de NO basado en BCFHG1 es capaz de mantener los niveles de NO a los que es efectivamente expuesto el entorno celular del hongo en niveles que no determinan una toxicidad evidente ni una alteración del estado redox importante. No se detectan cambios de expresión génica indicativos de que así sea. Pero sí detectamos cambios de expresión génica compatibles con un efecto señalizador que puede resultar intensificado en relación con la situación control de no exposición a NO exógeno. Detectamos, en efecto, varios genes codificadores de factores de transcripción cuya expresión aumenta en respuesta a NO. Los niveles de inducción no son muy elevados, generalmente entre 1X y 2X. Cabe reflexionar y preguntarse si cambios pequeños en los niveles de expresión de factores de transcripción pueden dar lugar a efectos reguladores más o menos notables y a fenotipos apreciables. En este contexto debemos destacar que con frecuencia un factor de transcripción dado puede regular la expresión de grupos de genes, a veces numerosos, y que cambios reducidos en el nivel de expresión de un factor de transcripción dado puede suponer alteraciones significativas de los procesos que controlan.

Se han identificado concretamente seis factores de transcripción cuyos genes muestran un aumento en los niveles de expresión en nuestro análisis en respuesta a NO. Cinco de ellos son factores de transcripción cuyo análisis preliminar basado en la anotación automática del genoma propone que forman parte de la superfamilia de factores de transcripción de tipo dedo de zinc binuclear, el tipo más abundante y frecuente en hongos (Shelest, 2008). En primer lugar nombramos a aquel que muestra el mayor nivel de inducción: el gen BoFuT4\_P053120.1, seleccionado para llevar a cabo un análisis funcional y cuyos resultados discutiremos más adelante. Los cuatro genes restantes codificadores de factores de transcripción de este tipo encontrados como inducidos por NO son BofuT4\_P009990.1, BofuT4\_P077280.1, BofuT4\_P104380.1 y BofuT4\_P112110.1. En este tipo de factores de transcripción, el dominio dedo de zinc binuclear está unido a una cadena de seis residuos de cisteína, razón por la que se le denomina Zn<sub>2</sub>/Cys<sub>6</sub>. Esta estructura fue inicialmente caracterizada en la proteína GAL4 de *S. cerevisiae* (Pan and Coleman, 1994) y hasta el momento ha sido identificada exclusivamente en hongos. En un estudio realizado en el hongo patógeno de garbanzo *Ascochyta rabiei*, se ha reportado como uno de los tipos de factores de

transcripción que responden a estrés oxidativo y nitrosativo (Singh *et al.*, 2012). Además se ha reportado que este tipo de factores de transcripción regulan una gran variedad de procesos celulares, como en el hongo *A. nidulans*, en el cual se ha descrito su participación en el metabolismo del azúcar y de aminoácidos (Gomez *et al.*, 2002), gluconeogénesis y respiración (Todd *et al.*, 1998) y en la regulación del metabolismo secundario (Fernandes *et al.*, 1998). Otros estudios han reportado que este tipo de factores de transcripción regula el desarrollo del cuerpo fructífero en *Sordaria macrospora* (Masloff *et al.*, 1999) y la utilización de nitrógeno en *N. crassa* (Feng and Marzlug, 1996). El sexto gen codificador de un factor de transcripción es BofuT4\_P063840.1 y fue identificado por el sistema de anotación automática como un “Fungal specific transcription”. Este dominio ha sido descrito en el tipo de factores de transcripción Zn2/Cys6 localizado siempre aguas abajo del dominio dedo de zinc binuclear, que tiende a localizarse cerca del extremo N-terminal. Cabe mencionar que aún se cuestiona que este “fungal specific transcription factor” pueda actuar como un dominio independiente (Shelest *et al.*, 2008). En *B. cinerea* se han descrito este tipo de factores de transcripción en las dos cepas que han sido secuenciadas: B05.10 presenta 136 y T4 presenta 194 genes con esta anotación. Sin embargo hasta el momento no se ha realizado el estudio funcional de ninguno de estos genes codificadores de factores de transcripción con este dominio, por lo que el estudio del gen BoFuT4\_P063840.1 sería importante para saber cuales son los procesos que regula y si éste está directa o indirectamente implicado en respuesta a estrés nitrosativo por parte del hongo.

En los párrafos anteriores se vislumbra el panorama general de los procesos fisiológicos que pueden verse afectados por NO exógeno en nuestras condiciones experimentales, observaciones que pueden, a su vez, proporcionar información sobre los procesos fisiológicos regulados por NO durante la fase de germinación de *B. cinerea*. Para obtener información específica de dichos procesos nos planteamos realizar el análisis funcional de forma individualizada de dos genes: en primer lugar el gen BoFuT4\_P059630.1, que aparece asociado al término GO “mycelium development” en nuestro análisis, categoría funcional directamente relacionada con los procesos en los que estamos interesados, y que además es el gen que presenta el nivel más alto de represión en respuesta a NO en nuestro análisis, y en segundo lugar el gen BoFuT4\_P053120.1, uno de los genes codificadores de factores de transcripción, concretamente uno de los que presenta mayor nivel de inducción. En la siguiente sección discutiremos los resultados derivados del análisis funcional llevado a cabo con mutantes por reemplazamiento génico de los dos genes seleccionados.

#### 4. ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES *BcNor2* y *Bcmd1*

El análisis funcional de los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1 propuesto, se realizó en base a los criterios generales descritos para este tipo de estudios de caracterización funcional. El objetivo del mismo es obtener información acerca de la función que las proteínas codificadas por cada gen puedan tener de acuerdo a las alteraciones fenotípicas que los mutantes puedan manifestar. El gen BofuT4\_P059630.1 (*Bcmd1*) está adscrito al término GO “mycelium development” por lo que es factible considerar que su función puede estar relacionada con procesos de desarrollo. El análisis *in silico* no aporta evidencias funcionales directas de ningún tipo, y no existen estudios previos en genes ortólogos relacionados. Consideramos entonces que su caracterización supondrá una base para iniciar la determinación y la caracterización de su función y de los mecanismos en los cuales la proteína deducida puede estar implicada. El gen BofuT4\_P053120.1 (*BcNor2*) codifica un factor de transcripción cuya expresión se induce en respuesta a NO y cabe la posibilidad de que el hongo aumente su expresión como parte de los mecanismos de defensa que activa frente a condiciones de estrés nitrosativo. Caracterizarlo podría indicar si en efecto está implicado en la respuesta a condiciones de estrés nitrosativo en hongos.

Como primera parte de la caracterización propuesta se realizó un análisis del crecimiento saprofito en medio MEA. Los datos del diámetro de la colonia se registraron a las 72, 96 y 120 horas. La tendencia es la misma en todos los tiempos considerados. A efectos de comparación, se tomó en cuenta los datos a las 96 horas dado que es el tiempo en el que se aprecian mejor las diferencias entre cepas. Teniendo esto en cuenta se observó que tanto los mutantes en el gen BofuT4\_P059630.1 como aquellos en el gen BofuT4\_P053120.1 crecen entre un 10%-15% menos que la cepa Control 1. Esto podría significar que el gen eliminado en cada caso, uno que codifica a un factor de transcripción y el otro que al parecer está relacionado con desarrollo, es necesario para el crecimiento normal del hongo. No es una reducción muy evidente pero ciertamente es importante y debe ser tenida en cuenta. Además, en relación a esta observación cabe mencionar que se realizó un análisis de germinación de las 4 cepas mutantes en el cual se observó una reducción en el porcentaje de germinación de las esporas de estas cepas (datos no presentados). Este análisis se realizó una sola vez y no se incluyó en el presente trabajo dado que no se pudieron confirmar los resultados con repeticiones del experimento. Pero los resultados preliminares apuntan en la misma línea que aquellos obtenidos en el análisis de crecimiento saprofito descrito en la parte superior de este párrafo.

Una vez determinada la capacidad de crecimiento saprofito de cada cepa mutante analizada, se procedió a la caracterización de las mismas en relación a distintos tipos de estrés. La sensibilidad a estrés nitrosativo de las cepas mutantes se analizó mediante la exposición a SNP, un donador de NO utilizado en un gran número de estudios relacionados con este tipo de estrés en distintos organismos (Delledone *et al.*, 1998; Poverari *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 20005, 2012; Wang and Higgins, 2005; Planchet and Kaiser, 2006; Piterková *et al.*, 2012; Sing *et al.*, 2012; Scheler *et al.*, 2013). De igual manera que para la determinación del crecimiento saprofito de las cepas mutantes en relación a la cepa Control 1, se tomaron datos a las 72, 96 y 120 horas; pero a efectos de comparación entre las cepas se tomaron en cuenta los datos de

los diámetros de las colonias obtenidos a las 96 horas. Así pudimos observar que ninguna de las cepas mutantes analizadas, ni las cepas deficientes en el gen BofuT4\_P059630.1 ni aquellas en las cuales se eliminó el gen BoFuT4\_P053120.1, muestran un aumento en su sensibilidad a estrés nitrosativo mediado por SNP. La reducción en el diámetro de la colonia que puede apreciarse en alguna de ellas es equivalente a la reducción detectada en el crecimiento saprofítico de la cepa mutante en cuestión en medio MEA en ausencia de cualquier agente químico, por lo que dicha reducción no sería efecto de la mutación. Este resultado nos sorprendió notablemente porque los genes escogidos para este análisis funcional forman parte de la colección de genes que responden a NO derivada del análisis de microarray propuesto y del cual discutimos en la sección anterior. Teniendo en cuenta este panorama, cabe la posibilidad de que ninguno de estos dos genes participe de forma directa en la respuesta del hongo frente a las condiciones de estrés nitrosativo impuestas por el donador de NO.

La sensibilidad a estrés oxidativo de las cepas mutantes se determinó mediante la exposición a dos agentes químicos: menadiona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas dos sustancias, al igual que el SNP, se utilizan para crear una situación de estrés oxidativo en una gran cantidad de investigaciones en esta línea (Schumacher *et al.*, 2008, 2014; Singh *et al.*, 2012). Los datos de los diámetros de la colonia a las 96 horas de las cepas mutantes en los dos genes, BofuT4\_P059630.1 y BoFuT4\_P053120.1, en comparación con el diámetro de la cepa Control 1, indican que ninguna cepa mutante muestra alteraciones en la sensibilidad en relación al estrés oxidativo impuesto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pero la situación de las cepas mutantes en relación con el agente químico menadiona es diferente. Todas las cepas mutantes analizadas muestran una hipersensibilidad al estrés oxidativo determinado por el radical superóxido (liberado por menadiona). Este radical forma parte de los ROS (radicales libres derivados del oxígeno) y al combinarse con el NO forma el compuesto estable peroxinitrito (Mur *et al.*, 2006), compuesto que además de contribuir a la disminución de la biodisponibilidad del NO en los organismos vivos interrumpiendo así el cumplimiento de sus numerosas funciones (Stamler, 1994; Mignorance *et al.*, 2009), contribuye a la inactivación de sistemas de protección frente a estrés oxidativo como el mediado por la enzima Mn-SOD (Van der Loo B. *et al.*, 2000). Se ha reportado también que el peroxinitrito puede actuar sobre toda proteína susceptible de experimentar la nitrosilación de sus residuos de tirosina y cisteína, alterando su funcionalidad (Santhanam *et al.*, 2007). Estos argumentos parecen justificar en parte la hipersensibilidad de las cepas mutantes en genes que responden a NO.

En la caracterización de cepas mutantes de *B. cinerea* llevada a cabo por Schumacher *et al.* (2008) en donde se ha utilizado la menadiona para determinar condiciones de estrés oxidativo, se ha visto que las cepas mutantes deficientes en el gen que codifica para el factor de transcripción Crzy1, son insensibles a la exposición a este agente químico. Si bien este gen no ha sido estudiado porque responda a NO, sí que está relacionado con crecimiento y respuesta a estrés por parte del hongo, lo que en alguna medida nos indica que los genes que estamos analizando tengan alguna relación con la capacidad del hongo para contrarrestar los efectos fisiológicos que el radical superóxido pueda generar en ellos. Por otro lado, otro estudio realizado por los mismos autores en un gen de *B. cinerea* que codifica un factor de transcripción que responde a la luz, *BcLTF1*, y en el que también se ha utilizado menadiona para determinar su sensibilidad a estrés oxidativo, la situación es la contrario: las cepas mutantes son hipersensibles al estrés mediado por el radical superóxido derivado de la

menadiona (Schumacher *et al.*, 2014). Los hongos, como el resto de organismos vivos, tienen que defenderse de los efectos adversos de la luz. Si sus sistemas de detección de la misma fallan, como en el caso de los mutantes en el gen que codifica el factor de transcripción BcLTF1 que responde a la luz, y se encuentran enfrentados a condiciones de estrés oxidativo, se crea un desbalance entre producción/detoxificación de ROS que les impide su crecimiento. Teniendo estos argumentos en cuenta podemos sugerir que así como el gen codificador del factor de transcripción BcLTF1 es necesario para la respuesta de *B. cinerea* a condiciones de estrés oxidativo, tanto el gen BoFuT4\_P053120.1, codificador de un factor de transcripción y como el gen BofuT4\_P059630.1, codificador de un gen posiblemente implicado en desarrollo, son necesarios para que el hongo pueda desarrollarse en condiciones de estrés oxidativo.

La sensibilidad a estrés osmótico de nuestros mutantes se analizó mediante la exposición de las mismas y de la cepa Control 1 a NaCl y Sorbitol. Los datos del diámetro de la colonia de todas las cepas que se utilizaron para su análisis comparativo correspondían a las 96 horas de crecimiento como en los casos anteriores. Se observó que tanto las cepas mutantes en el gen BoFuT4\_P053120.1 como aquellas en el gen BofuT4\_P059630.1, son medianamente sensibles al estrés osmótico impuesto por el NaCl. En relación al estrés osmótico mediado por Sorbitol, las diferencias de crecimiento de las cepas mutantes en comparación con la cepa Control 1 son más reducidas que las obtenidas en presencia de NaCl aunque suficientes para determinar que las cepas mutantes son mínimamente sensibles a estrés osmótico determinado por Sorbitol.

Llama la atención que los resultados obtenidos del análisis de la sensibilidad a estrés osmótico en nuestras cepas mutantes en genes que responden a NO coincidan con los resultados descritos para las cepas mutantes en el gen que codifica el factor de transcripción BcLTF1 que responde a luz, es decir, que estos últimos también son sensibles a condiciones de estrés osmótico (Schumacher *et al.*, 2014). Otro dato interesante viene dado por el fenotipo presentado por las cepas mutantes deficientes en el gen que codifica para el factor de transcripción Crzy1, mencionadas anteriormente y descritas como insensibles a menadiona. Estas cepas mutantes son también insensibles a condiciones de estrés osmótico, tanto mediado por NaCl como por Sorbitol. Dado el fenotipo presentado por las cepas mutantes, objeto de esta caracterización, en relación a condiciones de estrés osmótico, es posible sugerir que los genes BoFuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1 están implicados en la habilidad del hongo para contrarrestar los efectos de este tipo de estrés.

Finalmente se analizó la agresividad en las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  en comparación con la cepa Control 1 a las 96 h.p.i. Los datos obtenidos de las lesiones en hojas de judía indicaron que el diámetro medio de lesión en las cepas mutantes  $\Delta BcNor2$  y  $\Delta Bcmd1$  es significativamente menor que el diámetro presentado por la cepa Control 1, y que esta reducción es mayor que la que cabría esperar derivada exclusivamente de su menor capacidad de crecimiento saprofito. Este hecho indica que los procesos en los que participan los productos génicos codificados por estos dos genes participan en los mecanismos que hacen que *B. cinerea* infecte y colonice eficientemente los tejidos del huésped, aunque por el momento no disponemos de información sobre el modo concreto en el que se puede producir esta participación. No obstante, puesto que estos dos genes responden a NO, es posible

proponer que existe una relación entre el NO y su metabolismo y la capacidad del patógeno para sobrevivir *in planta*.

En este análisis el comportamiento de las dos cepas mutantes analizadas en uno y otro gen es ligeramente diferente. Eso supone un inconveniente para la determinación de una conclusión sólida derivada de este análisis aunque creemos que de forma general las indicaciones que se derivan de su consideración son válidas. En cualquier caso, se están ampliando estas caracterizaciones en los aspectos indicados con el objeto de tener una base estadística más amplia.

Reuniendo todas nuestras observaciones y acotaciones sobre la caracterización de las cepas mutantes en los genes BofuT4\_P053120.1 y BofuT4\_P059630.1, hay un factor en común que salta inmediatamente a la vista: las 4 cepas mutantes analizadas en este estudio muestran esencialmente el mismo comportamiento, es decir, presentan el mismo fenotipo, en todas las condiciones analizadas: crecimiento saprofito, sensibilidad a distintos tipos de estrés y capacidad de infección.

Reflexionando sobre este particular, y no descartando que pueda tratarse de una coincidencia o de un artefacto, resulta tentador proponer como posibilidad el hecho de que el gen BofuT4\_P059630.1 (*Bcmd1*), gen “relacionado” con “desarrollo de micelio”, pudiera estar bajo el control del factor de transcripción codificado por el gen BofuT4\_P053120.1 (*BcNor2*). Sería posible abordar este aspecto aplicando distintas estrategias, en particular un análisis de expresión detallado en el mutante deficiente en el factor de transcripción codificado por el gen *BcNor2* evaluando la expresión del gen *Bcmd1*. Este análisis está previsto en un futuro inmediato en nuestro grupo de investigación, pero lamentablemente no ha podido ser abordado en el espacio temporal de la presente tesis doctoral.

## 5. SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *Bcfhg1* EN *B.cinerea*

Para abordar el estudio de las funciones fisiológicas del NO en *B. cinerea* (y en *C. graminicola*), y teniendo en cuenta que en ambos organismos ha sido posible demostrar la producción de NO de forma endógena, hemos considerado desde un principio que puede proporcionar información relevante tanto la evaluación del efecto que pueda tener la adición de NO exógeno como la caracterización de los efectos derivados de la eliminación del NO que el propio patógeno pueda producir. La mayor parte de nuestros esfuerzos, antes de iniciar este trabajo de tesis doctoral y durante la realización de la misma, se han centrado en el estudio de los efectos del NO exógeno, en parte condicionados por el hecho de que sabemos que el patógeno interacciona con organismos que responden a su presencia activando mecanismos que, entre otras cosas, generan NO al que el patógeno tendrá que hacer frente. Aunque la capacidad de detoxificar de NO no es factor de patogenicidad en *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010), hemos comprobado que juega un papel protector fundamental frente a condiciones de estrés nitrosativo y que ciertamente contribuye a modular los niveles de NO que el patógeno enfrenta en cada momento. En este contexto cobran especial importancia las observaciones derivadas de nuestro trabajo que demuestran que el NO exógeno tiene un efecto sobre el desarrollo muy importante. Pero no sólo el NO exógeno. Éste probablemente se suma al NO endógeno que el patógeno produce y de la suma de ambos se deriva su acción, retrasando la germinación. Este efecto ha sido tratado con cierta profundidad en esta tesis doctoral. Pero además hemos visto que la utilización de secuestradores de NO y de inhibidores de la NOS indican que la modulación de los niveles de NO endógeno también afecta a la germinación, ya que la presencia de aquellos acelera la germinación. Esta aproximación farmacológica ofrece resultados coherentes con aquellos derivados de los estudios con NO exógeno y su efecto sobre germinación.

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los efectos del NO endógeno, y además del estudio de los efectos de los secuestradores de NO y de inhibidores de la NOS, nos hemos planteado llevar a cabo un análisis de expresión génica en esporas en germinación de la cepa silvestre B05.10 cuando, una vez disparado el programa de germinación, éstas son expuestas a cPTIO. Los materiales han sido preparados, pero el análisis de expresión génica diferencial no ha sido llevado a cabo todavía. Desafortunadamente no ha sido posible asumir las tareas derivadas de esta comparativa en este trabajo de tesis doctoral, pero ciertamente podemos esperar que del estudio de esta situación se derivará información de interés que ampliará la información derivada del estudio de los efectos directos de estos agentes químicos sobre germinación.

En esta misma línea, se ha planteado una aproximación genética para el estudio de los efectos del NO endógeno que complemente a la anterior y basada en la sobreexpresión del gen *Bcfhg1* en *B. cinerea*. El patrón de expresión de este gen es indicativo de una posible participación de BCFHG1 en la germinación. Se ha descrito que el gen *Bcfhg1* no se expresa en absoluto en esporas en estado de reposo, presenta un nivel basal en esporas activadas y 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) para posteriormente decaer a niveles basales de expresión en la fase de desarrollo y crecimiento del micelio (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).



Para determinar la sobreexpresión de *Bcfhg1* se generó una fusión con el promotor del gen *BcactA*, promotor constitutivo de expresión fuerte. Y esta fusión ha sido introducida en *B. cinerea* por transformación. Entre los transformantes obtenidos se han seleccionado mediante análisis Southern 6 transformantes representativos de los distintos tipos de integración que pueden producirse del plásmido transformante en el genoma de la cepa receptora. No ha sido posible completar la caracterización molecular y fisiológica de estos transformantes, que incluirá la determinación del número de copias de la fusión de sobreexpresión, la cuantificación de los niveles de expresión de *Bcfhg1* a lo largo del desarrollo y la evaluación de la germinación.

Es plausible asumir, no obstante, que una sobreexpresión del gen *Bcfhg1* determine un aumento de la actividad de detoxificación de NO por parte del hongo y, por lo tanto, una mayor eliminación del NO que el propio patógeno produce durante su desarrollo. Si así es, es posible anticipar que el efecto de sobreexpresar el gen codificador de la enzima flavohemoglobina BCFHG1 sea similar al que determina la utilización de un secuestrador de NO, es decir, una germinación más temprana. Sobre estos aspectos trabajará nuestro grupo de investigación en el futuro inmediato.



# CONCLUSIONES

---



Las conclusiones de la presente tesis doctoral se resumen en los siguientes puntos:

1. Los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *C. graminicola* producen NO, producción detectada mediante técnicas basadas en fluorescencia.
2. En *C. graminicola* existe una enzima NOS homóloga a las enzimas tipo NOS de mamíferos. El intento fallido de generar una cepa mutante sugiere la posibilidad de que el gen resulte esencial para el hongo, si bien no puede descartarse la posibilidad de que no haya sido posible debido a la baja tasa de recombinación homóloga que exhibe este microorganismo.
3. El NO exógeno retrasa la germinación en *B. cinerea* y en *C. graminicola*, y la eliminación del NO endógeno acelera la germinación en ambos microorganismos. La modulación de los niveles de NO influencia la germinación en *B. cinerea* y en *C. graminicola*.
4. La exposición a NO exógeno de la cepa tipo silvestre en la fase de esporas en germinación determina una alteración reducida en el patrón de expresión génica global de *B. cinerea*, tanto en el número de genes que se ven afectados como en el nivel de inducción o represión que en estos se observa. El análisis de carácter individualizado aplicado a los genes cuya expresión se vio alterada por la exposición a NO en la cepa silvestre, indica que los genes reprimidos en estas condiciones están relacionados con desarrollo de micelio, división celular y reparación de ADN. En cuanto a los genes inducidos, se encuentran principalmente genes que codifican factores de transcripción.
5. El análisis funcional del gen *BcNor2*, codificador de un factor de transcripción de tipo Zn(II)Cys<sub>6</sub>, y del gen *Bcmd1*, codificador de una proteína relacionada con el término GO “desarrollo del micelio” sugiere que los dos genes están relacionados con desarrollo. Además, ambos genes están implicados en la respuesta de *B. cinerea* frente al estrés oxidativo mediado por el radical superóxido (liberado por menadiona), y en menor medida tanto al estrés osmótico mediado por Sorbitol como al estrés salino mediado por NaCl. Por otra parte, las cepas mutantes de ambos genes presentan una disminución significativa en su capacidad de infectar a la planta huésped en comparación con la cepa Control 1.
6. La exposición a NO exógeno determina un retraso en germinación en la cepa tipo silvestre y un bloqueo total en la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ , deficiente en el sistema de detoxificación de NO basado en la enzima flavohemoglobina BCFHG1.
7. La exposición a NO de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ , determina alteraciones muy notables en los niveles de expresión en una fracción importante del genoma, reflejadas principalmente en la represión de genes pertenecientes a las categorías funcionales de replicación de ADN, actividad del nucléolo y ciclo celular. La presencia de BCFHG1 en *B. cinerea*, que protege al patógeno frente a estrés nitrosativo, atenúa enormemente esta respuesta. El análisis de enriquecimiento funcional indica que el principal efecto causado por la exposición a NO en la cepa  $\Delta Bcfhg1$  es una parada de ciclo celular en las fases tempranas del mismo como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ADN. Esta inhibición justifica la ausencia de división nuclear observada y explica el bloqueo en la germinación de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$ . En cuanto a los genes

inducidos en estas condiciones, se encontraron enriquecidas aquellas categorías funcionales pertenecientes a "utilización de nitrógeno" y a la "regulación de la utilización de nitrógeno".

8. El análisis de enriquecimiento funcional demuestra que la exposición a NO de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  determina la represión de un gen ortólogo en *B. cinerea* de *cdc25*. El estudio de su papel en relación con la parada de ciclo celular observada en la germinación de la cepa mutante  $\Delta Bcfhg1$  en presencia de NO, indica que el bloqueo del ciclo celular es independiente de *cdk1*.
9. Derivados de la transformación de *B. cinerea* con el plásmido para la sobreexpresión de la flavohemoglobina, *pBcfhg1OV*, se dispone de una serie de transformantes portadores de la fusión génica de sobreexpresión que serán caracterizados en relación con su capacidad para detoxificar NO y en relación con posibles alteraciones en el patrón de germinación de las esporas de *B. cinerea*.

# ANEXOS

---





**Anexo 1.** Listado de los 207 genes cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO en esporas en germinación de la cepa *ΔBcfhg1 α7.2* obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 5vs6vs7. Los genes resaltados en verde son aquellos relacionados con la regulación de la utilización de nitrógeno y los resaltados en turquesa son los relacionados con actividad oxidoreductasa.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN	TÉRMINO GO	Log FOLD CHANGE	P-VALUE
BofuT4_P057260.1	Protein		7,08	6,27E-11
BofuT4_P089950.1	Isoflavone reductase family protein	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:regulation of nitrogen utilization	6,74	8,40E-11
BofuT4_P153230.1	prolyl aminopeptidase		6,58333333	2,10E-11
BofuT4_P059750.1	NA		6,22	5,26E-09
BofuT4_P076590.1	NA		6,2	6,44E-08
BofuT4_P130070.1	Alcohol zinc-	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:zinc ion binding   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	5,80666667	6,27E-11
BofuT4_P111750.1	Zinc-binding oxidoreductase	MF:zinc ion binding   MF:oxidoreductase activity	5,64333333	3,92E-07
BofuT4_P106770.1	Benzoate 4-monooxygenase cytochrome	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	5,36666667	1,19E-05
BC1G_15848.1	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase		5,21666667	1,63E-07
BofuT4_P059170.1	NA	BP:transmembrane transport	5,17	2,80E-09
BofuT4_P050370.1	NA		5,07666667	1,52E-05
BofuT4_P018210.1	NA		5,01	4,62E-05
BofuT4_P068340.1	Cyanide hidratase	MF:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds   BP:nitrogen compound metabolic process   MF:cyanide hydratase activity	5	3,79E-06
BofuT4_P051860.1	NA	MF:ATP binding   CC:cytoplasm   MF:nucleic acid binding   BP:translation   MF:nucleotide binding   MF:alanine-tRNA ligase activity   BP:alanyl-tRNA aminoacylation   BP:tRNA aminoacylation   MF:ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds	4,98666667	2,94E-07
BC1G_06809.1	Predicted protein		4,90666667	3,34E-09
BofuT4_P033220.1	NA	MF:binding	4,87	5,28E-05

BofuT4_P149280.1	Protein	BP:metabolic process   MF:carbon-sulfur lyase activity	4,81666667	2,10E-11
BC1G_16127.1	Acetylcholinesterase precursor		4,74	2,67E-08
BC1G_09939.1	Predicted protein		4,69	0,0001068
BC1G_15490.1	Bifunctional p-450:nadph-p450 reductase		4,63333333	1,51E-06
BofuT4_P120270.1	Tsa family protein	MF:oxidoreductase activity   BP:cell redox homeostasis   MF:antioxidant activity	4,61	4,42E-08
BofuT4_P062610.1	Aliphatic nitrilase	MF:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds   BP:nitrogen compound metabolic process	4,61	0,00010174
BofuT4_P037450.1	NA		4,57666667	8,25E-08
BofuT4_P131840.1	Hypothetical protein		4,5	1,46E-06
BofuT4_P111760.1	C6 finger domain-containing protein	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	4,48666667	1,24E-08
BofuT4_P018200.1	NA	MF:hydrolase activity   BP:lipid metabolic process   MF:hydrolase activity, acting on ester bonds	4,43666667	5,89E-07
BC1G_08995.1	Predicted protein		4,42333333	1,47E-06
BofuT4_P131120.1	Alpha beta hydrolase	MF:hydrolase activity	4,41	6,09E-06
BC1G_02063.1	Predicted protein		4,38333333	7,29E-07
BofuT4_P059550.1	NA		4,37333333	0,00026594
BofuT4_P032210.1	NA	BP:transmembrane transport	4,35666667	3,44E-07
BofuT4_P009380.1	Hypothetical protein		4,28	1,89E-07
BofuT4_P056690.1	Beta-lactamase family protein		4,25666667	2,79E-10
BofuT4_P109360.1	Isochorismatase hydrolase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process	4,25	6,65E-08
BofuT4_P030660.1	NA	MF:heme binding   MF:iron ion binding   BP:response to oxidative stress   CC:peroxisome   MF:catalase activity   BP:hydrogen peroxide catabolic process	4,23	1,14E-05
BC1G_00914.1	Predicted protein		4,22333333	4,96E-06
BofuT4_P026640.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:regulation of nitrogen utilization	4,21666667	0,00016464

B3BC_116_202_B11	NA		4,21333333	0,0099229
BC1G_14013.1	Predicted protein		4,18666667	2,98E-05
BofuT4_P138790.1	NA		4,18	1,58E-07
BofuT4_P004670.1	Heat shock protein 16	BP:response to stress   BP:response to cAMP	4,17	8,93E-06
BC1G_02204.1	Predicted protein		4,13	0,00042
B1BC_045_012_A10	NA		4,10333333	2,14E-06
BofuT4_P102940.1	Alpha beta superfamily	MF:hydrolase activity	4,08333333	4,28E-07
BC1G_14678.1	Peptidase family t4 protein		4,07333333	4,33E-07
BofuT4_P130320.1	Umta methyltransferase family protein		4,06333333	1,32E-07
BofuT4_P069020.1	NA		4,01	0,00025183
BC1G_01908.1	NA		3,99666667	7,19E-08
BC1G_10815.1	Predicted protein		3,99666667	2,04E-05
BC1G_15489.1	Protein		3,99333333	7,65E-07
BC1G_13115.1	Alcohol dehydrogenase		3,98666667	1,86E-09
BofuT4_P098170.1	Fad binding domain-containing protein		3,97666667	1,32E-07
BofuT4_P089860.1	Hypothetical protein		3,97	1,16E-06
BofuT4_P016740.1	Carnosine synthase 1	MF:catalytic activity   MF:ATP binding	3,96	4,28E-06
BofuT4_P061550.1	NA		3,95666667	6,93E-05
BofuT4_P130460.1	C-3 sterol dehydrogenase c-4 decarboxylase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:steroid biosynthetic process   MF:3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase activity	3,94666667	9,62E-07
B3BC_116_213_E08	Predicted protein		3,94333333	4,52E-08
BC1G_06979.1	Fad binding domain-containing protein		3,94	3,11E-08
BofuT4_P156060.1	Hypothetical protein		3,93666667	0,0016471
BofuT4_P030980.1	NA		3,92333333	4,28E-07
BC1G_07611.1	Signal peptide-containing protein		3,89	4,60E-05

BofuT4_P131850.1	Predicted protein		3,88	1,12E-07
BC1G_06537.1	Vacuolar atp synthase 16 kda proteolipid subunit		3,87666667	4,18E-06
BC1G_11940.1	Predicted protein		3,86666667	1,79E-05
BofuT4_P107720.1	Mfs transporter	BP:transmembrane transport	3,86	1,74E-06
AL115602	NA		3,85333333	0,00052992
BofuT4_P136100.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   CC:intracellular   MF:binding   MF:oxidoreductase activity   MF:structural constituent of ribosome   CC:ribosome   BP:translation	3,84333333	1,21E-08
BofuT4_P023870.1	NA	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:tetracycline:hydrogen antiporter activity   BP:response to antibiotic   BP:tetracycline transport	3,84333333	4,62E-05
BC1G_13101.1	Predicted protein		3,83666667	9,15E-06
BC1G_16408.1	Abc multidrug transporter		3,83	1,89E-07
BofuT4_P061820.1	NA		3,82666667	2,99E-07
BC1G_14755.1	Predicted protein		3,82666667	3,47E-05
BofuT4_P126620.1	Aflatoxin biosynthesis ketoreductase nor-1	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,80666667	1,16E-06
BofuT4_P161830.1	Oxidoreductase -	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:regulation of nitrogen utilization	3,8	0,00183654
BofuT4_P012360.1	Aldo-keto reductase	MF:oxidoreductase activity	3,78666667	5,71E-06
BofuT4_P076650.1	NA		3,78	2,73E-06
BofuT4_P073310.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:oxidoreductase activity   MF:FMN binding	3,77666667	1,74E-07
BofuT4_P077390.1	Vacuolar calcium ion transporter h(+) exchanger	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport	3,77	3,03E-07
BC1G_15960.1	hypothetical protein		3,77	0,00014211
BC1G_14938.1	Predicted protein		3,76	1,26E-07
BofuT4_P062590.1	Predicted protein		3,75	0,00172525

BofuT4_P130300.1	Hypothetical protein		3,73333333	1,82E-05
BcA1_3471_B16	NA		3,72666667	2,79E-05
BofuT4_P116350.1	Hypothetical protein		3,71666667	0,00029853
BofuT4_P009070.1	Similar to methyltransferase	CC:membrane	3,69	1,35E-09
BofuT4_P066950.1	Hypothetical protein		3,68	2,69E-06
BofuT4_P131860.1	Hypothetical protein		3,67666667	5,15E-09
BofuT4_P106780.1	Hypothetical protein	CC:integral to membrane   MF:prenyltransferase activity	3,67666667	4,20E-05
BofuT4_P014560.1	Predicted protein		3,67666667	4,74E-05
B1BC_045_048_A02	Hypothetical protein		3,65333333	8,93E-06
BofuT4_P002010.1	Hypothetical protein		3,64666667	0,00687651
B4BC_116_261_B06	NA		3,64333333	0,00734198
BofuT4_P068210.1	Alcohol dehydrogenase	MF:zinc ion binding   MF:oxidoreductase activity	3,64333333	3,59E-07
B1BC_045_051_H02	Sam-dependent methyltransferase		3,63666667	2,52E-06
BofuT4_P100840.1	Metallo-beta-lactamase domain	MF:hydrolase activity	3,63666667	2,63E-06
BofuT4_P002110.1	Prolyl aminopeptidase		3,63	0,00101418
BofuT4_P018000.1	NA		3,61666667	0,00692329
BofuT4_P092250.1	Laccase 3	MF:oxidoreductase activity   CC:extracellular region   MF:copper ion binding   BP:lignin catabolic process	3,59666667	5,42E-05
BofuT4_P080730.1	NA	BP:metabolic process   MF:N-acetyltransferase activity	3,59333333	1,58E-05
BofuT4_P006000.1	Proline permease	MF:transferase activity   CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   CC:membrane   BP:transport   BP:amino acid transport   MF:amino acid transmembrane transporter activity	3,59	0,00053833
BC1G_15681.1	Hypothetical protein		3,58666667	2,73E-06
BofuT4_P086020.1	Nonribosomal peptide synthetase partial	MF:binding   MF:transferase activity   BP:biosynthetic process	3,58666667	2,46E-05
BofuT4_P132310.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,58	1,33E-07
BofuT4_P039780.1	Predicted protein		3,58	9,55E-07

BofuT4_P089850.1	Protein		3,58	1,02E-06
BC1G_16106.1	Hypothetical protein		3,58	1,40E-06
BofuT4_P032160.1	NA		3,56	4,38E-06
BofuT4_P055410.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:regulation of nitrogen utilization	3,54333333	2,35E-08
BofuT4_P076610.1	NA	MF:protein disulfide oxidoreductase activity   CC:outer membrane-bounded periplasmic space	3,51	2,94E-07
BofuT4_P035310.1	NA		3,51	1,33E-06
BofuT4_P069010.1	NA		3,51	0,00153846
BofuT4_P136480.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,5	4,86E-08
BofuT4_P162700.1	Hypothetical protein		3,49	0,00028451
BofuT4_P031730.1	NA		3,48666667	0,00044615
BofuT4_P139860.1	Hypothetical protein		3,48333333	1,01E-05
BofuT4_P083930.1	Chromosome segregation protein smc		3,48333333	3,42E-05
BC1G_05204.1	Predicted protein		3,47333333	0,00016978
BofuT4_P119120.1	Nadh:flavin oxidoreductase nadh oxidase family protein	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:oxidoreductase activity   MF:FMN binding	3,47333333	3,55E-05
BofuT4_P072490.1	NA	MF:zinc ion binding   MF:nucleic acid binding	3,45666667	0,00013347
BofuT4_P033720.1	NA	MF:hydrolase activity	3,45333333	8,37E-07
BofuT4_P014550.1	Hypothetical protein		3,45	3,40E-05
BofuT4_P112290.1	Valacyclovir	MF:hydrolase activity	3,45	7,03E-05
BofuT4_P053760.1	NA	BP:transmembrane transport	3,44666667	1,21E-06
BofuT4_P063830.1	Mfs dha1 multidrug resistance protein	BP:transmembrane transport	3,44333333	4,72E-06
BofuT4_P061540.1	NA	BP:metabolic process   MF:N-acetyltransferase activity	3,43	9,52E-08
BofuT4_P056930.1	Hypothetical protein		3,42333333	3,35E-06
BC1G_09081.1	Predicted protein		3,42	3,01E-05

BofuT4_P042420.1	7alpha-cephem-methoxylase p8 chain related protein	MF:transferase activity   BP:mycelium development	3,41333333	1,93E-06
BC1G_14011.1	Predicted protein		3,41	1,84E-06
BofuT4_P056570.1	Protein		3,39666667	4,00E-08
BofuT4_P035500.1	NA	BP:L-phenylalanine catabolic process   BP:tyrosine metabolic process   MF:homogentisate 1,2-dioxygenase activity	3,39666667	4,20E-05
BofuT4_P111470.1	Acyl- n-acyltransferase	BP:metabolic process   MF:N-acyltransferase activity	3,39333333	2,64E-06
BC1G_14093.1	Predicted protein		3,38666667	0,00030542
BofuT4_P000610.1	Hypothetical protein		3,37333333	1,09E-06
BofuT4_P003670.1	Acetyltransferase	BP:metabolic process   MF:N-acyltransferase activity	3,37333333	2,59E-05
BofuT4_P039490.1	Hypothetical protein		3,37	1,24E-08
BC1G_10090.1	Predicted protein		3,36333333	0,00025265
BofuT4_P075960.1	NA	MF:iron ion binding   MF:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen   MF:L-ascorbic acid binding	3,36333333	0,0017192
BofuT4_P086010.1	Zinc-binding dehydrogenase family	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:zinc ion binding   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,36333333	0,00077844
BofuT4_P076160.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   BP:regulation of nitrogen utilization	3,35666667	5,32E-06
BofuT4_P106820.1	Hypothetical protein		3,33666667	6,40E-06
BC1G_05692.1	Predicted protein		3,33333333	1,81E-06
BC1G_03189.1	Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase		3,33333333	2,51E-06
BC1G_07296.1	Amidohydrolase family protein		3,33333333	0,00011573
BofuT4_P017970.1	NA		3,33333333	0,000277
BC1G_14254.1	Fad binding domain containing protein		3,32666667	0,00010642
BofuT4_P027070.1	NA	MF:catalytic activity	3,32	6,09E-06
BofuT4_P092230.1	Hypothetical protein		3,3	8,57E-06

BofuT4_P076630.1	NA	MF:catalytic activity	3,29666667	0,00037607
BofuT4_P014140.1	Hypothetical protein		3,28666667	0,00013619
BofuT4_P114540.1	Predicted protein		3,27666667	9,84E-06
BofuT4_P095030.1	Hypothetical protein		3,26	6,07E-07
BofuT4_P018680.1	NA		3,26	0,00061372
BC1G_00913.1	Predicted protein		3,25	2,59E-05
BofuT4_P108290.1	Mfs sugar transporter	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:substrate-specific transmembrane transporter activity   CC:membrane   BP:transport   MF:transporter activity	3,24	1,32E-07
BofuT4_P039500.1	Hypothetical protein		3,24	0,00010547
BofuT4_P014990.1	Hypothetical protein		3,23666667	0,00017714
BofuT4_P090010.1	Mfs transporter	BP:transmembrane transport	3,23	0,00603905
BofuT4_P123430.1	Phenazine biosynthesis-like	MF:catalytic activity   MF:ATP binding   CC:cytoplasm   BP:translation   MF:nucleotide binding   BP:biosynthetic process   BP:tRNA aminoacylation for protein translation   MF:aminoacyl-tRNA ligase activity	3,21666667	6,45E-08
BofuT4_P013140.1	Hypothetical protein		3,21666667	3,36E-05
BofuT4_P136590.1	NA		3,21666667	0,00018166
BC1G_03214.1	Predicted protein		3,20666667	9,62E-07
BofuT4_P055790.1	NA		3,2	0,00033628
BC1G_12186.1	Predicted protein		3,19666667	2,14E-06
BofuT4_P136920.1	NA		3,19333333	9,32E-08
BC1G_07502.1	Predicted protein		3,17333333	2,11E-05
BofuT4_P102020.1	Mitochondrial carrier	MF:binding   CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   CC:membrane   BP:transport	3,17	2,75E-07
BofuT4_P104710.1	Hypothetical protein		3,17	2,92E-06
BofuT4_P119380.1	Nad dependent epimerase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:coenzyme binding   BP:cellular metabolic process	3,16333333	8,80E-08



BofuT4_P059830.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:zinc ion binding   MF:binding   MF:transferase activity   MF:oxidoreductase activity   MF:phosphopantetheine binding   MF:cofactor binding   BP:biosynthetic process	3,16333333	1,92E-05
BofuT4_P023860.1	NA		3,15	3,99E-07
BofuT4_P024590.1	NA	MF:iron ion binding   MF:metal ion binding   MF:oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen	3,15	0,00031899
BofuT4_P056610.1	Catalase domain protein	BP:response to oxidative stress   MF:catalase activity	3,14333333	7,44E-08
BofuT4_P102240.1	Choline dehydrogenase	MF:FAD binding   MF:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors   BP:alcohol metabolic process	3,14333333	3,18E-07
BofuT4_uP001380.1	Hypothetical protein		3,13666667	2,36E-05
BofuT4_P106750.1	Fad fmn-containing isoamyl alcohol oxidase	MF:catalytic activity   MF:oxidoreductase activity   MF:FAD binding	3,13666667	0,00010642
BofuT4_P137320.1	NA	MF:FAD binding   MF:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors   BP:alcohol metabolic process	3,13333333	2,17E-05
BC1G_03452.1	Predicted protein		3,13	9,89E-05
BofuT4_P120070.1	Gata-binding transcription factor		3,12666667	0,00014152
BofuT4_P048040.1	NA		3,12333333	3,17E-05
BofuT4_P013960.1	Extracellular scp domain protein	CC:extracellular region	3,12	2,92E-05
BofuT4_P009850.1	Hypothetical protein		3,11333333	0,000277
BofuT4_P033730.1	NA		3,11	1,36E-06
BC1G_16178.1	Hypothetical protein		3,11	9,22E-05
BofuT4_P122680.1	Fad nad-p-binding domain-containing protein	BP:metabolic process   MF:oxidoreductase activity   MF:monooxygenase activity	3,10333333	0,00110411
BofuT4_P111880.1	Carbohydrate esterase family 16 protein	MF:hydrolase activity   BP:lipid metabolic process   MF:hydrolase activity, acting on ester bonds	3,1	2,51E-06
BofuT4_P086000.1	Aldolase	MF:catalytic activity   MF:carbon-carbon lyase activity	3,09666667	2,91E-05
BofuT4_P092030.1	Predicted protein		3,09333333	9,22E-05

BofuT4_P143180.1	Nudix	MF:hydrolase activity	3,09333333	0,00032461
BofuT4_P023840.1	NA		3,09	4,06E-08
BofuT4_P020150.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,09	2,46E-07
BofuT4_P142570.1	Predicted protein		3,09	0,00015019
BofuT4_P130640.1	Hypothetical protein		3,08666667	2,79E-05
BofuT4_P146840.1	Abc transporter	MF:ATP binding   MF:ATPase activity   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:nucleotide binding	3,08333333	6,65E-08
BofuT4_P095020.1	Hypothetical protein		3,06333333	1,84E-06
BofuT4_P061830.1	NA		3,05666667	2,05E-07
BofuT4_P107710.1	Flavin-containing monooxygenase	MF:FAD binding   MF:electron carrier activity   MF:NADP binding	3,05666667	2,16E-05
BofuT4_P161220.1	NA		3,04333333	0,00025117
BC1G_15962.1	Predicted protein		3,04	0,00019296
BofuT4_P000600.1	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:coenzyme binding   BP:cellular metabolic process	3,03666667	1,05E-07
BofuT4_P002830.1	Protein		3,03333333	5,85E-05
BofuT4_P014580.1	Yt521-b-like splicing	MF:nucleic acid binding   BP:pathogenesis   MF:nucleotide binding	3,03	3,89E-08
BofuT4_P017980.1	NA		3,02666667	3,93E-05
BofuT4_P073300.1	NA		3,01333333	3,11E-08
BC1G_12847.1	Cytochrome p450 monooxygenase		3,01	0,00088893
BofuT4_P048900.1	NA	MF:hydrolase activity	3,00333333	2,14E-06
B1BC_045_017_E07	NA		3,00333333	8,93E-06

**Anexo 2.** Listado de los 215 genes cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO en esporas en germinación de la cepa *ΔBcfhg1 α7.2* (5vs6) obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 5vs6vs7. Los genes resaltados en amarillo son aquellos que pertenecen al cluster MCM (genes expresados en la transición de las fases M/G1 de ciclo celular), los resaltados en rojo participan en la replicación de ADN, aquellos en morado están relacionados con ciclo celular, los resaltados en rosa se encuentran dentro de la categoría funcional de Nucleolo y los resaltados en gris que codifican para proteínas de checkpoint.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN	TÉRMINO GO	Log FOLD CHANGE	P-VALUE
B3BC_116_207_D09			6,88666667	1,97E-07
BofuT4_P034170.1		MF:transferase activity   MF:cofactor binding   BP:biosynthetic process	5,25666667	2,82E-06
BofuT4_P007200.1	Ring finger domain-containing protein		5,11666667	1,53E-08
BofuT4_P028780.1			5,09	9,96E-05
BofuT4_P032680.1		CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:substrate-specific transmembrane transporter activity   CC:membrane   BP:transport   MF:transporter activity	4,95333333	0,00028373
BofuT4_P121910.1	Hypothetical protein	MF:phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor   BP:carbohydrate metabolic process	4,83	1,03E-07
BofuT4_P077080.1	DNA replication licensing factor mcm3	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:nucleotide binding   BP:DNA replication	4,76666667	8,75E-06
BofuT4_P081740.1	NA	BP:proteolysis   MF:FAD binding   MF:aspartic-type endopeptidase activity   MF:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors   BP:alcohol metabolic process	4,75333333	7,67E-06
BofuT4_P004120.1	DNA replication licensing factor mcm5	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleoside-triphosphatase activity   BP:cell division   MF:nucleotide binding   BP:DNA replication	4,75	1,18E-05
BofuT4_P130110.1	Hypothetical protein	CC:integral to membrane	4,69666667	8,42E-08
BofuT4_P104360.1	Capsule polysaccharide biosynthesis protein		4,64333333	5,95E-07
BofuT4_P011760.1	Sda1 domain-containing protein	MF:protein binding   CC:nucleolus   BP:ribosome assembly   BP:traversing start control point of mitotic cell cycle	4,54	8,72E-05
BofuT4_P088670.1	Hypothetical protein		4,53	2,40E-06

B3BC_116_214_H03	NA		4,51666667	1,95E-06
BofuT4_P157250.1	Nuclear condensin complex subunit	MF:ATP binding   MF:ATPase activity   MF:protein binding   CC:chromosome	4,48666667	0,00139155
BofuT4_P078030.1	Domain protein		4,40666667	3,41E-07
BofuT4_P111010.1	Pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase prp16	MF:ATP binding   MF:nucleic acid binding   MF:helicase activity   MF:ATP-dependent helicase activity	4,40333333	6,80E-07
BofuT4_P022310.1	NA	MF:catalytic activity	4,39	0,00010984
BofuT4_P102910.1	Predicted protein		4,35333333	2,71E-05
BofuT4_P122660.1	Pigment biosynthesis protein ayg1		4,32666667	1,34E-10
BofuT4_P134620.1	NA		4,29666667	0,00010253
BofuT4_P159600.1	G2-specific protein kinase nima	MF:ATP binding   MF:protein serine/threonine kinase activity   MF:protein kinase activity   BP:positive regulation of chemotaxis	4,29	3,12E-06
BofuT4_P109960.1	Prp 4 c domain-containing protein		4,27333333	2,85E-05
BofuT4_P118800.1	Anaphase-promoting complex subunit cut9	MF:binding	4,22666667	2,56E-06
BofuT4_P104370.1	Major facilitator superfamily transporter	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:tetracycline:hydrogen antiporter activity   BP:response to antibiotic   BP:tetracycline transport	4,17333333	4,53E-10
BofuT4_P104310.1	Cytochrome p450	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity   MF:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	4,12333333	5,26E-09
BofuT4_P064600.1	Sugar transporter	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:substrate-specific transmembrane transporter activity   CC:membrane   BP:transport   MF:transporter activity	4,11	0,00017944
BofuT4_P021950.1	NA	BP:cellular process	4,08666667	4,66E-06
BofuT4_P068110.1	Mfs peptide transporter	CC:integral to membrane   CC:membrane   MF:transporter activity   BP:oligopeptide transport	4,06333333	3,15E-07
BofuT4_P006410.1	Proteasome maturation ans ribosome synthesis protein		4,04333333	0,00040051

BofuT4_P075280.1	NA	MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleic acid binding   MF:nucleotide binding   BP:DNA replication   MF:DNA-directed DNA polymerase activity	4,03333333	8,34E-05
BofuT4_P037110.1	NA	CC:intracellular   MF:GTP binding	4,02666667	9,81E-05
BofuT4_P099320.1	Choline dehydrogenase	MF:FAD binding   MF:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors   BP:alcohol metabolic process	4,01666667	3,17E-05
BofuT4_P070200.1	NA	MF:coenzyme binding   BP:rRNA processing   MF:hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity   BP:coenzyme A metabolic process	4,01333333	2,49E-05
BofuT4_P034180.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:transferase activity   MF:cofactor binding   BP:biosynthetic process	3,99	1,69E-05
BofuT4_P022640.1	NA		3,98	2,03E-07
BofuT4_P133740.1	NA		3,96333333	0,0014538
BofuT4_P143410.1	tRNA methyltransferase		3,96	3,45E-06
BofuT4_P044170.1	Integral membrane protein		3,94666667	5,30E-09
BofuT4_P019050.1	NA	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:tetracycline:hydrogen antiporter activity   BP:response to antibiotic   BP:tetracycline transport	3,93333333	0,00067008
BofuT4_P088660.1	Hypothetical protein		3,93333333	1,33E-06
BofuT4_P011530.1	Hmg-i hmg- dna-binding protein	MF:ATP binding   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:nucleotide binding	3,91666667	1,71E-05
BofuT4_P036190.1	NA	MF:binding   MF:RNA binding	3,91	0,00030242
BC1G_02439.1	Plasma membrane iron permease		3,90333333	1,02E-06
BofuT4_P104410.1	Benzoate 4-monooxygenase cytochrome p450	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	3,9	3,28E-08
BofuT4_P136470.1	NA		3,88666667	2,03E-07
BofuT4_P010590.1	DNA polymerase subunit alpha b	MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:DNA replication   MF:DNA-directed DNA polymerase activity	3,88	3,06E-05
BC1G_15934.1	Kinesin motor domain-containing protein		3,87	1,30E-05
BofuT4_P076210.1	NA	CC:intracellular	3,86	1,14E-05
BofuT4_P086040.1	Kinesin heavy chain	MF:ATP binding   BP:microtubule-based movement   CC:microtubule	3,85	3,88E-05

		MF:microtubule motor activity		
BofuT4_P067710.1	Translation machinery-associated		3,82333333	6,02E-07
BofuT4_P128820.1	C2h2 transcription factor	MF:zinc ion binding   CC:intracellular   MF:nucleic acid binding	3,77666667	0,00028813
BofuT4_P011850.1	Alpha-( )-amylase	MF:catalytic activity   MF:calcium ion binding   BP:carbohydrate metabolic process   MF:cation binding   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	3,77	5,42E-06
BofuT4_P118300.1	M-phase inducer phosphatase	CC:intracellular   MF:protein tyrosine phosphatase activity   BP:M phase of mitotic cell cycle	3,76666667	1,95E-06
BC1G_13816.1	Protein		3,76333333	6,09E-06
BofuT4_P090810.1	Cell division control protein 54	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:DNA replication	3,76	9,15E-06
BofuT4_P153250.1	Nuclear condensin complex subunit smc4	MF:ATP binding   MF:DNA binding   MF:protein binding   CC:chromosome	3,76	2,17E-05
BofuT4_P143560.1	Nuclear migration protein		3,75	1,16E-06
BofuT4_P052080.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds   MF:alpha-galactosidase activity	3,74	1,55E-05
BofuT4_P135260.1	NA	MF:ATP binding   MF:ubiquitin-protein ligase activity   BP:protein ubiquitination   BP:modification-dependent protein catabolic process   MF:small conjugating protein ligase activity   BP:post-translational protein modification   BP:regulation of protein metabolic process	3,73	2,43E-07
BofuT4_P114140.1	Cell surface flocculin		3,72	1,31E-06
BofuT4_P054550.1	NA		3,71666667	4,74E-05
BofuT4_P100890.1	Domain-containing protein	MF:zinc ion binding   MF:heat shock protein binding   BP:protein folding   MF:unfolded protein binding	3,71666667	7,06E-05
BofuT4_P001030.1	Rad5-like protein	MF:ATP binding   MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   MF:nucleic acid binding   MF:protein binding   MF:helicase activity   MF:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	3,71333333	3,10E-06
BofuT4_P035570.1	NA		3,71	0,00015426
BofuT4_P096340.1	Hypothetical protein		3,70666667	6,29E-07
BofuT4_P159020.1	Glycosyltransferase family 2 protein	MF:transferase activity   BP:mycelium development	3,70333333	0,00027131

BofuT4_P033470.1	NA		3,69333333	0,00031015
BofuT4_P159180.1	Small nucleolar ribonucleoprotein complex subunit	BP:rRNA processing   CC:nucleolus	3,69333333	9,55E-05
BofuT4_P021900.1	NA		3,67333333	8,73E-07
BofuT4_P149180.1	Short-chain dehydrogenase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,67	2,99E-07
BofuT4_P112580.1	Metalloproteinase	BP:proteolysis   MF:metalloendopeptidase activity	3,66333333	8,60E-07
BofuT4_P092830.1	Nima interactive protein		3,65333333	5,04E-06
BofuT4_P146290.1	Aspartate aminotransferase	MF:catalytic activity   MF:pyridoxal phosphate binding   BP:biosynthetic process   MF:transaminase activity   MF:transferase activity, transferring nitrogenous groups	3,65	5,42E-06
BofuT4_P088450.1	DNA mismatch repair protein	MF:ATP binding   BP:mismatch repair   MF:mismatched DNA binding   CC:MutSalpha complex   CC:MutSbeta complex	3,65	6,81E-05
BofuT4_P119980.1	l-ornithine n5-oxygenase		3,64666667	7,68E-05
BC1G_11473.1	ATP-dependent rna helicase dbp4		3,64666667	0,00059178
BC1G_14719.1	RNA binding protein		3,64	0,00025394
BofuT4_P017740.1	NA	MF:ATP binding	3,62333333	1,36E-06
BofuT4_P105980.1	Glycosyltransferase family 2 protein		3,61666667	1,93E-08
BofuT4_P003860.1	Tripeptidyl-peptidase 1 precursor	BP:proteolysis   MF:serine-type endopeptidase activity   MF:serine-type peptidase activity	3,61666667	1,92E-07
BofuT4_P069680.1	NA	CC:nucleus   BP:mitosis   BP:mycelium development	3,61333333	8,80E-08
BofuT4_P148410.1	Wd repeat-containing protein slp1		3,61333333	2,14E-06
BofuT4_P081790.1	NA	MF:catalytic activity   CC:membrane   BP:transport   MF:pyridoxal phosphate binding   MF:transporter activity   MF:transaminase activity	3,61	4,08E-09
BofuT4_P011840.1	Pathway-specific nitrogen regulator		3,61	0,00036336
BofuT4_P096640.1	Protein		3,60333333	5,00E-07
B3BC_116_217_A06	NA		3,59666667	9,87E-07
BofuT4_P041780.1	Glycosyl transferase family 8	MF:transferase activity, transferring glycosyl groups   CC:cell part	3,58333333	1,52E-07

BofuT4_P021870.1	NA	BP:metabolic process   CC:nucleus   MF:transferase activity   BP:gene silencing	3,57666667	0,00110541
BofuT4_P060050.1	NA	MF:transferase activity	3,57	0,00030653
AL111694	DNA replication licensing factor mcm4		3,56666667	3,02E-06
BofuT4_P075480.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:intracellular	3,56333333	1,12E-07
BC1G_06342.1	F-box domain-containing protein		3,54333333	0,00035718
BofuT4_P138460.1	NA		3,54	6,51E-07
BofuT4_P104960.1	Replication factor-a protein 1	MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleic acid binding   BP:DNA replication	3,53666667	6,89E-06
BofuT4_P010850.1	Glutamate-rich wd repeat containing protein 1		3,53333333	2,08E-06
BofuT4_P078800.1	Protein arginine n-methyltransferase 3	CC:cytoplasm   MF:protein methyltransferase activity	3,52	2,46E-05
BofuT4_P062430.1	Histidine acid phosphatase	MF:acid phosphatase activity	3,51	4,34E-05
BC1G_16233.1	hypothetical protein		3,50666667	4,33E-06
BofuT4_P097750.1	Glycoside hydrolase family 5 protein	MF:catalytic activity   BP:carbohydrate metabolic process   MF:cation binding   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	3,50333333	3,62E-10
BofuT4_P068290.1	hypothetical protein		3,49	7,00E-06
BofuT4_P139030.1	NA	MF:ATP binding   MF:nucleic acid binding   MF:helicase activity   MF:RNA binding   MF:ATP-dependent helicase activity   BP:rRNA processing   CC:nucleolus	3,49	0,00023941
BofuT4_P033490.1	NA	MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleic acid binding   MF:nucleotide binding   BP:DNA replication   MF:DNA-directed DNA polymerase activity   MF:nucleoside binding	3,48666667	9,89E-05
BofuT4_P126080.1	NA	CC:nucleus   MF:hydrolase activity   CC:cytosol	3,47	1,84E-06
BofuT4_P156800.1	DNA mismatch repair protein	MF:ATP binding   BP:mismatch repair   MF:mismatched DNA binding	3,46666667	3,40E-05
BofuT4_P141850.1	Dihydrodipicolinate synthetase family protein	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:lyase activity	3,46333333	0,00175486
BofuT4_P116500.1	DNA polymerase	MF:DNA binding   MF:DNA-directed DNA polymerase activity	3,45	0,00041721
BofuT4_P152060.1	Hypothetical protein		3,45	0,00095804



BC1G_14541.1	Long-chain-fatty-acid- ligase		3,44666667	1,16E-05
BC1G_06997.1	Hypothetical protein		3,44	8,68E-05
BofuT4_P086030.1	Kinesin family protein	MF:ATP binding   BP:microtubule-based movement   CC:microtubule   MF:microtubule motor activity	3,43333333	2,14E-05
BofuT4_P132880.1	NA	CC:nucleus	3,43	0,00033494
BofuT4_P037260.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   MF:protein binding   BP:chromatin modification   BP:chromatin silencing   MF:histone-lysine N-methyltransferase activity   BP:protein localization   BP:microtubule-based process   BP:meiosis   CC:heterochromatin   BP:cellular localization	3,42666667	9,67E-06
BofuT4_P075510.1	NA	CC:nucleus   BP:cell cycle   BP:replication fork protection   BP:response to DNA damage stimulus	3,42	2,00E-06
BofuT4_P088830.1	DNA replication licensing factor mcm2	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds   BP:DNA replication	3,41	2,56E-05
BC1G_06363.1	Hypothetical protein		3,41	0,0001831
BofuT4_P011410.1	C6 transcription	MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	3,40333333	1,83E-07
BC1G_11474.1	ATP-dependent rna helicase dbp10		3,4	0,00053821
BofuT4_P073990.1	NA	BP:DNA replication, synthesis of RNA primer   MF:DNA primase activity   CC:alpha DNA polymerase:primase complex	3,39	2,16E-05
BofuT4_P108050.1	Ankyrin repeat containing protein yar1		3,39	9,88E-05
BofuT4_P104290.1	Methyltransferase	BP:metabolic process   MF:methyltransferase activity	3,38333333	1,60E-07
BofuT4_P121700.1	Acetoin reductase family protein	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,38333333	0,00063982
BofuT4_P123280.1	Peptidase family m20 m25 m40 protein		3,38	1,58E-05
B3BC_116_226_E04	NA		3,37666667	3,62E-06
BofuT4_P002610.1	Gtpase slip-gc	MF:GTP binding   MF:GTPase activity	3,37666667	9,22E-05
BC1G_14786.1	Glycoside hydrolase family 1 protein		3,37	2,16E-07
BofuT4_P134090.1	NA	MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	3,36666667	5,02E-06

BofuT4_P012590.1	Short-chain dehydrogenase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	3,36	7,94E-05
BofuT4_P113750.1	Glycosyl transferase	BP:carbohydrate metabolic process   MF:transferase activity, transferring glycosyl groups	3,36	0,00019133
BofuT4_P069570.1	NA	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:nucleotide binding   BP:DNA replication	3,35333333	4,18E-06
BofuT4_P139500.1	NA	BP:cellular process	3,35333333	8,84E-06
BofuT4_P018390.1	NA	MF:nucleic acid binding   MF:calcium ion binding   MF:nucleotide binding   MF:actin binding	3,35333333	1,27E-05
BofuT4_P065300.1	DNA replication licensing factor mcm6	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:DNA replication	3,34666667	6,56E-05
BofuT4_P095800.1	Ribosomal rna-processing protein 15		3,33666667	0,00096229
BC1G_11475.1	ATP-dependent rna helicase dbp10		3,32333333	0,00044306
BofuT4_P007900.1	Digestive organ expansion factor	CC:nucleus   CC:nucleolus	3,32333333	0,00028035
BC1G_07667.1	Cytochrome p450		3,32	4,62E-05
BofuT4_P004160.1	Chromatin assembly factor 1 subunit	CC:nucleus   CC:cytoplasm   BP:DNA repair   MF:histone acetyltransferase activity   BP:chromatin modification	3,31666667	7,13E-06
BofuT4_P059120.1	NA	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:nucleotide binding   MF:copper ion binding   BP:DNA replication	3,31	1,51E-05
BofuT4_P045040.1	Hypothetical protein		3,3	8,45E-06
BofuT4_P100420.1	Fact complex subunit spt-16	CC:nucleus   BP:DNA repair   BP:DNA replication   BP:cellular process   CC:chromosome	3,29333333	0,00011565
BofuT4_P079360.1	NA	MF:nucleic acid binding   MF:nucleotide binding	3,29	8,84E-06
BofuT4_P142190.1	Multiple ankyrin repeats single kh domain	MF:serine-type endopeptidase inhibitor activity	3,29	2,49E-05
BofuT4_P111020.1	Periodic tryptophan protein	BP:mycelium development	3,29	7,94E-05
BofuT4_P110170.1	Chromosome segregation protein		3,28	2,16E-05
BofuT4_P105710.1	Cytochrome p450 monooxygenase	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	3,27666667	9,68E-05
BofuT4_P079260.1	tRNA guanosine-2 -o-methyltransferase	MF:nucleic acid binding   MF:methyltransferase activity   BP:methylation	3,27333333	2,05E-05

	trm11			
BofuT4_P036210.1	NA	MF:binding	3,26	1,08E-05
BofuT4_P102680.1	Condensin component	CC:nucleus   MF:binding   BP:mitosis   BP:chromosome condensation	3,25666667	4,93E-06
BofuT4_P004870.1	Protein		3,25666667	0,00043869
BofuT4_P077740.1	Checkpoint serine threonine-protein kinase bub1	MF:ATP binding   MF:protein serine/threonine kinase activity   MF:protein kinase activity	3,25333333	0,00022288
B1BC_045_005_C01	Alpha-actinin		3,24666667	2,39E-06
BofuT4_P068520.1	Predicted protein		3,24333333	9,99E-05
BofuT4_P000820.1	Maltose permease	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:substrate-specific transmembrane transporter activity   CC:membrane   BP:transport   MF:transporter activity	3,23	1,41E-06
BofuT4_P074820.1	NA	MF:RNA binding   BP:RNA processing   MF:pseudouridine synthase activity   BP:pseudouridine synthesis   BP:RNA modification	3,23	2,88E-05
BofuT4_P054920.1	NA	MF:ATP binding   CC:chromosome	3,22333333	5,21E-05
BofuT4_P046120.1	NA Manual annotation: similar to cdc6	MF:ATP binding   MF:nucleoside-triphosphatase activity	3,22333333	0,00045816
BofuT4_P058100.1	U3 small nucleolar ribonucleoprotein imp4	MF:nucleic acid binding   CC:ribonucleoprotein complex	3,21666667	3,50E-05
BofuT4_P124570.1	Hypothetical protein		3,21666667	0,00015012
BofuT4_P140560.1	Set domain-containing protein		3,21333333	6,31E-05
BofuT4_P043000.1	Extracellular exo-	MF:polygalacturonase activity   BP:carbohydrate metabolic process	3,21	1,01E-05
BofuT4_P003880.1	Anaphase-promoting complex subunit 8	MF:binding   CC:anaphase-promoting complex   BP:regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	3,19666667	2,22E-05
BofuT4_P026180.1	NA	CC:nucleus   BP:mitosis   CC:condensed chromosome kinetochore   BP:cell division	3,19333333	2,62E-06
BofuT4_P141350.1	Hypothetical protein		3,19333333	1,86E-07
BofuT4_P077700.1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	MF:zinc ion binding   CC:intracellular   MF:DNA binding   MF:endonuclease activity   BP:DNA repair   MF:deoxyribonuclease IV (phage-T4-induced) activity	3,19	4,20E-05
BC1G_15433.1	rRNA-processing protein utp23		3,19	0,000451

BofuT4_P014770.1	Snf2 family helicase atpase	MF:ATP binding   MF:DNA binding   MF:nucleic acid binding   MF:helicase activity	3,17	0,00030644
BofuT4_P011860.1	Glucan -alpha-maltohexaosidase precursor	MF:calcium ion binding   BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	3,16666667	3,66E-05
BofuT4_P009040.1	Hypothetical protein		3,16666667	0,00051534
BofuT4_P152070.1	Hypothetical protein		3,16666667	0,00155989
B3BC_116_226_A06	NA		3,16	8,95E-06
BC1G_14252.1	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein		3,16	0,00135567
BC1G_03075.1	Hypothetical protein		3,15	4,18E-06
BofuT4_P012850.1	Thioesterase family protein		3,15	2,96E-05
BofuT4_P160810.1	Myo-inositol oxigenase	CC:cytoplasm   MF:iron ion binding   BP:inositol catabolic process   MF:inositol oxygenase activity	3,14333333	2,87E-05
BofuT4_P078730.1	Serine threonine-protein phosphatase 2a activator 1	MF:isomerase activity   CC:intracellular part   MF:phosphatase activator activity	3,14333333	5,28E-07
BofuT4_P139080.1	NA	MF:ATP binding   MF:protein binding   CC:chromosome	3,14333333	0,00020632
BofuT4_P102670.1	Condensin complex subunit 1	CC:nucleus   MF:binding   BP:mitosis   BP:chromosome condensation	3,14	3,56E-05
BofuT4_P070420.1	NA	BP:rRNA processing   CC:nucleolus   CC:nucleoplasm	3,13666667	0,00227759
BofuT4_P130170.1	Fact complex subunit pob-3	MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:DNA metabolic process   BP:response to DNA damage stimulus	3,12333333	0,00012158
BofuT4_P153760.1	Microtubule associated protein	MF:nucleotide binding	3,12	0,00129376
B4BC_116_276_F04	NA		3,12	0,00809628
BofuT4_P096650.1	Hsp70 family protein	MF:ATP binding	3,11666667	7,87E-10
BofuT4_P122160.1	Checkpoint protein	MF:ATP binding   MF:protein serine/threonine kinase activity   MF:protein kinase activity	3,11666667	0,00010642
BofuT4_P075730.1	NA		3,09333333	1,68E-05
BofuT4_P006050.1	Peroxisomal membrane protein		3,09	1,41E-06
BC1G_13693.1	Hypothetical protein		3,09	0,00051534

BofuT4_P146510.1	Hypothetical protein		3,08666667	1,13E-05
BofuT4_P073240.1	NA		3,08666667	0,00184465
BofuT4_P092840.1	Nima interactive protein		3,08333333	3,83E-05
BC1G_09303.1	Glycoside hydrolase family 78 partial sequence		3,08333333	1,21E-05
BofuT4_P084810.1	Et-dependent rRNA methyltransferase spb1	MF:ATP binding   MF:ATPase activity   CC:nucleus   MF:nucleic acid binding   MF:methyltransferase activity   BP:methylation   BP:rRNA processing   BP:rRNA methylation	3,08333333	0,00143131
BofuT4_P053250.1	NA	CC:nucleus   CC:cytoplasm   BP:mycelium development   BP:rRNA processing   CC:nucleolus	3,08	0,00077591
BofuT4_P004280.1	Condensin subunit cnd3	CC:nucleus   MF:binding   CC:cytosol   BP:mitotic chromosome condensation   CC:condensin complex	3,08	3,85E-05
BofuT4_P024780.1	NA		3,08	6,75E-05
BofuT4_P019280.1	NA	MF:heat shock protein binding	3,08	0,00013258
BofuT4_P065980.1	Glycosyl transferase family 8	MF:transferase activity, transferring glycosyl groups	3,07666667	0,00041061
BofuT4_P000700.1	p60 domain-containing protein		3,07666667	0,00139753
BofuT4_P000500.1	DNA-directed RNA polymerase iii complex subunit rpc37		3,07	3,43E-05
BC1G_05160.1	Predicted protein		3,06	0,00205572
BofuT4_P095770.1	Integral membrane protein		3,05666667	1,53E-05
B3BC_116_221_C02	NA		3,05333333	2,16E-08
BofuT4_P115350.1	Viral a-type inclusion protein		3,05333333	0,00232224
BofuT4_P018380.1	NA	MF:catalytic activity   MF:chitinase activity   BP:chitin catabolic process   MF:chitin binding   BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	3,05	8,60E-07
BofuT4_P040530.1	Ribosome assembly protein	BP:mycelium development   CC:cytoplasmic part   CC:Noc complex   CC:nucleolar part	3,04	0,00331706
BofuT4_P067070.1	60s ribosome biogenesis protein		3,03	0,00869746
BofuT4_P092870.1	F-box domain-containing protein	MF:binding	3,02666667	2,27E-05

BC1G_14521.1	Chromosome segregation protein		3,02333333	6,75E-05
BC1G_16245.1	Pnk3p-domain-containing protein		3,02333333	1,39E-06
BofuT4_P109280.1	Glycoside hydrolase family 43 protein	BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds   BP:xylan catabolic process	3,02	5,36E-05
BC1G_03344.1	Predicted protein		3,01666667	1,03E-05
BofuT4_P010110.1	Hypothetical protein		3,01333333	2,94E-07
BofuT4_P136940.1	NA		3,01	4,06E-08
BofuT4_P081800.1	NA	MF:catalytic activity   MF:pyridoxal phosphate binding   BP:biosynthetic process   MF:transferase activity, transferring nitrogenous groups	3,01	1,10E-07
BofuT4_P068300.1	Hypothetical protein		3,00666667	9,19E-06

**Anexo 3.** Listado de los 26 genes obtenidos del análisis diferencial de la comparación 7vs5 cuya expresión se ve alterada al eliminar el gen de la enzima flavohemoglobina en ausencia de NO exógeno.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN	TÉRMINO GO	Log FOLD CHANGE	P-VALUE
BofuT4_P008520.1	Flavohemoprotein	MF:oxidoreductase activity   MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   BP:oxygen transport   MF:oxygen transporter activity   MF:oxygen binding	7,63666667	3,96E-12
BC1G_03591.1	Predicted protein		4,39333333	4,10E-09
BofuT4_P098930.1	Cytochrome p450	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	3,10666667	3,77E-08
BofuT4_P104570.1	Predicted protein		4,11666667	1,02E-07
BofuT4_P032450.1	NA		3,41666667	1,32E-06
BC1G_04944.1	Membrane-anchored cell surface protein		3,44	1,85E-06
BofuT4_P008540.1	Alpha-amylase a type-1 2	MF:catalytic activity   MF:calcium ion binding   BP:carbohydrate metabolic process   MF:cation binding   BP:carbohydrate catabolic process   MF:alpha-amylase activity	4,61	4,45E-06
BofuT4_P004010.1	Hypothetical protein		3,32	4,45E-06
BofuT4_P120110.1	Nrps-like enzyme	MF:catalytic activity   BP:metabolic process	4,35666667	9,04E-06
BofuT4_P029570.1	NA		4,36	9,04E-06
BofuT4_P033980.1	NA	MF:tryptophan dimethylallyltransferase activity   BP:alkaloid metabolic process	5,02666667	2,42E-05
BofuT4_P138260.1	NA		3,48333333	2,42E-05
BofuT4_P096230.1	Sesquiterpene cyclase	MF:magnesium ion binding   MF:lyase activity	3,62333333	5,98E-05
BofuT4_P032440.1	NA		4,19666667	0,00017893
BofuT4_P130310.1	Mfs multidrug	BP:transmembrane transport	4,03666667	0,00017893
BofuT4_P044370.1	Cytochrome p450 family member	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	4,08666667	0,00019951
BC1G_11241.1	Predicted protein		3,37666667	0,00027045
BofuT4_P163350.1	Nrps-like enzyme	MF:catalytic activity   BP:metabolic process	4,44333333	0,00033283

BC1G_09708.1	Predicted protein		4,05333333	0,00039743
BofuT4_P012630.1	Protein		3,73	0,00077184
BofuT4_P008550.1	Hypothetical protein		3,25666667	0,00113544
BofuT4_P038380.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:intracellular   MF:nucleic acid binding	3,22	0,00118793
BofuT4_P023570.1	NA		3,77	0,00135887
BofuT4_P162440.1	NA		3,61666667	0,00153203
BC1G_15855.1	Serine threonine-protein kinase csk1		3,50333333	0,00450416
BofuT4_P126830.1	H k atpase alpha	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:ATP binding   CC:integral to membrane   CC:membrane   BP:cation transport   BP:ATP biosynthetic process   MF:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism   MF:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances   MF:sodium:potassium-exchanging ATPase activity	3,03666667	0,00468286



**Anexo 4.** Listado de los 104 genes de la cepa silvestre B05.10 cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a NO obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 3vs4. Los genes resaltados en rosa codifican factores de transcripción.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN	TÉRMINO GO	Log FOLD CHANGE	P-VALUE
BofuT4_P084120.1	Hypothetical protein		2,31	0,00931891
BofuT4_P127220.1	General amidase	MF:ATP binding   CC:cytoplasm   BP:translation   MF:hydrolase activity   MF:carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor   MF:nucleotide binding   BP:tRNA aminoacylation for protein translation   MF:aminoacyl-tRNA ligase activity	3,09	0,01171798
BofuT4_P084110.1	Aba 3 protein		2,24	0,01551238
BofuT4_P159110.1	Isocitrate lyase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   BP:tricarboxylic acid cycle   CC:peroxisome   BP:carboxylic acid metabolic process   MF:isocitrate lyase activity   BP:glyoxylate cycle   CC:glyoxysome	1,57	0,02163321
BofuT4_P053120.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,61	0,0220167
BofuT4_P066980.1	Integral membrane protein		1,89	0,02548782
BofuT4_P033350.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   BP:fatty acid biosynthetic process   BP:biosynthetic process	1,08	0,0279329
BofuT4_P154620.1	Patatin-like serine	BP:metabolic process   MF:hydrolase activity   BP:lipid catabolic process   CC:endoplasmic reticulum   BP:lipid metabolic process   CC:membrane part	1,21	0,02798995
BofuT4_P008430.1	Glycosyl hydrolase	MF:catalytic activity	1,72	0,02798995
BofuT4_P078340.1	Mfs transporter	BP:transmembrane transport	2,11	0,02798995
BofuT4_P135150.1	NA	MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:nucleus	1,47	0,03474408
BofuT4_P051970.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:ATP binding   CC:integral to membrane   CC:membrane   BP:cation transport   BP:ATP biosynthetic process   MF:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism   MF:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances	1,38	0,04514453
BofuT4_P084500.1	Cutinase negative acting protein		1,63	0,04609621
BofuT4_P067140.1	Rna-binding protein	MF:nucleic acid binding   MF:nucleotide binding	1,18	0,05089469
BofuT4_P051490.1	NA		1,33	0,05089469

BofuT4_P094820.1	Diphthamide biosynthesis protein 1	CC:cytoplasm	1,58	0,05247721
BofuT4_P129980.1	Histone acetyltransferase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:N-acetyltransferase activity   MF:iron-sulfur cluster binding   MF:histone acetyltransferase activity	1,96	0,0530485
BofuT4_P084380.1	Initiation-specific alpha-mannosyltransferase	MF:transferase activity, transferring glycosyl groups	1,35	0,0530485
BofuT4_P026980.1	NA		1,43	0,0530485
BC1G_14696.1	Orp1 like protein		2,18	0,05366992
BofuT4_P049940.1	NA	MF:binding   BP:intracellular protein transport   CC:cytoplasmic part	1,47	0,05366992
BC1G_00909.1	Predicted protein		1,43	0,05604265
BofuT4_P065670.1	Dienelactone hydrolase	MF:hydrolase activity	1,01	0,05604265
BofuT4_P110030.1	Amino-acid n-acetyltransferase subunit		1,17	0,05651455
BofuT4_P062520.1	Protein required for cell viability	MF:binding	1,27	0,05846724
BofuT4_P043140.1	Choline dehydrogenase	MF:FAD binding   MF:oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors   BP:alcohol metabolic process	1,7	0,05846724
BofuT4_P112110.1	C6 transcription	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,46	0,05920448
BofuT4_P118950.1	Glycoside hydrolase family 25 protein	MF:catalytic activity   BP:carbohydrate metabolic process   MF:cation binding	1,61	0,05920448
BofuT4_P025010.1	NA		1,44	0,06218711
BofuT4_P116520.1	Heterokaryon incompatibility protein		1,34	0,06218711
BofuT4_P032700.1	NA	MF:ATP binding   MF:nucleic acid binding   MF:helicase activity   MF:ATP-dependent helicase activity	1,53	0,06218711
BofuT4_P027830.1	NA		1,37	0,06220674
BofuT4_P051960.1	NA	MF:ATP binding   MF:zinc ion binding   CC:intracellular   BP:tRNA processing	1,31	0,06220674
BofuT4_P090170.1	Transcriptional corepressor of histone genes	BP:cellular process	1,64	0,06220674

BofuT4_P116530.1	Hypothetical protein		1,25	0,06340115
BofuT4_P138190.1	NA	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   CC:plasma membrane   BP:copper ion transport   MF:transition metal ion transmembrane transporter activity	1,6	0,06420064
BofuT4_P076510.1	NA		1,26	0,06594285
BofuT4_P121560.1	Mfs phosphate transporter	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   BP:transport   MF:transporter activity   BP:deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process	1,28	0,06594285
BofuT4_P045060.1	Pre-mrna splicing	MF:ATP binding   BP:proteolysis   MF:nucleic acid binding   MF:ATP-dependent helicase activity   MF:serine-type peptidase activity	1,05	0,0664455
BofuT4_P060030.1	NA	MF:GTP binding   MF:translation elongation factor activity   MF:GTPase activity   CC:ribonucleoprotein complex	1,21	0,0664455
BofuT4_P052360.1	NA	MF:binding	1,53	0,0672351
BC1G_14697.1	Predicted protein		1,82	0,07106935
BofuT4_P024330.1	NA		2,17	0,07106935
BofuT4_P000910.1	Null	MF:ATP binding   BP:proteolysis   MF:ATPase activity   CC:cytoplasm   MF:nucleoside-triphosphatase activity   BP:microtubule-based movement   MF:cysteine-type endopeptidase activity   CC:microtubule   MF:microtubule motor activity   CC:dynein complex   MF:nucleotide binding	1,38	0,07170071
BC1G_13819.1	Nadh oxidase		1,17	0,07203944
BofuT4_P009990.1	Transcription factor cys6	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,76	0,07203944
BofuT4_P077280.1	C6 zinc finger domain containing protein	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,03	0,07203944
BofuT4_P049220.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:intracellular   MF:nucleic acid binding	1,35	0,07394972
BofuT4_P038180.1	NA	MF:ATP binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:nucleic acid binding   MF:ATP-dependent helicase activity   MF:ATP-dependent DNA helicase activity   BP:nucleotide-excision repair   MF:hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	1,12	0,07394972
BofuT4_P023970.1	NA	MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,24	0,07634337
BofuT4_P149480.1	Dolichol-phosphate mannosyltransferase		1,14	0,07634337

BofuT4_P161350.1	Hypothetical protein		1,37	0,07634337
BofuT4_uP000980.1	Predicted protein		1,28	0,07634337
BofuT4_P036600.1	NA		1,61	0,07690281
BofuT4_P120740.1	Tthiamine pyrophosphokinase	MF:ATP binding	1,08	0,07920983
BC1G_14496.1	Predicted protein		1,05	0,07920983
BofuT4_P105390.1	Hypothetical protein		1,05	0,07920983
BofuT4_P058090.1	Regulator of nonsense	MF:ATP binding   MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:cytoplasm   MF:helicase activity   MF:hydrolase activity	1,45	0,0793671
BofuT4_P116470.1	Thermotolerance protein		1,4	0,0793671
BofuT4_P034720.1	NA		1,25	0,0793671
BofuT4_P059390.1	NA	MF:DNA binding   MF:DNA-directed RNA polymerase activity   MF:ribonucleoside binding	1,04	0,0793671
BC1G_07437.1	Predicted protein		1,16	0,0793671
BC1G_14701.1	Predicted protein		1,27	0,0793671
B4BC_116_274_A06	NA		1,61	0,0793671
BofuT4_P084130.1	Hypothetical protein		1,6	0,0793671
BofuT4_P154630.1	Patatin-like serine	MF:hydrolase activity   CC:endoplasmic reticulum   BP:lipid metabolic process   CC:membrane part	1,22	0,0793671
BofuT4_P104380.1	C6 zinc finger domain protein	MF:zinc ion binding   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,3	0,0793671
BofuT4_P102470.1		CC:membrane	1,48	0,0793671
BC1G_05760.1	Predicted protein		1,13	0,0793671
BC1G_06241.1	Predicted protein		1,32	0,0793671
BofuT4_P011750.1	Tpr domain protein	MF:binding	1,74	0,0793671
BofuT4_P058620.1	NA	BP:lipid metabolic process   MF:phosphoric diester hydrolase activity   BP:glycerol metabolic process   MF:glycerophosphodiester phosphodiesterase activity	1,48	0,07950179
BofuT4_P002270.1	Hypothetical protein		1,34	0,07950179
BofuT4_P018280.1	NA	MF:ATP binding   MF:protein serine/threonine kinase activity   MF:protein kinase	1,53	0,08118229

		activity		
BofuT4_P131550.1	Beige beach domain-containing protein		1,19	0,08213329
AL115957	NA		1,08	0,08767823
BofuT4_P119910.1	Cation-transporting atpase 4	MF:ATP binding   CC:integral to membrane   CC:membrane   BP:cation transport   BP:ATP biosynthetic process   MF:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	1,42	0,08767823
BofuT4_P063840.1	Fungal specific transcription	MF:ATP binding   MF:zinc ion binding   MF:ATPase activity   MF:DNA binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,35	0,08767823
BofuT4_P030540.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   BP:nitrogen compound metabolic process   MF:glutamate-ammonia ligase activity	1,61	0,09058556
BofuT4_P063390.1	C6 zinc finger domain protein	MF:zinc ion binding   CC:nucleus   BP:regulation of transcription, DNA-dependent	1,03	0,09142848
BC1G_08763.1	Hypothetical protein		1,19	0,09143037
BofuT4_P067510.1	Armadillo-type fold domain containing protein	CC:nucleus   MF:binding   BP:intracellular protein transport	1,25	0,09168008
BofuT4_P024380.1	NA	MF:DNA binding   MF:methyltransferase activity   BP:DNA methylation	1,61	0,09275304
BC1G_09337.1	Predicted protein		1,07	0,09275662
BofuT4_P027170.1	NA	MF:binding   MF:electron carrier activity   MF:kinase activity   MF:phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor   MF:copper ion binding   MF:transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	1,01	0,09275662
BC1G_07045.1	Null		1,2	0,09275662
BofuT4_P078330.1	Bicyclomycin resistance	BP:transmembrane transport	1,25	0,09285139
BofuT4_P132170.1	Hypothetical protein		2,08	0,09412082
BofuT4_P045050.1	Pre-mrna-splicing factor brr2	MF:ATP binding   MF:nucleic acid binding   MF:nucleoside-triphosphatase activity   MF:helicase activity   MF:nucleotide binding   MF:ATP-dependent helicase activity	1,34	0,09540962
BC1G_06370.1	Predicted protein		1,3	0,09540962
BofuT4_P002170.1	Cytochrome p450 oxidoreductase	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	1,39	0,0977508
BofuT4_P153980.1	Prolyl aminopeptidase		1,15	0,0977508

BofuT4_P046520.1	NA		1,1	0,0977508
BofuT4_P051500.1	NA	MF:DNA binding	1,15	0,0977508
BofuT4_P126560.1	Calcium dependent mitochondrial carrier protein	MF:binding   CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:calcium ion binding   CC:membrane   BP:transport   CC:mitochondrial inner membrane	1,19	0,0977508
BofuT4_P105920.1	Hypothetical protein	BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	1,33	0,0977508
BC1G_02189.1	hypothetical protein		2,06	0,0977508
BofuT4_P076140.1	NA	MF:FAD binding   MF:NADP binding	1,49	0,0977508
BofuT4_P016390.1	Aar2 protein		1,11	0,0977508
BofuT4_P144240.1	Fad binding domain-containing protein	BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity   MF:monooxygenase activity	1,04	0,0977508
BC1G_04125.1	Predicted protein		1,14	0,0977508
BofuT4_P149500.1	Hypothetical protein		1,44	0,09838663
BofuT4_P085470.1	Ankyrin repeat-containing		1,33	0,09838663
BofuT4_P127510.1	mRna capping enzyme alpha	BP:mRNA processing   MF:protein binding   MF:mRNA guanylyltransferase activity	1,14	0,09907857

**Anexo 5.** Listado de los 103 genes de la cepa silvestre B05.10 cuya expresión se reprime en respuesta a la exposición a NO obtenidos en el análisis diferencial de la comparación 3vs4. Los genes resaltados en amarillo son aquellos que pertenecen a la categoría GO denominada como Mycelium development, los resaltados en verde participan en procesos de división celular y aquellos en gris están relacionados con reparación de ADN.

CÓDIGO DEL GEN	FUNCIÓN	TÉRMINO GO	Log FOLD CHANGE	P-VALUE
BofuT4_P027420.1	NA		1,65333333	0,00931891
BC1G_14550.1	Predicted protein		1,94	0,00931891
BofuT4_P141040.1	Hypothetical protein	MF:zinc ion binding   MF:nucleic acid binding	1,73666667	0,01551238
BofuT4_P094980.1	Ubx domain-containing protein	MF:zinc ion binding   CC:intracellular	1,64333333	0,01551238
BofuT4_P059630.1	NA	BP:mycelium development	3,45333333	0,01657838
BofuT4_P029060.1	NA		1,82333333	0,02163321
BofuT4_P146580.1	Hypothetical protein		2,81333333	0,02163321
BofuT4_P135410.1	NA		2,53	0,0216426
BofuT4_P043470.1	Calponin domain-containing protein		1,44	0,02798995
BofuT4_P103710.1	Cytochrome p450 monooxygenase	MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:iron ion binding   MF:monooxygenase activity	1,27666667	0,02798995
B3BC_116_230_D04	NA		1,38666667	0,02798995
BofuT4_P111380.1	Hypothetical protein		1,27666667	0,02798995
BofuT4_P109060.1	Hypothetical protein		1,21666667	0,02798995
BC1G_14356.1	Pre-mrna-splicing factor 38b		1,87333333	0,03154312
BofuT4_P047800.1	NA		1,49666667	0,03358308
BC1G_07754.1	Hypothetical protein		1,41	0,03474408
BofuT4_P009430.1	Trfa protein		1,84	0,03474408
BofuT4_P045640.1	NA		1,35	0,04973261
BofuT4_P041470.1	Eisosome protein 1		1,51666667	0,05089469
BofuT4_P008180.1	Hypothetical protein		1,31	0,05169871

BofuT4_P109540.1	Hypothetical protein		1,32333333	0,05247721
BofuT4_P119470.1	Glutamine repeat protein-1		1,48666667	0,05247721
BofuT4_P154790.1	Multicopper oxidase	MF:oxidoreductase activity   MF:copper ion binding	1,97333333	0,0530485
BofuT4_P068840.1	NA		2,37333333	0,0530485
BofuT4_P054910.1	NA	MF:ATP binding   MF:protein serine/threonine kinase activity   MF:protein kinase activity	1,09666667	0,0530485
BofuT4_P114250.1	Brca1 c terminus domain-containing protein	CC:intracellular	1,04	0,0530485
BofuT4_P042200.1	Hypothetical protein		1,23	0,0530485
BofuT4_P134760.1	NA	MF:amino acid binding   BP:'de novo' IMP biosynthetic process   MF:hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity   MF:formyltetrahydrofolate deformylase activity	1,24	0,0530485
BofuT4_P133230.1	NA		1,03333333	0,0530485
BofuT4_P154830.1	Hypothetical protein		1,58	0,0530485
BofuT4_P006510.1	Predicted protein		1,99	0,0530485
BofuT4_P079610.1	NA		1,36333333	0,0530485
BofuT4_P079830.1	NA		1,26333333	0,05366309
BofuT4_P025990.1	NA	BP:mycelium development	1,65	0,05366992
BofuT4_P136820.1	NA	MF:oxidoreductase activity   MF:electron carrier activity   MF:heme binding   MF:succinate dehydrogenase activity	1,53666667	0,05366992
BofuT4_P105140.1	Hypothetical protein		1,35666667	0,05366992
BC1G_10395.1	Predicted protein		2,34666667	0,05366992
BofuT4_P097180.1	Hypothetical protein		1,39666667	0,05581176
BofuT4_P050760.1	NA		1,2	0,05604265
BofuT4_P138980.1	NA		1,39333333	0,05604265
BofuT4_P057410.1	Mis12-mtw1 family protein		1,30666667	0,05651455
BofuT4_P127320.1	Saga complex component		1,52	0,05846724
BofuT4_P156120.1	Nuclear distribution protein		1,41333333	0,05846724
BofuT4_P108600.1	Major facilitator superfamily transporter	BP:transmembrane transport	1,14	0,05846724



BofuT4_P131730.1	Transcription factor bhlh	CC:nucleus   BP:mycelium development	2,55666667	0,05846724
BofuT4_P120260.1	Hypothetical protein		1,01666667	0,06218711
BofuT4_P136450.1	NA	MF:protein binding	1,26333333	0,06218711
BofuT4_P062780.1	Alcohol dehydrogenase	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:zinc ion binding   MF:binding   CC:cytoplasm   MF:oxidoreductase activity	1,21666667	0,06218711
BcA1_3758_F23	NA		1,15666667	0,06218711
BofuT4_P100020.1	Hypothetical protein		1,32	0,06218711
BofuT4_P108350.1	Acyl binding family protein	MF:binding	1,39333333	0,06220674
BC1G_15488.1	Alpha beta hydrolase fold protein		1,73	0,06220674
BofuT4_P066880.1	Myb dna-binding domain containing protein		1,51666667	0,06220674
BofuT4_P026100.1	NA		1,57333333	0,06220674
BofuT4_P013540.1	Protein		1,18666667	0,06310108
BofuT4_P160020.1	Neurogenic locus notch like protein 2		1,18	0,06340115
BofuT4_P098610.1	Hypothetical protein		1,43	0,06340115
BofuT4_P040720.1	Hypothetical protein		1,10333333	0,06420064
BofuT4_P086590.1	Snare complex subunit	MF:protein binding   BP:cell communication	1,10333333	0,06549126
BofuT4_P117550.1	Hypothetical protein	MF:DNA binding   CC:nucleus   MF:protein binding   BP:DNA recombination   BP:double-strand break repair	1,33	0,0664455
BofuT4_P085050.1	F-box domain-containing protein		1,03333333	0,0664455
BofuT4_P129930.1	Hypothetical protein		2,41333333	0,0672351
BC1G_14780.1	Fatty acid oxygenase		1,34	0,06919295
BC1G_04061.1	Predicted protein		1,21666667	0,07041996
BofuT4_P033960.1	NA		1,43	0,07106876
BofuT4_P036650.1	NA		1,61666667	0,07106935
BofuT4_P041920.1	Mfs monosaccharide	MF:binding   CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   MF:substrate-specific transmembrane transporter activity   CC:membrane   BP:transport   MF:transporter activity	1,49666667	0,07106935
BofuT4_P152800.1	Glutamyl-trna amidotransferase subunit a	MF:carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor   BP:response to cAMP	1,52333333	0,07203944

BofuT4_P025240.1	NA	CC:integral to membrane   MF:aspartic-type endopeptidase activity	1,49333333	0,07203944
BofuT4_P136470.1	NA		1,5	0,07203944
BofuT4_P035070.1	NA	MF:catalytic activity   BP:metabolic process   MF:binding   MF:oxidoreductase activity	1,82333333	0,07242486
BofuT4_P018380.1	NA	MF:catalytic activity   MF:chitinase activity   BP:chitin catabolic process   MF:chitin binding   BP:carbohydrate metabolic process   MF:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	1,31	0,07377346
BofuT4_P104320.1	Trichothecene 3-o-acetyltransferase		2,47	0,07428102
BofuT4_P059130.1	NA	MF:zinc ion binding   CC:intracellular	1,21	0,07634337
BofuT4_P041780.1	Glycosyl transferase family 8	MF:transferase activity, transferring glycosyl groups   CC:cell part	1,32	0,07645768
<b>BofuT4_P088470.1</b>	<b>Kinetochore protein</b>		<b>1,42</b>	<b>0,07690281</b>
BofuT4_P049440.1	NA		1,23	0,0778423
BofuT4_P148120.1	Tbc domain	CC:intracellular   CC:nucleus   BP:pathogenesis   BP:vesicle-mediated transport   CC:cytosol   BP:regulation of Rab GTPase activity   MF:Rab GTPase activator activity   BP:conidium formation	1,80333333	0,0793671
BofuT4_P127340.1	Peroxin 26		1,14666667	0,0793671
BofuT4_P038300.1	NA		1,10333333	0,0793671
<b>BofuT4_P089100.1</b>	<b>Kinetochore protein fta4</b>		<b>1,43</b>	<b>0,0793671</b>
BofuT4_P051170.1	NA		1,39	0,0793671
BofuT4_P040150.1	Hypothetical protein		1,15666667	0,0793671
BofuT4_P139100.1	NA		1,52	0,0793671
BofuT4_P107050.1	Amino acid permease	CC:integral to membrane   BP:transmembrane transport   CC:membrane   BP:transport   BP:amino acid transport   MF:amino acid transmembrane transporter activity	2,4	0,07950179
BofuT4_P062770.1	Alcohol dehydrogenase 1	MF:zinc ion binding   MF:oxidoreductase activity   BP:carbohydrate metabolic process   BP:response to cAMP	1,46	0,07950694
BC1G_15398.1	Predicted protein		1,17333333	0,08360526
BofuT4_P038200.1	NA		1,26333333	0,08360526
BofuT4_P124100.1	Chromosomal organization and dna repair protein	MF:zinc ion binding   CC:intracellular	1,14333333	0,08360526

BofuT4_P113290.1	Hypothetical protein		2,82666667	0,08384835
BofuT4_P144170.1	Hypothetical protein		1,33333333	0,08384835
B1BC_045_056_E09	NA		1,86333333	0,08682534
BofuT4_P131220.1	U2 snrnp component ist3	MF:nucleic acid binding   MF:nucleotide binding	1,34666667	0,0951378
BC1G_11061.1	Predicted protein		1,09666667	0,09540962
BofuT4_P018080.1	NA		1,18	0,09540962
BofuT4_P069630.1	NA		1,45	0,09540962
BofuT4_P108260.1	Hypothetical protein	MF:binding	2,09666667	0,09565428
BofuT4_P071690.1	NA		1,78333333	0,09565428
BofuT4_P083070.1	Hypothetical protein		1,00333333	0,0977508
BofuT4_P100800.1	Abc-type fe3+ transport periplasmic component	BP:transport   MF:transporter activity	1,11333333	0,0977508
BofuT4_P073490.1	NA		1,48333333	0,0977508
BofuT4_P061350.1	NA		1,59333333	0,09838663
BofuT4_P021120.1	NA	MF:zinc ion binding   MF:protein binding	1,86333333	0,09937916



# BIBLIOGRAFÍA

---



- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quevillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collemare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Guldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuveglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Segurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M. H., Dickman, M. (2011). "Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*." *PLoS Genet* 7(8): e1002230. doi: 10.1371/journal.pgen.1002230.
- Anisimova, M. and Gascuel, O. (2006). "Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative." *Syst Biol* 55(4): 539-52.
- Aono, N., Sutani, T., Tomonaga, T., Mochida, S., Yanagida, M. (2002). "Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase." *Nature* 417(6885): 197-202.
- Arasimowicz-Jelonek, M. and J. Floryszak-Wieczorek (2014). "Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen?" *Mol Plant Pathol* 15(4): 406-16.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R.J. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-6.
- Astier, J., A. Kulik, Koen, E., Besson-Bard, A., Bourque, S., Jeandroz, S., Lamotte, O., Wendehenne, D. (2012b). "Protein S-nitrosylation: what's going on in plants?" *Free Radic Biol Med* 53(5): 1101-10.
- Backhouse, D. and Willetts, H. J. (1984). "A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*." *Can. J. Microbiol.* 30: 171-178.
- Baidya, S., Cary, J. W., Grayburn, W. S., Calvo, A. M. (2011). "Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production." *Appl Environ Microbiol* 77(15): 5524-8.
- Balogh, L. M., Roberts, A. G., Shireman, L. M., Greene, R. J., Atkins, W. M. (2008). "The stereochemical course of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism by glutathione S-transferases." *J Biol Chem* 283(24): 16702-10.
- Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N., Puppo, A. (2006). "Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules." *Mol Plant Microbe Interact* 19(9): 970-5.
- Bauer, S., Gagneur, J., Robinson, P. N. (2011). "GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data." *Nucleic Acids Res* 38(11): 3523-32.

- Beach, D., Durkacz, B., Nurse, P. (1982). "Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast." *Nature* 300(5894): 706-9.
- Beck, K. F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U. K., Muhl, H., Pfeilschifter, J. (1999). "Inducible NO synthase: role in cellular signalling." *J Exp Biol* 202(Pt 6): 645-53.
- Beever, R.E. and Weeds, P.L. (2004). "Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*." In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds), pp. 29-52.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. (2000). "Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants." *Planta* 210(2): 215-21.
- Benito, E. P., ten Have, A., van't Klooster, J.W., van Kan, J.A.L. (1998). "Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*." *Eur. J. Plant Pathol* 104: 13.
- Benito-Pescador, David. (2010). "Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se inducen *in planta* en la interacción *B. cinerea* – tomate". Tesis Doctoral.
- Berrie, A. M., Harris, D.C., Xu, X.-M., Burgess, C.M. (2000). "A potencial system for managing *Botrytis* and powdery mildew in main season strawberries." *Acta Horticulturae* 567: 647-649.
- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V., Jones, R. L. (2004). "Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide." *Planta* 219(5): 847-55.
- Blasina, A., de Weyer, I. V., Laus, M. C., Luyten, W. H., Parker, A. E., McGowan, C. H. (1999). "A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase." *Curr Biol* 9(1): 1-10.
- Bloom, J. and Cross, F. R. (2007). "Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 149-60.
- Boccara, M., Mills, C. E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R. K., Delledonne, M. (2005). "Flavo-haemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host." *Plant J* 43(2): 226-37.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J., Kirschner, M. W. (1993). "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins." *Embo J* 12(9): 3417-26.
- Brandes, R. P., Fleming, I., Busse, R. (2005). "Endothelial aging." *Cardiovasc Res* 66(2): 286-94.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., Neill, S. J. (2006). "ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis." *Plant J* 45(1): 113-22.



- Bruns, T. D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991). "Fungal molecular systematics." *Annu Rev Ecol Syst* 22: 525-564.
- Buscemi, G., Saracino, F., Masnada, D., Carbone, M. L. (2000). "The *Saccharomyces cerevisiae* SDA1 gene is required for actin cytoskeleton organization and cell cycle progression." *J Cell Sci* 113 ( Pt 7): 1199-211.
- Buttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Bruckner, B., Tudzynski, P. (1994). "Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses." *Curr Genet* 25(5): 445-50.
- Caddick, M. X., Peters, D., Platt, A. (1994). "Nitrogen regulation in fungi." *Antonie Van Leeuwenhoek* 65(3): 169-77.
- Calcagno, C., Novero, M., Genre, A., Bonfante, P., Lanfranco, L. (2012). "The exudate from an arbuscular mycorrhizal fungus induces nitric oxide accumulation in *Medicago truncatula* roots." *Mycorrhiza* 22(4): 259-69.
- Camejo, D., C., Romero-Puertas Mdel, C., Rodriguez-Serrano, M., Sandalio, L. M., Lazaro, J. J., Jimenez, A., Sevilla, F. (2013). "Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins." *J Proteomics* 79: 87-99.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Reze, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A., Baudouin, E. (2011). "Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*." *New Phytol* 189(2): 415-27.
- Cassanova, N., O'Brien, K. M., Stahl, B. T., McClure, T., Poyton, R. O. (2005). "Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution." *J Biol Chem* 280(9): 7645-53.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., Desai, A. (2006). "The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore." *Cell* 127(5): 983-97.
- Chen, J., Ruan, H., Ng, S. M., Gao, C., Soo, H. M., Wu, W., Zhang, Z., Wen, Z., Lane, D. P., Peng, J. (2005). "Loss of function of def selectively up-regulates Delta113p53 expression to arrest expansion growth of digestive organs in zebrafish." *Genes Dev* 19(23): 2900-11.
- Chen, Y., Riley, D. J., Chen, P. L., Lee, W. H. (1997). "HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis." *Mol Cell Biol* 17(10): 6049-56.
- Cho, R. J., Huang, M., Campbell, M. J., Dong, H., Steinmetz, L., Sapinoso, L., Hampton, G., Elledge, S. J., Davis, R. W., Lockhart, D. J. (2001). "Transcriptional regulation and function during the human cell cycle." *Nat Genet* 27(1): 48-54.

- Chong, J. P., Mahbubani, H. M., Khoo, C. Y., Blow, J. J. (1995). "Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system." *Nature* 375(6530): 418-21.
- Conrath, U., Amoroso, G., Kohle, H., Sultermeyer, D. F. (2004). "Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry." *Plant J* 38(6): 1015-22.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Leon, A. M., Sandalio, L. M., del Rio, L. A. (2006). "Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development." *Planta* 224(2): 246-54.
- Corpas, F. J., Palma, J. M., del Rio, L. A., Barroso, J. B. (2009). "Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants." *New Phytol* 184(1): 9-14.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004). "Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato." *Planta* 218(6): 900-5.
- 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." *J Exp Bot* 57(3): 581-8.
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C., Lamattina, L. (2008). "Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots." *New Phytol* 179(2): 386-96.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Lamattina, L. (2013). "Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms." *Front Plant Sci* 4: 232.
- Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breikreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., Tyers, M. (2004). "CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast." *Cell* 117(7): 899-913.
- Coulomb, C., Lizzi, Y., Coulomb, P.J., Roggero, J.P., Coulomb, P.O., Agullon, O. (1998). "Can copper be an elicitor?" *Phytoma* 512: 41-46.
- Crawford, M. J. and Goldberg, D. E. (1998). "Role for the *Salmonella* flavohemoglobin protection from nitric oxide." *J Biol Chem* 273(20): 12543-7.
- Cross, F. R. and Tinkelenberg, A. H. (1991). "A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle." *Cell* 65(5): 875-83.
- Daboussi, M. J. (1997). "Fungal transposable elements and genome evolution." *Genetica* 100: 253-260.
- de Berrazueta, J. R. (1999). "[The Nobel Prize for nitric oxide. The unjust exclusion of Dr. Salvador Moncada]." *Rev Esp Cardiol* 52(4): 221-6.

- de Bruin, R. A., Kalashnikova, T. I., Chahwan, C., McDonald, W. H., Wohlschlegel, J., Yates, J., Russell, P., Wittenberg, C. (2006). "Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback." *Mol Cell* 23(4): 483-96.
- de Jesus-Berrios, M., Liu, L., Nussbaum, J. C., Cox, G. M., Stamler, J. S., Heitman, J. (2003). "Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence." *Curr Biol* 13(22): 1963-8.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012). "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology." *Mol Plant Pathol* 13(4): 414-30.
- del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C., Brouquisse, R., Puppo, A., Boscari, A. (2011). "Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sino-rhizobium meliloti* symbiosis." *New Phytologist*(191): 405-417.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998). "Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance." *Nature* 394(6693): 585-8.
- 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." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13454-9.
- Denarie, J., Debelle, F., Rosenberg, C. (1992). "Signaling and host range variation in nodulation." *Annu Rev Microbiol* 46: 497-531.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., Brygoo, Y. (1995). "Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*." *Appl Environ Microbiol* 61(1): 103-8.
- Dobinson, K. F. and Hamer, J. E. (1993). "The ebb and flow of a fungal genome." *Trends Microbiol* 1(9): 348-52.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Willson, A. (2010). "Geneious V5.5<<http://www.geneious.com>>."
- Ducruet, A. P., Vogt, A., Wipf, P., Lazo, J. S. (2005). "Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 725-50.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D. F. (1998). "Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 10328-33.
- Elad, Y. and Stewart, A. (2004). "Microbial control of *Botrytis spp.*" In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. 223-241.

- Ellenberger, T. (1994). "Getting a grip on DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains." *Current Opinion in Structural Biology* 4(1): 12-21.
- Elmer, P. A. G. and Michailides, T. J. (2004). "Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops." 243-272.
- Enserink, J. M. and Kolodner, R. D. (2010). "An overview of Cdk1-controlled targets and processes." *Cell Div* 5: 11.
- Epton, H. A. S. and Richmond, D. V. (1980). "Formation, structure and germination of conidia." In: *The Biology of Botrytis*. (J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis, eds), pp. 41-83. Academic Press, London.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell* 33(2): 389-96.
- Faretra, F., Antonacci, E., Pollastro, S. (1988). "Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*." *Journal of General Microbiology* 134(9): 8.
- Faretra, F. and Grindle, M. (1992). "Genetic studies of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*)." *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B.) Wageningen, The Netherlands: Pudoc Scientific Publishers: 7-17.
- Felix, M. A., Labbe, J. C., Doree, M., Hunt, T. Karsenti, E. (1990). "Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase." *Nature* 346(6282): 379-82.
- Feng, B. and Marzluf, G. A. (1996). "The regulatory protein NIT4 that mediates nitrate induction in *Neurospora crassa* contains a complex tripartite activation domain with a novel leucine-rich, acidic motif." *Curr Genet* 29(6): 537-48.
- Fernandes, M., Keller, N. P., Adams, T. H. (1998). "Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis." *Mol Microbiol* 28(6): 1355-65.
- Fernandez-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., Lorenzo, O. (2011). "Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45): 18506-11.
- Ferre-D'Amare, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B., Burley, S. K. (1993). "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain." *Nature* 363(6424): 38-45.
- Ferrer, M. A. and Barceló, A. R. (1999). "Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*." *Plant Cell Environment*(22): 891-897.

- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C., Debieu, D. (2008). "Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*." *Antimicrob Agents Chemother* 52(11): 3933-40.
- Finkers, R., van den Berg, P., van Berloo, R., ten Have, A., van Heusden, A. W., van Kan, J. A., Lindhout, P. (2007). "Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato." *Theor Appl Genet* 114(4): 585-93.
- Finkers, R., van Heusden, A. W., Meijer-Dekens, F., van Kan, J. A., Maris, P., Lindhout, P. (2007). "The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*." *Theor Appl Genet* 114(6): 1071-80.
- Floryszak-Wieczorek, 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 Phytol* 175(4): 718-30.
- Freschi, L., Rodrigues, M. A., Domingues, D. S., Purgatto, E., Van Sluys, M. A., Magalhaes, J. R., Kaiser, W. M., Mercier, H. (2010). "Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants." *Plant Physiol* 152(4): 1971-85.
- Garcia-Pedrajas, M. D., Nadal, M., Kapa, L. B., Perlin, M. H., Andrews, D. L., Gold, S. E. (2008). "DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method." *Fungal Genet Biol* 45(4): 379-88.
- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Martin, L. A., Salzman, A. L. (1998). "Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10378-83.
- Gas, E., Flores-Perez, U., Sauret-Gueto, S., Rodriguez-Concepcion, M. (2009). "Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism." *Plant Cell* 21(1): 18-23.
- Gerhart, J., Wu, M., Kirschner, M. (1984). "Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs." *J Cell Biol* 98(4): 1247-55.
- Giba, Z. (1998). "The effect of NO-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seed." *Plant Growth Regulation*(26): 175-181.
- Gomez, D., Cubero, B., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. (2002). "PrnA, a Zn2Cys6 activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for in vivo binding." *Mol Microbiol* 44(2): 585-97.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X., Peng, Y. (2007). "L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*." *Fungal Genet Biol* 44(12): 1368-79.

- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M. H., Levis, C. (2004). "The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves." *Mol Microbiol* 51(3): 619-29.
- Govrin, E. M. and Levine, A. (2000). "The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*." *Curr Biol* 10(13): 751-7.
- Grallert, A., Grallert, B., Ribar, B., Sipiczki, M. (1998). "Coordination of initiation of nuclear division and initiation of cell division in *Schizosaccharomyces pombe*: genetic interactions of mutations." *J Bacteriol* 180(4): 892-900.
- Graziano, M. and Lamattina, L. (2005). "Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story." *Trends Plant Sci* 10(1): 4-8.
- Guimarães, R. L., Chetelat, R.T., Stotz, H.U. (2004). "Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids and involves induced hyphal death " *European Journal of Plant Pathology* 110: 13-24.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." *Syst Biol* 59(3): 307-21.
- Guo, K., Andres, V., Walsh, K. (1998). "Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells." *Circulation* 97(20): 2066-72.
- Guo, F. Q., Okamoto, M., Crawford, N. M. (2003). "Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling." *Science* 302(5642): 100-3.
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., van Dongen, J. T. (2011a). "On the origins of nitric oxide." *Trends Plant Sci* 16(3): 160-8.
- Gurr, G. M., Wratten, S.D., Barbosa, P. (2000). "Success in conservation biological control of arthropods." 105-132.
- Gusarov, I., Starodubtseva, M., Wang, Z. Q., McQuade, L., Lippard, S. J., Stuehr, D. J., Nudler, E. (2008). "Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner." *J Biol Chem* 283(19): 13140-7.
- Haase, S. B. and Reed, S. I. (1999). "Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle." *Nature* 401(6751): 394-7.
- Hamada, W., Soulie, M. C., Malfatti, P., Bompeix, G., Boccara, M. (1997). "Stability and modulated expression of a hygromycin resistance gene integrated in *Botrytis cinerea* transformants." *FEMS Microbiol Lett* 154(2): 187-93.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F. R. (1991). "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Methods Enzymol* 204: 63-113.

- Hancock, J. T., Neill, S. J., Wilson, I. D. (2011). "Nitric oxide and ABA in the control of plant function." *Plant Sci* 181(5): 555-9.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., Reid, B. J. (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." *Science* 183(4120): 46-51.
- Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-34.
- Hausladen, A., Gow, A. J., Stamler, J. S. (1998). "Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24): 14100-5.
- Hayes, J. D., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G. J., Wolf, C. R., Yamamoto, M. (2000). "The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin." *Biochem Soc Trans* 28(2): 33-41.
- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M., Pei, Z. M. (2004). "Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition." *Science* 305(5692): 1968-71.
- Hilber, U. W., Bodmer, M., Smith, F. D., Koller, W. (1994). "Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*." *Curr Genet* 25(2): 124-7.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* 411(6835): 366-74.
- Hong, J. K., Yun, B. W., Kang, J. G., Raja, M. U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., Loake, G. J. (2008). "Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance." *J Exp Bot* 59(2): 147-54.
- Howitt, R. L., Beever, R.E., Pearson, M.N., Forster, R.L.S. (1995). "Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*." *Mycological Research* 99: 1472-1478.
- Howitt, R. L. (1998). "Characterisation of mycoviruses in the plant pathogenic fungus, *Botrytis cinerea* ".
- Howitt, R. L., Beever, R. E., Pearson, M. N., Forster, R. L. (2001). "Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses." *J Gen Virol* 82(Pt 1): 67-78.
- Hromatka, B. S., Noble, S. M., Johnson, A. D. (2005). "Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence." *Mol Biol Cell* 16(10): 4814-26.
- Huang, D., Kaluarachchi, S., van Dyk, D., Friesen, H., Sopko, R., Ye, W., Bastajian, N., Moffat, J., Sassi, H., Costanzo, M., Andrews, B. J. (2009). "Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1 transcription in budding yeast." *PLoS Biol* 7(9): e1000188.

- Jackson, R. S. (2008a). "Vineyard practice: Disease, pest and weed control." *Wine Science: Principles and Applications*: 175-212.
- Jacometti, M. A., Wratten, S.D., Walker, M. (2010). "Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 154-172.
- Jacometti, M. A., Wratten, S.D., Walter, M. (2010). "Understorey management increases grape quality, yield and resistance to *Botrytis cinerea* " *Agriculture, Ecosystems and Environment* 122: 349-356.
- Johnson, E. G., Sparks, J. P., Dzikovski, B., Crane, B. R., Gibson, D. M., Loria, R. (2008). "Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals." *Chem Biol* 15(1): 43-50.
- Karlinsey, J. E., Bang, I. S., Becker, L. A., Frawley, E. R., Porwollik, S., Robbins, H. F., Thomas, V. C., Urbano, R., McClelland, M., Fang, F. C. (2012). "The NsrR regulon in nitrosative stress resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Mol Microbiol* 85(6): 1179-93.
- Kauffmann, A., Gentleman, R. Huber, W. (2009). "arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data." *Bioinformatics* 25(3): 415-6.
- Klepper, L. (1979). "Nitric oxide (NO) and nitrogen -dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants." *Atmos. Environ.*(13): 537-542.
- Kong, W., Huang, C., Chen, Q., Zou, Y., Zhang, J. (2012a). "Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. tuoliensis." *Fungal Genet Biol* 49(1): 15-20.
- Kong, W. W., Huang, C. Y., Chen, Q., Zou, Y. J., Zhao, M. R., Zhang, J. X. (2012b). "Nitric oxide is involved in the regulation of trehalose accumulation under heat stress in *Pleurotus eryngii* var. tuoliensis." *Biotechnol Lett* 34(10): 1915-9.
- Koshland, D. E., Jr. (1992). "The molecule of the year." *Science* 258(5090): 1861.
- Koutelou, E., Hirsch, C. L., Dent, S. Y. (2010). "Multiple faces of the SAGA complex." *Curr Opin Cell Biol* 22(3): 374-82.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S., Takisawa, H., Nojima, H. (1995). "Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor." *Cell* 81(4): 601-9.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davies, R. W., Arst, H. N., Jr. (1990). "The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger." *Embo J* 9(5): 1355-64.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1991). "The *cdc25* protein controls tyrosine dephosphorylation of the *cdc2* protein in a cell-free system." *Cell* 64(5): 903-14.



- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B. W., Hwang, B. H., Pallas, J. A., Kang, J. G., Loake, G. J. (2012). "AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*." *Planta* 236(3): 887-900.
- Lancaster, J. R., Jr. (1997). "A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide." *Nitric Oxide* 1(1): 18-30.
- Laxalt, A. M., Raho, N., Have, A. T., Lamattina, L. (2007). "Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells." *J Biol Chem* 282(29): 21160-8.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., Feelisch, M., Vierling, E. (2008). "Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 20(3): 786-802.
- Lei, M. and Tye, B. K. (2001). "Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex." *J Cell Sci* 114(Pt 8): 1447-54.
- Lenburg, M. E. and O'Shea, E. K. (1996). "Signaling phosphate starvation." *Trends Biochem Sci* 21(10): 383-7.
- Leroch, M., Kleber, A., Silva, E., Coenen, T., Koppenhofer, D., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D., Hahn, M. (2013). "Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage." *Eukaryot Cell* 12(4): 614-26.
- Leung, H., Nelson, R.J., Leach, J.E. (1993). "Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria." *Advances in Plant Pathology* 10: 157-205.
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. (1997). "Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*." *Mol Gen Genet* 254(6): 674-80.
- Li, H. and Poulos, T. L. (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." *J Inorg Biochem* 99(1): 293-305.
- Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J., Stamler, J. S. (2000). "Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4672-6.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Darnell, J. (1995). "Molecular Cell Biology Third Edition." Scientific American Books, Inc.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Kaiser, C., Darnell, J, Krieguer, C. (2004). "Molecular Cell Biology Fifth Edition." Scientific American Books, Inc.
- Lombardo, Graziano, M., Polacco, J. C., Lamattina, L. (2006). "Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development." *Plant Signal Behav* 1(1): 28-33.
- Lombardo, M. C. and Lamattina, L. (2012) "Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in *Arabidopsis* root hair growth." *J Exp Bot* 63(13): 4875-85.

- Lyon, G. D., Goodman, B.A., Williamson, B. (2004). "*Botrytis* perturbs redox processes as an attack strategy in plants ": 119-141.
- Ma, P. C., Rould, M. A., Weintraub, H., Pabo, C. O. (1994). "Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation." *Cell* 77(3): 451-9.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., Ninnemann, H. (2001). "Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*." *Plant Physiol* 126(3): 1323-30.
- Majumdar, U., Biswas, P., Subhra Sarkar, T., Maiti, D., Ghosh, S. (2012). "Regulation of cell cycle and stress responses under nitrosative stress in *Schizosaccharomyces pombe*." *Free Radic Biol Med* 52(11-12): 2186-200.
- Marla, S. S., Lee, J., Groves, J. T. (1997). "Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14243-8.
- Marshall, H. E., Merchant, K., Stamler, J. S. (2000). "Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression." *Faseb J* 14(13): 1889-900.
- Masloff, S., Poggeler, S., Kuck, U. (1999). "The pro1(+) gene from *Sordaria macrospora* encodes a C6 zinc finger transcription factor required for fruiting body development." *Genetics* 152(1): 191-9.
- Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). "Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes." *J Exp Zool* 177(2): 129-45.
- Masui, Y. and Clarke, H. J. (1979). "Oocyte maturation." *Int Rev Cytol* 57: 185-282.
- Mayer, B. and Hemmens, B. (1997). "Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells." *Trends Biochem Sci* 22(12): 477-81.
- Meiser, J., Lingam, S., Bauer, P. (2011). "Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide." *Plant Physiol* 157(4): 2154-66.
- Meiser, J. and Bauer, P. (2012). "Looking for the hub in Fe signaling." *Plant Signal Behav* 7(6): 688-90.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." *Science* 266(5182): 66-71.
- Miles, T. D., Jakovljevic, J., Horsey, E. W., Harnpicharnchai, P., Tang, L., Woolford, J. L., Jr. (2005). "Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes." *Mol Cell Biol* 25(23): 10419-32.
- Milgroom, M. G. (1996). "Recombination and the multilocus structure of fungal populations." *Annu Rev Phytopathol* 34: 457-77.

- Mingorance, C., Herrera, M. D., Alvarez De Sotomayor, M. (2009). "Mechanism involved in aged-related endothelial dysfunction." *Med Clin (Barc)* 132(2): 62-9.
- Missall, T. A. and Lodge, J. K. (2005). "Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryot Cell* 4(2): 487-9.
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M., Magalhaes, J. R., Salgado, I. (2005). "Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*." *FEBS Lett* 579(17): 3814-20.
- Moncada, S. (1992). "The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway." *Acta Physiol Scand* 145(3): 201-27.
- Moreau, M., Lee, G. I., Wang, Y., Crane, B. R., Klessig, D. F. (2008). "AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 283(47): 32957-67.
- Mundy, D. C. (2008). "A review of the direct and indirect effects of nitrogen on *Botrytis* bunch rot in wine grapes." *New Zealand Plant Protection* 61: 306-310.
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T. (2002). "Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile." *Mycol Res* 106: 594-601.
- Mur, L. A., Carver, T. L., Prats, E. (2006). "NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions." *J Exp Bot* 57(3): 489-505.
- Mur, L. A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., Hall, M. A., Harren, F. J., Hebelstrup, K. H., Gupta, K. J. (2013). "Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge." *AoB Plants* 5: pls052.
- Murray, A. W., Solomon, M. J., Kirschner, M. W. (1989). "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity." *Nature* 339(6222): 280-6.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* 78(6): 915-8.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J. T. (2002). "Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells." *Plant Physiol* 128(1): 13-6.
- Newaz, M. A., Yousefipour, Z., Oyekan, A. (2006). "Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD(P)H oxidase-dependent." *J Cardiovasc Pharmacol* 48(3): 88-94.
- Ninnemann, H. and Maier, J. (1996). "Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*." *Photochem Photobiol* 64(2): 393-8.
- Nishimura, H., Hayamizu, T., Yanagisawa, Y. (1986). "Reduction of nitrogen oxide (NO<sub>2</sub>) to nitrogen oxide (NO) by rush and other plants." *Environ Sci Technol* 20(4): 413-6.

- Nittler, M. P., Hocking-Murray, D., Foo, C. K., Sil, A. (2005). "Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species." *Mol Biol Cell* 16(10): 4792-813.
- Noritake, T., Kawakita, K, Doke, N. (1996). "Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues " *Plant and Cell Physiology*(37): 113-116.
- Nurse, P. and Bissett, Y. (1981). "Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast." *Nature* 292(5823): 558-60.
- Oliver, R. P. (1992). "Transposons in filamentous fungi ": 3-11.
- Orlando, D. A., Lin, C. Y., Bernard, A., Wang, J. Y., Socolar, J. E., Iversen, E. S., Hartemink, A. J., Haase, S. B. (2008). "Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators." *Nature* 453(7197): 944-7.
- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002). "Nitric oxide is required for root organogenesis." *Plant Physiol* 129(3): 954-6.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lamattina, L. (2003). "Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process." *Plant Physiol* 132(3): 1241-8.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C., Lamattina, L. (2004). "Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development." *Plant Physiol* 135(1): 279-86.
- Palmieri, M. C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., Lindermayr, C. (2008). "Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach." *J Exp Bot* 59(2): 177-86.
- Pan, T. and Coleman, J. E. (1990). "GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6): 2077-81.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(4): 1286-90.
- Patel, R. M., Van Kan, J. A., Bailey, A. M., Foster, G. D. (2010). "Inadvertent gene silencing of argininosuccinate synthase (*bcass1*) in *Botrytis cinerea* by the pLOB1 vector system." *Mol Plant Pathol* 11(5): 613-24.
- Pezet, R. and Pont, V. (1990). "Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers." *Journal of Phytopathology* 129: 19-30.
- Pineda-Molina, E. and Lamas, S. (2001). "Nitric oxide as a regulator of gene expression: studies with the transcription factor proteins cJun and p50." *Biofactors* 15(2-4): 113-5.
- Piterková, J., Hofman, J., Mieslerová, B., Sedlářová, M., Luhová, L., Lebeda, A., Petrivalsky, M. (2011). "Dual role of nitric oxide in *Solanum spp.-Oidium neolycopersici* interactions." *Environmental and Experimental Botany* 74: 37-44.

- Planchet, E. and Kaiser, W. M. (2006). "Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources." *J Exp Bot* 57(12): 3043-55.
- Plesken, C., Westrich, L.-D., Hanh, M. (2014). "Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*." *Plan Pathology*: 9.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., Delledonne, M. (2003). "Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Plant Microbe Interact* 16(12): 1094-105.
- Pramila, T., Wu, W., Miles, S., Noble, W. S., Breeden, L. L. (2006). "The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle." *Genes Dev* 20(16): 2266-78.
- Prats, E., Carver, T. L., Mur, L. A. (2008). "Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*." *Res Microbiol* 159(6): 476-80.
- Prins, T. W., Wagemakers, L., Schouten, A., van Kan, J. A. (2000). "Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* double dagger." *Mol Plant Pathol* 1(3): 169-78.
- Ranjan, P. and Heintz, N. H. (2006). "S-phase arrest by reactive nitrogen species is bypassed by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases PP1/PP2A." *Free Radic Biol Med* 40(2): 247-59.
- Rathel, T. R., Leikert, J. Ju, Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2003). "Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro." *Biol Proced Online* 5: 136-142.
- Reed, S. I. and Wittenberg, C. (1990). "Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(15): 5697-701.
- Reglinski, T., Poole, R.P., Whitaker, G., Hoyte, S.M. (1997). "Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves." *Plant Pathology* 46: 716-721.
- Roberts, B. T., Farr, K. A., Hoyt, M. A. (1994). "The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase." *Mol Cell Biol* 14(12): 8282-91.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W. M. (2002). "Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro." *J Exp Bot* 53(366): 103-10.
- Russell, P., Moreno, S., Reed, S. I. (1989). "Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts." *Cell* 57(2): 295-303.
- Samalova, M., Johnson, J., Illes, M., Kelly, S., Fricker, M., Gurr, S. (2012). "Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection." *New Phytol* 197(1): 207-22.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning : a laboratory manual."
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annu Rev Biochem* 73: 39-85.
- Santamaria, R. and Pierre, P. (2012). "Voronto: mapper for expression data to ontologies." *Bioinformatics* 28(17): 2281-2.
- Santhanam, L., Lim, H. K., Lim, H. K., Miriel, V., Brown, T., Patel, M., Balanson, S., Ryoo, S., Anderson, M., Irani, K., Khanday, F., Di Costanzo, L., Nyhan, D., Hare, J. M., Christianson, D. W., Rivers, R., Shoukas, A., Berkowitz, D. E. (2007). "Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction." *Circ Res* 101(7): 692-702.
- Sarkar, T. S., Biswas, P., Ghosh, S. K., Ghosh, S. (2014). "Nitric Oxide Production by Necrotrophic Pathogen *Macrophomina phaseolina* and the Host Plant in Charcoal Rot Disease of Jute: Complexity of the Interplay between Necrotroph-Host Plant Interactions." *PLoS One* 9(9): e107348.
- Sarver, A. and DeRisi, J. (2005). "Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 16(10): 4781-91.
- Scazzocchio, C. (2000). "The fungal GATA factors." *Curr Opin Microbiol* 3(2): 126-31.
- Scheler, C., Durner, J., Astier, J. (2013). "Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions." *Curr Opin Plant Biol* 16(4): 534-9.
- Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R., Buchner, I., Reichenauer, T., Guldener, U., Strauss, J. (2010). "Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism." *Mol Microbiol* 78(3): 720-38.
- Schmidt, H. H. and Walter, U. (1994). "NO at work." *Cell* 78(6): 919-25.
- Schumacher, J., de Larrinoa, I. F., Tudzynski, B. (2008). "Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants." *Eukaryot Cell* 7(4): 584-601.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Viaud, M., Tudzynski, P. (2014). "The transcription factor BcLTF1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea*." *PLoS Genet* 10(1): e1004040.
- Seligman, K., Saviani, E. E., Oliveira, H. C., Pinto-Maglio, C. A., Salgado, I. (2008). "Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants." *Plant Cell Physiol* 49(7): 1112-21.
- Shelest, E. (2008). "Transcription factors in fungi." *FEMS Microbiol Lett* 286(2): 145-51.

- Shirane, N., Masuko, M., Hayashi, Y. (1988). "Nuclear behaviour and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*" *Phytopathology* 78: 1627-1630.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y. F., Talbot, N. J., Sharon, A. (2011). "Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection." *PLoS Pathog* 7(8): e1002185.
- Singh, K., Nizam, S., Sinha, M., Verma, P. K. (2012). "Comparative transcriptome analysis of the necrotrophic fungus *Ascochyta rabiei* during oxidative stress: insight for fungal survival in the host plant." *PLoS One* 7(3): e33128.
- Smyth, G. (2005). "limma: Linear Models for Microarray Data. Bioconductor package version 3.16.8."
- Song, N. K., Jeong, C.S., Choi, H.S. (2000). "Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes*." *Mycologia*(92): 1027-1032.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., Futcher, B. (1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization." *Mol Biol Cell* 9(12): 3273-97.
- Srivastava, N., Gonugunta, V. K., Puli, M. R., Raghavendra, A. S. (2009). "Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*." *Planta* 229(4): 757-65.
- Staats, M., van Baarlen, P., van Kan, J. A. (2005). "Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity." *Mol Biol Evol* 22(2): 333-46.
- Stamler, J. S. (1994). "Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide." *Cell* 78(6): 931-6.
- Steenbergen, J. N., Shuman, H. A., Casadevall, A. (2001). "*Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15245-50.
- Swenson, K. I., Farrell, K. M., Ruderman, J. V. (1986). "The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus oocytes*." *Cell* 47(6): 861-70.
- Takahata, S., Yu, Y., Stillman, D. J. (2009). "The E2F functional analogue SBF recruits the Rpd3(L) HDAC, via Whi5 and Stb1, and the FACT chromatin reorganizer, to yeast G1 cyclin promoters." *Embo J* 28(21): 3378-89.
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., Delpón, E. (2006). "Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca." *Rev Esp Cardiol*(6): 3A-20A.
- Tanaka, T., Knapp, D., Nasmyth, K. (1997). "Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs." *Cell* 90(4): 649-60.

- Tatoyan, A. and Giulivi, C. (1998). "Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 273(18): 11044-8.
- ten Have, A., van Berloo, R., Lindhout, P., Van Kan, J. A.L. (2007). "Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato." *European Journal of Plant Pathology* 117: 153-166.
- Tillmann, A., Gow, N. A., Brown, A. J. (2011). "Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast." *Biochem Soc Trans* 39(1): 219-23.
- Todd, R. B., Andrianopoulos, A., Davis, M. A., Hynes, M. J. (1998). "FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences." *Embo J* 17(7): 2042-54.
- Tomko, R. J., Jr., Azang-Njaah, N. N., Lazo, J. S. (2009). "Nitrosative stress suppresses checkpoint activation after DNA synthesis inhibition." *Cell Cycle* 8(2): 299-305.
- Turrion-Gomez, J. L. (2008). "Papel del óxido nítrico en la infección de plantas por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*." Tesis Doctoral.
- Turrion-Gomez, J. L., Eslava, A. P., Benito, E. P. (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 Genet Biol* 47(5): 484-96.
- Turrion-Gomez, J. L. and Benito, E. P. (2011). "Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant." *Mol Plant Pathol* 12(6): 606-16.
- Tye, B. K. and Sawyer, S. (2000). "The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from nonidentical parts." *J Biol Chem* 275(45): 34833-6.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Futcher, B. (1993). "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins." *Embo J* 12(5): 1955-68.
- Typas, M., Mavridou, A., Kramer, K. (1998). "Mitochondrial DNA differences provide maximum intra-specific polymorphism in the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*, and allow isolate detection/identification." 227-238.
- Ullmann, B. D., Myers, H., Chiranand, W., Lazzell, A. L., Zhao, Q., Vega, L. A., Lopez-Ribot, J. L., Gardner, P. R., Gustin, M. C. (2004). "Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* 3(3): 715-23.
- Vaillancourt, L. and Hanau, R. (1992). "Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum " *Exp. Mycol.* 16: 219-229.
- Vallejo, I., Carbú, M., Muñoz, F., Rebordinos, L., Cantoral, J.M. (2002). "Inheritance of chromosome-length polymorphisms in the phytopathogenic ascomycete *Botryotinia fuckeliana* (anam. *Botrytis cinerea*) " *Mycological Research* 106: 1075-1085.



- van Baarlen, P., Staats, M., van Kan, J.A.L. (2004). "Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*" *Mol Plant Pathol*(5): 559-574.
- Van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Luscher, T. (2000). "Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging." *J. Exp. Med* 192(12): 1731-1743.
- van Kan, J. A. L. (2006). "Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen." *Trends Plant Sci* 11(5): 247-53.
- Vanin, A. F., Svistunenko, D. A., Mikoyan, V. D., Serezhenkov, V. A., Fryer, M. J., Baker, N. R., Cooper, C. E. (2004). "Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves." *J Biol Chem* 279(23): 24100-7.
- Vieira, A. L., Linares, E., Augusto, O., Gomes, S. L. (2009). "Evidence of a Ca<sup>2+</sup>-(\*NO)-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*." *Fungal Genet Biol* 46(8): 575-84.
- Walker, A. S., Gautier, A. L., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le, P., Cheur P., Dupont, J., Fournier, E. (2011). "*Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*." *Phytopathology* 101(12): 1433-45.
- Wang, J. and Higgins, V. J. (2005). "Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*." *Fungal Genet Biol* 42(4): 284-92.
- Wang, Z. Q., Lawson, R. J., Buddha, M. R., Wei, C. C., Crane, B. R., Munro, A. W., Stuehr, D. J. (2007). "Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 282(4): 2196-202.
- Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., Ridgway, H. J. (2006). "Approaches to functional genomics in filamentous fungi." *Cell Res* 16(1): 31-44.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., Durner, J. (2001). "Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells." *Trends Plant Sci* 6(4): 177-83.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J. A. (2007). "*Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease." *Mol Plant Pathol* 8(5): 561-80.
- Wittenberg, C. and Reed, S. I. (2005). "Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes." *Oncogene* 24(17): 2746-55.
- Xu, L. L., Lai, Y. L., Wang, L., Liu, X. Z. (2010). "Effects of abscisic acid and nitric oxide on trap formation and trapping of nematodes by the fungus *Drechlerella stenobrocha* AS6.1." *Fungal Biol* 115(2): 97-101.

- Yamada, H., Kumada, K., Yanagida, M. (1997). "Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast." *J Cell Sci* 110 ( Pt 15): 1793-804.
- Yamasaki, H. (2005). "The NO world for plants: achieving balance in an open system. ." *Plant Cell Environment* 28: 78-84.
- Yamasaki, H. and Sakihama, Y. (2000). "Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species." *FEBS Lett* 468(1): 89-92.
- Yan, H., Merchant, A. M., Tye, B. K. (1993). "Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast." *Genes Dev* 7(11): 2149-60.
- Yun, B. W., Spoel, S. H., Loake, G. J. (2012). "Synthesis of and signalling by small, redox active molecules in the plant immune response." *Biochim Biophys Acta* 1820(6): 770-6.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M. C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L. S., Wanker, E. E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., Durner, J. (2006). "Plant nitric oxide synthase: a never-ending story?" *Trends Plant Sci* 11(11): 524-5; author reply 526-8.
- Zhao, M., Zhao, X., Wu, Y., Zhang, L. (2007). "Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant." *J Plant Physiol* 164(6): 737-45.
- Zheng, W., Liu, Y., Pan, S., Yuan, W., Dai, Y., Wei, J. (2011). "Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of polyphenols by *Inonotus obliquus*." *Appl Microbiol Biotechnol* 90(5): 1763-72.
- Zhou, S., Fushinobu, S., Kim, S. W., Nakanishi, Y., Maruyama, J., Kitamoto, K., Wakagi, T., Shoun, H. (2011). "Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*." *Fungal Genet Biol* 48(2): 200-7.
- Zhou, S., Narukami, T., Nameki, M., Ozawa, T., Kamimura, Y., Hoshino, T., Takaya, N. (2012). "Heme-biosynthetic porphobilinogen deaminase protects *Aspergillus nidulans* from nitrosative stress." *Appl Environ Microbiol* 78(1): 103-9.
- Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A., Kuppusamy, P. (1995). "Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues." *Nat Med* 1(8): 804-9.