

**CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (CIALE)  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
ÁREA DE GENÉTICA**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA INFECCIÓN DE  
PLANTAS POR EL HONGO NECROTROFO *BOTRYTIS*  
*CINEREA***

**Juan Luis Turrión Gómez**

**TESIS DOCTORAL**

**2008**



# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (CIALE)  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
ÁREA DE GENÉTICA

## PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA INFECCIÓN DE PLANTAS POR EL HONGO NECROTROFO *BOTRYTIS* *CINEREA*

Memoria que presenta D. Juan Luis Turrión Gómez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 14 de julio de 2008



**DR. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA, Y DR. ARTURO PÉREZ ESLAVA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Papel del óxido nítrico en la infección de plantas por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*”, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, que ha sido realizada por D. Juan Luis Turrión Gómez bajo nuestra dirección, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética.

En Salamanca, a 14 de Julio de 2008

Fdo. Dr. Ernesto Pérez Benito

Fdo. Dr. Arturo Pérez Eslava



**DR. ERNESTO PÉREZ BENITO, PROFESOR TITULAR DEL  
ÁREA DE GENÉTICA Y DR. ARTURO PÉREZ ESLAVA,  
CATEDRÁTICO DE GENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA**

**CERTIFICAMOS:**

Que D. Juan Luis Turrión Gómez ha realizado en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética el trabajo titulado “Papel del óxido nítrico en la infección de plantas por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*”, bajo nuestra dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca, a 14 de Julio de 2008.

Fdo. Dr. Ernesto Pérez Benito

Fdo. Dr. Arturo Pérez Eslava





**Dr. ANGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

**CERTIFICO:**

Que la memoria titulada “Papel del óxido nítrico en la infección de plantas por el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea*”, presentada por D. Juan Luis Turrión Gómez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores Ernesto Pérez Benito y Arturo Pérez Eslava, en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, expido el presente certificado en Salamanca, a 14 de Julio de 2008.

Fdo. Dr. Angel Domínguez Olavarri



# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el MEC, proyecto AGL2005-06049, y la Universidad de Salamanca. El trabajo ha sido realizado en las instalaciones del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y en el Centro Hispanoluso de Investigaciones Agrarias, CIALE.

Quiero expresar especial gratitud a mi supervisor, el Dr. Ernesto Pérez Benito, en particular por sus enriquecedoras discusiones científicas, dedicación, consejos y constante apoyo.

También dar las gracias al Dr. Arturo Pérez Eslava, creador del grupo de Genética de Hongos en la Universidad de Salamanca, por su apoyo.

A Maribel, Chema, Enrique y Serenella por hacerme sentir parte de un grupo y prestarse a echar una mano cuando se necesitaba. Gracias a Mike por su ayuda con las relaciones filogenéticas y la NOS misteriosa.

A mis compañeros de laboratorio Thais, Elvira, Norman, Jose, Raúl, Raúl2, Katy, Brisa, Marisa, los Erasmus polacos y a todos los que han pasado por el laboratorio, por su compañerismo. A David por las películas, protocolos y el apoyo moral durante estos años. A Choni por la ayuda con la PCR cuantitativa, el microscopio confocal y la edición. A Fernando por todos los litros de medio, profesionalidad y el sudor empleados que han sido esenciales para el buen desarrollo de esta tesis. A Miguel Angel por su organización.

A Juan Pedro Bolaños y todo su equipo por haber contribuido con el electrodo de NO, con el DETA/NO, el gas de NO y sus consejos sobre el NO. A Ramón Santamaría por su ayuda con los geles SDS-PAGE. A Óscar Lorenzo por haber contribuido en la tinción DAF-2DA y haber proporcionado las cepas de *Arabidopsis*. A Jan van Kan y su equipo por sus consejos, ayuda, críticas constructivas y cepas de *Botrytis* enviadas. A Paul Tudzynsky y Caroline Levis por las cepas de *Botrytis* suministradas. A Alex Idnurm por proporcionar las cepas de levadura y el plásmido pYES. A Steve, Jose Luis y Hellen por haberme enseñado a investigar, ser minucioso, profesional y los secretos de la biología molecular.

Gracias a mis padres, Narciso e Isabel, por haberme apoyado en los momentos difíciles. A Narci, Concha, Aurora, Jesús, Paula, Javi y Miguel por su ayuda y cuidados. A Carlos, Jaime, Albert, Roje, Javi, Juan, Victor por su apoyo moral. A mi familia y todos mis amigos de Cantabria incluidos los Mamelones Recucidos, siempre nos quedará la música.

A Blanca por su constante apoyo, tanto personal como profesional, y ánimo frente a la adversidad. Gracias.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas y organismos que con su apoyo han permitido el trabajo científico que se presenta a continuación.

*God does not play dice*

*A. Einstein*



## ÍNDICES





# ÍNDICE

<b>ÍNDICES</b> .....	<b>I</b>
ÍNDICE.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XI
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
RESUMEN .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1- <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	9
1.1. <i>B. cinerea</i> en vid .....	9
1.1.1. Sintomatología .....	9
1.1.2. Daños cuantitativos .....	11
1.1.3. Daños cualitativos .....	12
1.1.4. Sensibilidad del huésped ( <i>Vitis vinifera</i> ).....	13
1.1.5. Factores que afectan la agresividad del patógeno .....	14
1.1.5.1. Influencia de los factores ambientales .....	14
1.1.5.2. Influencia de los factores biológicos.....	15
1.1.5.3. Influencia de factores genéticos.....	15
1.2. <i>B. cinerea</i> en otros huéspedes.....	17
1.3. Sistemática y descripción .....	18
1.4. Biología del hongo.....	19
1.5. Métodos de lucha.....	21
1.5.1. Control Químico .....	21
1.5.2. Control Biológico.....	23
1.5.3. Prácticas culturales.....	23
1.5.4. Mejora genética.....	24
2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN <i>B. CINEREA</i> .....	25
2.1. Estrategias experimentales para el estudio de los mecanismos de patogenicidad en <i>B. cinerea</i> .....	25
2.2. Métodos de análisis de la función génica en <i>B. cinerea</i> .....	27
2.2.1. Mutagénesis dirigida por disrupción génica.....	28
2.2.2. Mutagénesis dirigida por reemplazamiento génico .....	28
2.2.3. Mutagénesis aleatoria por inserciones de T-DNA.....	28
2.2.4. Silenciamiento génico por ARN de interferencia.....	29
2.3. Mecanismos de señalización durante la patogénesis.....	29
2.3.1. Ruta de señalización dependiente de la AMPc.....	30
2.3.2. Ruta de señalización controlada por la MAP kinasa .....	31
2.3.3. Ruta de señalización dependiente Ca <sup>2+</sup> /calmodulina.....	31
2.3.4. Ruta de señalización de las proteínas GTPasas.....	32
2.3.5. Sensores y receptores.....	32
2.4. Moléculas, mecanismos y procesos implicados en la patogenicidad de <i>B. cinerea</i> .....	33
2.4.1. Efectores fúngicos.....	33
2.4.1.1. Enzimas .....	33
2.4.1.2. Compuestos fitotóxicos.....	35
2.4.1.2.1. Metabolitos fitotóxicos .....	35
2.4.1.2.2. NEP .....	35
2.4.1.2.3. Ácido oxálico .....	35
2.4.2. Participación de <i>B. cinerea</i> en la muerte celular programada del huésped.....	36
2.4.3. Evasión de los mecanismos de defensa de la planta.....	37
3. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO .....	39
3.1. Óxido Nítrico .....	39
3.2. Papel del NO en el establecimiento de interacciones planta-patógeno.....	40
3.2.1. Producción de NO en plantas.....	40
3.2.2. NO en la Respuesta de Hipersensibilidad (HR).....	42

3.2.3. Señalización de NO en planta.....	43
3.3. Papel del NO en <i>B. cinerea</i> .....	44
4. FLAVOHEMOGLOBINAS.....	47
4.1. Bioquímica de las Flavohemoglobinas.....	47
4.2. Expresión de las flavohemoglobinas.....	51
4.3. Implicación de las Flavohemoglobinas en patogenicidad.....	52
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
OBJETIVOS.....	57
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
1. ORGANISMOS.....	61
1.1. Plantas.....	61
1.2. Hongos.....	61
1.3. Levaduras.....	62
1.4. Bacterias.....	62
1.5. Virus.....	62
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	63
2.1. Plantas.....	63
2.2. Hongos.....	64
2.2.2. Cultivo en medio sólido de <i>B. cinerea</i> .....	64
2.3. Bacterias.....	65
2.4. Levaduras.....	65
2.5. Bacteriófagos.....	65
3. EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	67
4. ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO.....	69
5. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTA.....	70
5.1. Caracterización fitopatológica.....	70
5.2. Obtención de material infectado para la extracción de ADN y ARN.....	71
6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	72
6.1. ADN genómico de <i>B. cinerea</i> .....	72
6.1.1. Método estándar.....	72
6.1.2. Método rápido.....	73
6.2. ADN de plásmidos.....	74
6.2.1. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	74
6.2.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico.....	75
6.2.3. Utilización de un kit comercial para la purificación de ADN plasmídico.....	76
6.3. ADN de bacteriófagos.....	77
6.4. Extracción de ARN total de <i>B. cinerea</i> .....	77
7. EXTRACCIÓN DE LISADOS DE PROTEÍNAS.....	79
8. VECTORES DE CLONACIÓN.....	80
8.1. <i>pGEM-T</i> y <i>pGEM-T Easy</i> .....	80
8.2. <i>pBluescript II SK +/-</i> .....	80
8.3. <i>pYES</i> .....	81
8.4. <i>pLOB</i> .....	82
8.5. <i>pSILENT-1</i> .....	83
8.6. <i>EMBL3</i> .....	83
9. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN.....	84
9.1. Enzimas de restricción.....	84
9.2. Defosforilación.....	84
9.3. Ligaciones.....	85
10. ELECTROFORESIS.....	86
10.1. Electroforesis de ADN.....	86
10.2. Electroforesis de ARN.....	86
10.3. Electroforesis de Proteínas.....	87
11. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	88
12. TRANSFORMACIONES.....	89
12.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	89
12.2. Transformación de <i>Botrytis cinerea</i> .....	90

12.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	92
13. GENOTECA DE ADN GENÓMICO.....	93
14. PCR, REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	94
14.1. PCR estándar.....	94
14.2. RT-PCR.....	95
14.3. PCR Cuantitativa.....	97
15. HIBRIDACIONES.....	100
15.1. Marcaje de sondas.....	100
15.2. Southern.....	100
15.3. Northern.....	103
16. SECUENCIACIÓN.....	104
17. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	105
18. MEDICIÓN Y DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.....	106
18.1. Electrodo de óxido nítrico.....	106
18.2. Microscopía.....	108
19. ANÁLISIS DE DATOS.....	110
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>111</b>
1. EL GEN CODIFICADOR DE LA ENZIMA FLAVOHEMOGLOBINA DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ( <i>BCFHG1</i> ).....	113
1.1. Aproximación experimental: búsqueda de secuencias homólogas.....	113
1.2. Aislamiento del gen <i>Bcfhg1</i> .....	117
1.3. Secuencia del gen <i>Bcfhg1</i> .....	122
1.3.1. La región codificante.....	124
1.3.2. Análisis de la región promotora.....	125
1.3.3. La región 3' flanqueante.....	125
1.3.4. La proteína deducida.....	126
1.4. Estudio filogenético de <i>BcFHG1</i> .....	129
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> .....	133
2.1. Donadores de Óxido Nítrico.....	134
2.2. Diseño Experimental.....	135
2.3. Análisis temporal de la expresión de <i>Bcfhg1</i> durante el crecimiento saprofito (medio líquido).....	137
2.4. Expresión in vitro a lo largo del tiempo en micelio cultivado durante 4 horas antes de la exposición a NO.....	139
2.5. Expresión in vitro a lo largo del tiempo en micelio cultivado durante 12 horas antes de la exposición a NO.....	140
2.7. Análisis temporal de la expresión de <i>Bcfhg1</i> durante la interacción <i>B. cinerea</i> - tomate.....	141
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>BCFHG1</i> MEDIANTE EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN <i>S. CEREVISIAE</i> .....	146
4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>BCFHG1</i> EN <i>B. CINEREA</i> .....	151
4.1. Diseño experimental.....	151
4.2. Construcción de Transformación.....	151
4.3. Transformación de <i>B. cinerea</i> B05.10 con <i>pΔFH</i> .....	153
4.4. Análisis genético de los transformantes de <i>B. cinerea</i> B05.10 obtenidos con <i>pΔFH</i> e identificación de mutantes $\Delta Bcfhg1$ .....	154
4.5. Caracterización bioquímica de los mutantes $\Delta Bcfhg1$ .....	157
4.6. Caracterización fisiológica de los mutantes $\Delta Bcfhg1$ .....	159
4.6.1. Análisis de la capacidad de crecimiento saprofito.....	159
4.6.2. Sensibilidad a estrés nitrosativo y a estrés oxidativo.....	161
4.6.3. Análisis de la agresividad sobre la planta huésped.....	169
5. PRODUCCIÓN DE NO EN <i>B. CINEREA</i> .....	175
5.1. Detección de la producción de NO en <i>B. cinerea</i> con el electrodo de NO.....	175
5.2. Detección de la producción de NO en <i>B. cinerea</i> mediante tinción con DAF-2DA.....	178
5.2.1. Cultivo in vitro.....	179
5.1.2. Infección in planta.....	183
5.1.2.1. Infección en tomate.....	183
5.1.2.1. Infección en tabaco.....	186
5.1.2.1. Infección en <i>Arabidopsis</i> .....	189
6. VARIACIÓN EPIGENÉTICA EN <i>B. CINEREA</i> .....	191
7. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> .....	201

8. SILENCIAMIENTO EN <i>B. CINEREA</i> .....	202
8.1. Argininosuccinato sintasa .....	202
8.2. Flavohemoglobina.....	206
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>209</b>
1. FLAVOHEMOGLOBINA DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	211
2. EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> .....	213
3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE <i>BCFHG1</i> .....	216
4. FUNCIÓN DE <i>BCFHG1</i> .....	217
5. PRODUCCIÓN DE NO EN <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	220
6. VARIACIÓN EPIGENÉTICA EN <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	225
7. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> .....	227
8. SILENCIAMIENTO EN <i>B. CINEREA</i> .....	228
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>231</b>
CONCLUSIONES .....	233
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>235</b>
<i>Detección de la producción de NO en B. cinerea mediante tinción con DAF-2DA en tomate a las 48 hpi</i> .....	237
<i>Detección de la producción de NO en B. cinerea mediante tinción con DAF-2DA en tabaco a las 20 hpi</i> .....	243
<i>Detección de la producción de NO en B. cinerea mediante tinción con DAF-2DA en Arabidopsis a las 72 hpi</i> .....	245
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>249</b>
BIBLIOGRAFÍA.....	251

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. INFECCIÓN DE <i>B. CINEREA</i> SOBRE VID. ....	11
FIGURA 2. INFECCIÓN DE <i>B. CINEREA</i> SOBRE RACIMOS DE UVA. ....	14
FIGURA 3. CICLO DE VIDA DE <i>B. CINEREA</i> EN <i>V. VINIFERA</i> . ....	20
FIGURA 4. FÓRMULA QUÍMICA DE LA FENHEXAMIDA. ....	23
FIGURA 5. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE <i>B. CINEREA</i> (WILLIAMSON <i>ET AL.</i> , 2007). ....	30
FIGURA 6. PRODUCCIÓN DE NO POR NOS (WENDEHENNE <i>ET AL.</i> , 2001). ....	40
FIGURA 7. SEÑALIZACIÓN DE NO DURANTE LA HR EN PLANTA (DELLEDONNE, 2005). ....	44
FIGURA 8. CICLO CATALÍTICO DE LAS FLAVOHEMOGLOBINAS (HAUSLADEN <i>ET AL.</i> , 2001). ....	48
FIGURA 9. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA FLAVOHEMOGLOBINA DE <i>E. COLI</i> . ....	49
FIGURA 10. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS. ....	63
FIGURA 11. EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE <i>B. CINEREA</i> A PARTIR DE UNA PLACA DE PDA-TOMATE. ....	67
FIGURA 12. SISTEMA DE INFECCIÓN EN HOJAS DE TOMATE. ....	71
FIGURA 13. ESTRUCTURA DE LOS VECTORES pGEM-T Y pGEM-T EASY (PROMEGA). ....	80
FIGURA 14. ESTRUCTURA DEL VECTOR pBLUESCRIPT (STRATAGENE). ....	81
FIGURA 15. ESTRUCTURA DEL VECTOR pYES (INVITROGEN). ....	82
FIGURA 16. ESTRUCTURA DEL VECTOR pSILENT-1 (NAKAYASHIKI <i>ET AL.</i> , 2005). ....	83
FIGURA 17. ESTRUCTURA DEL VECTOR EMBL3 (PROMEGA). ....	83
FIGURA 18. ELECTRODO DE NO. ....	107
FIGURA 19. SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LOS TRES CLONES DE CDNA SELECCIONADOS EN LA GENOTECA DE CDNA DE <i>B. CINEREA</i> QUE PRESENTAN HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS CODIFICADORAS DE ENZIMAS DE TIPO FLAVOHEMOGLOBINA. ....	115
FIGURA 20. PRIMER REGISTRO IDENTIFICADO MEDIANTE ANÁLISIS “BLASTX” CON CADA UNO DE LOS TRES CLONES SELECCIONADOS Y ALINEAMIENTO PARCIAL CON LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES DE MAYOR HOMOLOGÍA. ....	116
FIGURA 21. HIBRIDACIÓN DE UNA GENOTECA DE ADN GENÓMICO DE <i>B. CINEREA</i> CON LA SONDA FH1. .....	118
FIGURA 22. SOUTHERN DE LA DIGESTIÓN <i>SAL1-ECOR1</i> DE LOS FAGOS 1, 2, 3, 4, 5, 6 Y 7. ....	119
FIGURA 23. SOUTHERN DE LAS DIGESTIONES <i>SAL1</i> , <i>SAL1-XBAI</i> , <i>SAL1-PST1</i> Y <i>SAL1-SPE1</i> DEL FAGO 2. ....	120
FIGURA 24. MAPA DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>B. CINEREA</i> EN LA QUE SE UBICA EL GEN <i>BCFHG1</i> . ....	122
FIGURA 25. SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE <i>BCFHG1</i> . ....	124
FIGURA 26. DOMINIOS FUNCIONALES DE <i>BCFHG1</i> . ....	127
FIGURA 27. DOMINIO GLOBINA (GLOBIN). ....	128
FIGURA 28. DOMINIO OXIDOREDUCTASA FAD ( <i>FAD_BINDING_6</i> ). ....	128
FIGURA 29. DOMINIO OXIDOREDUCTASA NAD ( <i>NAD_BINDING_1</i> ). ....	128
FIGURA 30. ALINEAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS TIPO FLAVOHEMOGLOBINAS. ....	130
FIGURA 31. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS FLAVOHEMOGLOBINAS. ....	132
FIGURA 32. MOLÉCULA DE DETA/NO, DIETILENOTRIAMINA. ....	134
FIGURA 33. PRODUCCIÓN DE NO POR DETA/NO. ....	135
FIGURA 34. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN. ....	136
FIGURA 35. ANÁLISIS TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> MEDIANTE NORTHERN. ....	138
FIGURA 36. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NO EN LA EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN. ....	140
FIGURA 37. EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE <i>BCFHG1</i> A LO LARGO DEL TIEMPO DE 0,25 mM DETA/NO AÑADIDO A UN CULTIVO DE ESPORAS DE <i>B. CINEREA</i> PRECULTIVADO DURANTE 4 HORAS (PANEL A) Y 12 HORAS (PANEL B) ANTES DE LA EXPOSICIÓN NO. ....	141
FIGURA 38. REPRESENTACIÓN DEL NUMERO DE CICLOS RESPECTO A LA FLUORESCENCIA EMITIDA PARA LA RECTA PATRÓN UTILIZADA EN EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL MRNA DE <i>BCFHG1</i> . .....	142
FIGURA 39. RECTAS PATRÓN UTILIZADAS EN EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS MRNA DE <i>BCFHG1</i> Y <i>BCACTA</i> . ....	143
FIGURA 40. REPRESENTACIÓN DEL NUMERO DE CICLOS RESPECTO A LA FLUORESCENCIA EMITIDA PARA 8 Y 96 H.P.I. ....	143

FIGURA 41. REPRESENTACIÓN DEL NUMERO DE CICLOS RESPECTO A LA FLUORESCENCIA EMITIDA PARA <i>BCACTA</i> A 8, 12 Y 16 H.P.I. Y 5 HORAS <i>IN VITRO</i> .....	144
FIGURA 42. EXPRESIÓN <i>IN PLANTA</i> DE <i>BCFHG1</i> OBTENIDA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA. ....	145
FIGURA 43. VECTOR DE EXPRESIÓN INDUCIBLE DEL GEN <i>BCFHG1</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i> , pYES-BCHB1. ...	147
FIGURA 44. SDS-PAGE GEL DE LA INDUCCIÓN POR GALACTOSA DE pYES-BCHB1 EN <i>S. CEREVISIAE</i> . 148	
FIGURA 45. CURVAS DE DEGRADACIÓN DE NO DE CULTIVOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> . ....	149
FIGURA 46. CURVAS DE DEGRADACIÓN DE NO DE LISADOS PROTEICOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> . ....	150
FIGURA 47. ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA DE CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO p $\Delta$ FH UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN PARA GENERAR MUTANTES $\Delta$ <i>BCFHG1</i> . ....	153
FIGURA 48. ESTRATEGIA DE REEMPLAZAMIENTO GÉNICO DE <i>BCFHG1</i> MEDIANTE UN DOBLE EVENTO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN LAS REGIONES 5' Y 3' FLANQUEANTES DE LA COPIA GENÓMICA DEL ALELO SILVESTRE DEL GEN <i>BCFHG1</i> Y DEL ALELO MUTANTE CONSTRUIDO ARTIFICIALMENTE Y CLONADO EN EL PLÁSMIDO p $\Delta$ FH. ....	155
FIGURA 49. ANÁLISIS MEDIANTE HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN DE CUATRO TRANSFORMANTES DE <i>B. CINEREA</i> CANDIDATOS A SER AUTÉNTICOS MUTANTES $\Delta$ <i>BCFHG1</i> . ....	156
FIGURA 50. DEGRADACIÓN DE NO POR EL TIPO SILVESTRE Y DOS MUTANTES $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (B16 Y A7). .	158
FIGURA 51. DIÁMETRO MEDIO DE LAS COLONIAS CULTIVADAS EN MEDIO MEA. ....	160
FIGURA 52. DIÁMETRO MEDIO DE LAS COLONIAS CULTIVADAS EN MEDIO B5.....	160
FIGURA 53. CRECIMIENTO RADIAL DE LOS MUTANTES $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (B16 Y A7) Y DEL CONTROL veE2 EN EL MEDIO DE CULTIVO MEA SUPLEMENTADO CON 0,125 DETA/NO ó 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	162
FIGURA 54. CRECIMIENTO RADIAL DE $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (A7 Y B16) Y CONTROL (veE2) EN EL MEDIO DE CULTIVO MEA SUPLEMENTADO CON 0,125 mM DETA/NO. ....	163
FIGURA 55. CRECIMIENTO RADIAL DE $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (B16 Y A7), CONTROL veE2, <i>F. OXYSPORUM</i> Y <i>P. BLAKESLEEANUS</i> EN EL MEDIO DE CULTIVO MEA Y MEA SUPLEMENTADO CON 0,5 mM SNP, 1 mM SNP o 2,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	165
FIGURA 56. DIÁMETRO DE LA LESIÓN PRODUCIDA POR <i>B. CINEREA</i> EN HOJAS DE TOMATE. ....	172
FIGURA 57. ENSAYO DE INFECCIÓN SOBRE HOJAS DE TOMATE A LOS 3 DÍAS POST-INOCULACIÓN. ....	173
FIGURA 58. ENSAYO DE INFECCIÓN SOBRE HOJA DE TABACO A LOS 3 DÍAS POST-INOCULACIÓN. ....	174
FIGURA 59. ENSAYO DE INFECCIÓN SOBRE HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COL-0 (TIPO SILVESTRE) A LOS 6 DÍAS POST-INOCULACIÓN. ....	174
FIGURA 60. ENSAYO DE INFECCIÓN SOBRE HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> $\Delta$ ATNOS1 A LOS 6 DÍAS POST-INOCULACIÓN. ....	174
FIGURA 61. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO MEDIANTE NO EN EL MUTANTE $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (B16). ....	176
FIGURA 62. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO MEDIANTE NO EN LA CEPA B05.10. ....	178
FIGURA 63. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 HORAS EN B5. ....	180
FIGURA 64. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 HORAS EN B5. ....	180
FIGURA 65. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 8 HORAS EN B5. ....	181
FIGURA 66. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 8 HORAS EN B5. ....	181
FIGURA 67. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 10 HORAS EN B5. ....	181
FIGURA 68. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 12 HORAS EN ME. ....	182
FIGURA 69. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 12 HORAS EN ME DEL MUTANTE $\Delta$ <i>BCFHG1</i> (B16). ....	182
FIGURA 70. TINCIÓN DAF-2DA DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 20 HORAS EN B5. ....	182
FIGURA 71. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 15 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	184
FIGURA 72. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 15 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	184
FIGURA 73. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 24 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	184
FIGURA 74. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 24 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	185
FIGURA 75. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 48 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	185
FIGURA 76. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 48 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	185
FIGURA 77. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 72 H.P.I. EN HOJAS DE TOMATE. ....	186
FIGURA 78. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 20 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	187
FIGURA 79. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 28 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	187
FIGURA 80. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 28 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	187
FIGURA 81. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 48 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	188
FIGURA 82. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 48 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	188

FIGURA 83. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 75 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	188
FIGURA 84. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 75 H.P.I. EN HOJAS DE TABACO. ....	189
FIGURA 85. TINCIÓN DAF-2DA A LAS 72 H.P.I. EN HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	190
FIGURA 86. CONTROL C-PTIO DE LA TINCIÓN DAF-2DA A LAS 72 H.P.I. EN HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> . .	190
FIGURA 87. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DEL DIÁMETRO DE LA LESIÓN PRODUCIDA EN HOJAS DE TOMATE POR <i>B. CINEREA</i> EB05. ....	193
FIGURA 88. VARIACIÓN EPIGENÉTICA EN LA INFECCIÓN SOBRE HOJAS DE TOMATE DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> EB05. ....	194
FIGURA 89. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DEL CRECIMIENTO SAPROFITICO EN MEDIO MEA DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN EB05. ....	195
FIGURA 90. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DEL CRECIMIENTO SAPROFITICO EN MEDIO B5 DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN EB05. ....	196
FIGURA 91. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN MEA DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> EB05, MUTANTES $\Delta BCFHG1$ Y TB05. ....	197
FIGURA 92. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN B5 DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> EB05, MUTANTES $\Delta BCFHG1$ Y TB05. ....	197
FIGURA 93. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DEL CRECIMIENTO SAPROFITICO EN MEA DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN TB05. ....	198
FIGURA 94. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DEL CRECIMIENTO SAPROFITICO EN MEDIO B5 DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN TB05. ....	199
FIGURA 95. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN MEA DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN TB05. ....	200
FIGURA 96. VARIACIÓN EPIGENÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN B5 DE LOS CONTROLES DE LA TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA DE <i>B. CINEREA</i> B05.10 ORIGEN TB05. ....	200
FIGURA 97. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL GEN <i>BCTUBA</i> Y <i>BCASS1</i> . ....	202
FIGURA 98. CICLO DE LA UREA. ....	203
FIGURA 99. CRECIMIENTO SAPROFÍTICO EN B5 Y B5+ARGININA DE LOS MUTANTES $\Delta BCFHG1$ (B16 Y A7) Y TIPO SILVESTRE (EB05). ....	204
FIGURA 100. CRECIMIENTO SAPROFÍTICO EN B5 DE LOS TRANSFORMANTES PRODUCIDOS CON EL VECTOR pLOB1. ....	205
FIGURA 101. CRECIMIENTO SAPROFÍTICO EN B5+ARGININA DE LOS TRANSFORMANTES PRODUCIDOS CON EL VECTOR pLOB1. ....	205
FIGURA 102. ANÁLISIS NORTHERN DE TRANSFORMANTES OBTENIDOS CON EL PLÁSMIDO pLOB1 Y DE LA CEPA CONTROL, CULTIVADOS DURANTE 12H A 22 °C EN PDB. ....	206
FIGURA 103. ESQUEMA A ESCALA DE LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE TRANSFORMACIÓN DE SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>BCFHG1</i> MEDIANTE PCR. ....	207
FIGURA 104. ANÁLISIS NORTHERN DE TRANSFORMANTES OBTENIDOS CON LA CONSTRUCCIÓN DE SILENCIAMIENTO <i>BCFHG1</i> Y DE LA CEPA CONTROL. ....	208
FIGURA 105. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE 2 $\mu$ M NO EN TRANSFORMANTES SILENCIADOS PARA <i>BCFHG1</i> . ....	208
FIGURA 106. ESQUEMA DE FLUJO DE NO EN <i>B. CINEREA</i> . ....	224

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEBADORES (PRIMERS) UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE PCR. ....	96
TABLA 2. PREDICCIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE PUEDEN UNIRSE AL PROMOTOR DE <i>BCFHG1</i> . ....	126
TABLA 3. CONTENIDO AMINOACÍDICO DE <i>BCFHG1</i> . ....	127
TABLA 4. MEDIA DE LA EXPRESIÓN DE <i>BCACTA</i> , <i>BCFHG1</i> Y LA <i>BCFHG1</i> NORMALIZADA CON SU CORRESPONDIENTE DESVIACIÓN ESTÁNDAR. ....	144
TABLA 5. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 0,125 mM DETA/NO. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	162
TABLA 6. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 0,125 mM DETA/NO. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	162
TABLA 7. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 0,125 mM DETA/NO. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	162
TABLA 8. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	163
TABLA 9. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	163
TABLA 10. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA CON 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	163
TABLA 11. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	166
TABLA 12. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	166
TABLA 13. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	167
TABLA 14. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA 0,5 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	167
TABLA 15. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA 0,5 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	167
TABLA 16. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA 0,5 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	167
TABLA 17. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA 1 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	167
TABLA 18. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA 1 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	168
TABLA 19. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA 1 mM SNP. DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	168
TABLA 20. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 3 DÍAS EN PLACAS DE MEA 2,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	168
TABLA 21. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 4 DÍAS EN PLACAS DE MEA 2,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	168
TABLA 22. ANÁLISIS POST-HOC DEL CRECIMIENTO DE ESPORAS INCUBADAS DURANTE 5 DÍAS EN PLACAS DE MEA 2,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . DIÁMETRO MEDIO EN CM. ....	168
TABLA 23. ANÁLISIS POST-HOC DEL DIÁMETRO DE LA LESIÓN PRODUCIDA POR <i>B. CINEREA</i> EN HOJAS DE TOMATE. DIÁMETRO LESIONES EN MM. ....	172



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
C	Citosina
cDNA	ADN complementario
CDP-Star	(2-Cloro-5-(4-metoxipiro(1,2-dioxetano-3,2'-(5' cloro)tricyclo [3.3.1.1.3.7]decan)-4il)-1-fenilfosfato disódico)
c-PTIO	2-(4-carboxifenilo)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido de sal de potasio
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
dUTP	2'-deoxiuridina 5'-trifosfato
DEPC	Diethylpirocarbonato
DETA/NO	Diethylenetriamina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DIG	Digoxigenina-11-desoxiuridina-5'-trifosfato
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNAse	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> , y colaboradores
g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad
G	Guanidina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente
hpi	Horas post infección
HR	<i>Hypersensitive response</i> , respuesta de hipersensibilidad
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases (1000 pares de bases)
kDa	kilodaltons
Kg	Kilogramo
l	Litro
LMW	Marcador proteico de bajo peso molecular
L-NAME	N <sup>o</sup> -niro-L-arginana metil ester hidroclicorida
m	Metro
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> , proteínas activadas por mitógeno
Mb	Megabases (1000 kilobases, 1.000.000 pares de bases)
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	ARN mensajero
MOPS	Ácido-3-morfolinopropanosulfónico
N	Normal

NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilénglicol
pA	Picoamperios
pg	Picogramos
pmol	Picomoles
PMSF	Fenil metano sulfonilo fluorida
RH	Respuesta de hipersensibilidad
RNAse	Ribonucleasa
ROS	Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno
rRNA	ARN ribosómico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase-PCR</i> , transcripción inversa
SAR	<i>Sytemic acquired resistance</i> , resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis del gel de poliacrilamida SDS
SNP	Nitroprusido de sodio
T	Timina
TAE	Tris acético EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etileno diamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracilo
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
V	Voltio
vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactósido

## **RESUMEN**



## RESUMEN

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno causante de la podredumbre gris en viñedos de todo el mundo y responsable de grandes pérdidas en las producciones vitivinícolas. También es considerado como uno de los principales patógenos responsables del deterioro de frutas y hortalizas durante su cultivo y en postcosecha. Es un patógeno generalista que puede atacar especies de la mayoría de las familias de dicotiledóneas. *B. cinerea* es un hongo necrotrofo que requiere la muerte de las células vegetales para poder alimentarse y desarrollar la infección. Sin embargo, los mecanismos que participan en estos procesos aún no han sido esclarecidos en su totalidad. En este sentido, es necesario destacar que el óxido nítrico (NO) juega un papel fundamental en señalización celular durante la activación de los mecanismos de defensa de la planta, participando en la inducción de la muerte celular programada del huésped mediante la activación y modulación de la respuesta de hipersensibilidad. El estudio de la producción y degradación del NO resulta, por lo tanto, esencial para entender los procesos de muerte celular y la señalización en las células vegetales y fúngicas durante el establecimiento y progreso de una interacción planta-patógeno.

Las flavohemoglobinas son un grupo de proteínas encargadas de la rápida degradación del NO y su estudio en el contexto del análisis de la interacción entre *B. cinerea* y su huésped puede ofrecer información de enorme interés por su posible función moduladora de los niveles de NO. Estas proteínas son esenciales en el éxito de patógenos vegetales como *Erwinia chrysanthemi* y de hongos patógenos de humanos como *Cryptococcus neoformans*. *B. cinerea* tiene un único gen codificador de flavohemoglobina (*Bcfhg1*), gen que se expresa durante todos sus estados de desarrollo, excepto en esporas en reposo, alcanzando un máximo de expresión durante la germinación de esporas y decayendo ésta posteriormente. La expresión de *Bcfhg1* aumenta 5 veces cuando se aplica NO exógeno a esporas recién germinadas. Sin embargo, el incremento en la expresión determinado por NO exógeno es muy reducido en micelio maduro. El nivel de expresión de *Bcfhg1* en planta es máximo a las 8 horas postinoculación (hpi), reduciéndose en un 70-75% entre las 12 y 120 hpi.

La expresión de la proteína BcFHG1 en una cepa mutante de *S. cerevisiae* deficiente en la actividad de la enzima flavohemoglobina proporcionó evidencias bioquímicas y genéticas de que la proteína codificada por el gen *Bcfhg1* es una enzima flavohemoglobina que metaboliza NO. El estudio comparativo de la cinética de degradación de NO en la cepa silvestre de *B. cinerea* y en cepas mutantes  $\Delta Bcfhg1$  demostraron que la flavohemoglobina de *B. cinerea* metaboliza NO de una forma rápida y eficiente, y que ésta presenta una gran afinidad por el NO. Estos estudios demostraron, además, que la degradación de NO llevada a cabo por la enzima BcFHG1 constituye el mecanismo cuantitativamente más importante, si no el único, implicado en la detoxificación de NO en *B. cinerea*.

Los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  son incapaces de metabolizar NO. Es posible argumentar que una reducción de la capacidad de degradación de NO por parte de las cepas mutantes podría determinar un aumento en los niveles de NO en la zona de infección (lesión) e incrementar los niveles de la activación de la HR de la planta, favoreciendo así el progreso de la infección de un patógeno necrotrofo. Por otra parte, y dado el efecto antimicrobiano que ejerce el NO, una disminución de la capacidad del patógeno para detoxificar NO podría limitar la capacidad de supervivencia del patógeno en el ambiente ciertamente hostil que se genera durante la activación de la muerte celular programada. Sin embargo, el establecimiento y el progreso de la infección no se ven significadamente alterados en los mutantes  $\Delta Bcfhg1$ .

Tomadas en conjunto, estas observaciones indican que, aunque la flavohemoglobina de *B. cinerea* codificada por *Bcfhg1* puede jugar un importante papel durante los estados de desarrollo del hongo más tempranos, ciertamente la actividad de detoxificación de NO que lleva a cabo esta enzima, por sí sola, no parece ser un factor esencial en relación con la capacidad de infectar a su huésped de este hongo necrotrofo. Sin embargo, no se puede descartar su participación y relevancia en la misma. Las observaciones llevadas a cabo en este trabajo demuestran que *B. cinerea* puede producir NO por sí mismo. Es interesante destacar que esta producción de NO por parte del patógeno es inducida por la exposición a NO exógeno, al menos en aquellas fases del ciclo de desarrollo del patógeno durante su crecimiento saprofítico en medio líquido en las que se observa una reducción de

los niveles de expresión del gen *Bcfhg1*. *B. cinerea* también produce NO, y en cantidades importantes, *in planta*, durante el progreso del patógeno sobre el tejido vegetal infectado, en particular durante la fases de formación y expansión de las lesiones primarias. Por lo tanto, a la hora de analizar la importancia del papel del NO en el contexto de la capacidad del patógeno para infectar a su huésped quizás no sea únicamente la detoxificación de éste por flavohemoglobinas el factor a considerar sino, de manera más general y desde una perspectiva más global e integradora, el metabolismo del NO durante la interacción como agente modulador de los niveles de NO tanto exógeno (producido por las células vegetales) como, sobre todo, endógeno (producido por *B. cinerea*) que se generan durante el establecimiento y progreso de la interacción.

A lo largo de esta investigación se ha demostrado que el proceso de transformación de *B. cinerea* determina la aparición de variación de origen epigenético que dificulta el análisis fenotípico de las cepas mutantes generadas utilizando procedimientos basados en la transformación. Estos cambios son, probablemente, consecuencia de una respuesta de defensa del hongo que éste elabora ante la situación de estrés sufrido por las células fúngicas durante la producción de protoplastos, el tratamiento con PEG o el choque térmico, respuesta que debe implicar un cambio en los patrones de expresión génica del hongo y que resulta en un fenotipo particular. Es interesante destacar que el fenotipo producido puede ayudar a superar las situaciones de estrés ya que, entre otras alteraciones, se observa en las cepas derivadas la producción de un mayor número de estructuras de resistencia (esclerocios).

También hemos evaluado la utilización del silenciamiento génico como herramienta para el análisis de la función génica generando construcciones en las que se fusiona la región codificante de un marcador seleccionable de resistencia a un antibiótico bajo el control de un promotor dado a un fragmento de ADN que incluye la región terminal de la secuencia codificante del gen a silenciar y su propio terminador. Con esta metodología se ha silenciado el gen *Bcfhg1* a niveles diferentes.

Con el estudio del papel del NO en la infección causado por *B. cinerea* se pretende contribuir a desarrollar nuevas estrategias de lucha que permitan una agricultura más sostenible y en algunos casos, como el de la vid, controlar el

patógeno sin depreciar un cultivo de alto valor económico. Asimismo, el incremento en el conocimiento científico de las funciones que ejerce el NO en el reino taxonómico de los hongos servirá de base a futuras investigaciones en campos tan diversos como la medicina o el medioambiente.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1- BOTRYTIS CINEREA**

La podredumbre gris es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Plinio el viejo ya la describía en el siglo primero de nuestra era y en 1895 Ravaz le ponía nombre. *Botrytis cinerea*, el agente causante de la enfermedad, afecta a más de 200 tipos de plantas y está extendida por todo el mundo. Sin embargo, es sin duda en los viñedos donde causa más daños y tiene un mayor conocimiento por parte del público.

Fue considerada como una enfermedad secundaria de la vid (*Vitis vinifera*) hasta las grandes epidemias de filoxera y la reconstrucción de los viñedos por injerto. Actualmente es uno de los problemas más importantes del viticultor por la grave incidencia que tiene sobre la calidad de los vinos. Asimismo, es un gran problema en horticultura produciendo una reducción de cosecha de entre un 20 y 25 % en cultivos de fresa en España y un 20 % en cultivos de flor en Holanda.

Capaz tanto de lo mejor como de lo peor, *Botrytis cinerea*, bajo ciertas condiciones climáticas en el otoño, se desarrolla sobre las uvas para producir la podredumbre noble y dar origen a prestigiosos vinos como el Tokay de Hungría, los Sauternes de Francia y los vinos alemanes de Auslese, Beerenauslese y Trockenbeerenauslese.

### **1.1. B. CINEREA EN VID**

#### **1.1.1 Sintomatología**

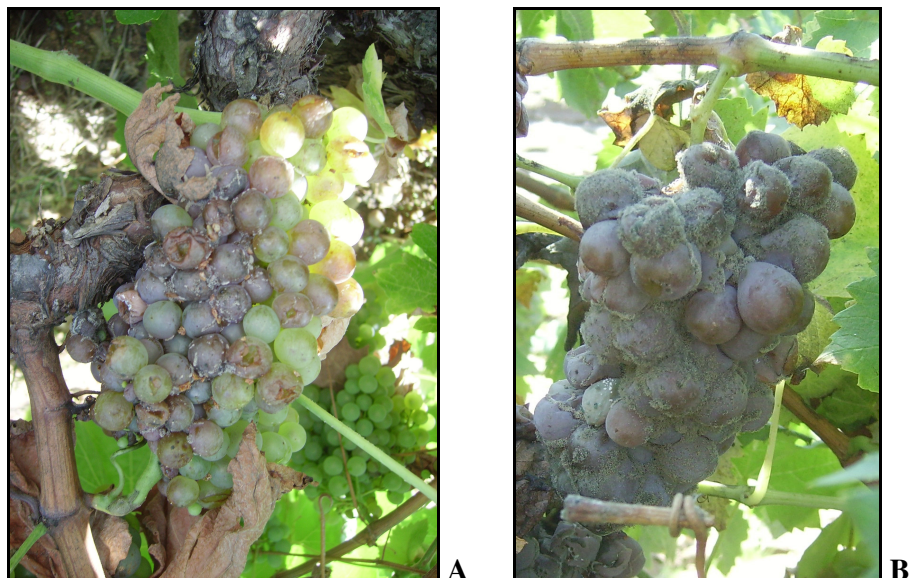
La sintomatología que *B. cinerea* produce se puede dar en vivero, sobre las partes vegetativas herbáceas y leñosas, sobre los racimos de uva y en post-cosecha.

Durante la formación de plantones de vid en vivero, el hongo puede atacar las zonas injertadas. Para tener un mayor éxito en el injertado se mantiene a las plantas en unas condiciones húmedas y templadas, las cuales son ideales para el hongo.

En los viñedos donde la primavera es frecuentemente lluviosa, se pueden observar los ataques en ramas jóvenes. Se manifiesta por una necrosis marrón que se puede recubrir por las fructificaciones del hongo. La necrosis es generalmente de

bordes irregulares y generalmente se marchita y se rompe la parte por debajo de la rama atacada. Sobre las hojas se observan manchas ocres situadas al borde del limbo y de forma triangular que en general no suelen tener una gran incidencia. Antes de la floración las inflorescencias pueden ser atacadas en los botones florales, aunque la planta suele desechar las partes atacadas. Al final de la floración las bayas jóvenes abortadas pueden ser colonizadas por el hongo y ser utilizadas como reservorio saprofítico para un posterior ataque sobre las uvas (Viret *et al.*, 2004). El ataque sobre los pedicelos se traduce en pequeñas manchas marrones que, según las condiciones climáticas, pueden invadir la parte de las bayas cercanas a la necrosis. En los viñedos de zonas más calidas el hongo también ataca los pedúnculos de los racimos produciendo su caída o marchitamiento. Antes de la maduración, las bayas teóricamente no son receptivas al patógeno, a no ser que las condiciones climáticas sean particularmente lluviosas o si los restos florales permanecen adheridos a las bayas. La enfermedad empieza a afectar a las uvas al inicio de la maduración a partir de fragmentos vegetales infectados. En las cepas de uva blanca se facilita la visión del progreso de la infección al adquirir las uvas progresivamente un color marrón claro a partir del punto de contaminación (Fig. 1 A). Cuando la baya está completamente cubierta, enseguida se ven aparecer los conidióforos o cuerpos fructíferos en la superficie de la uva. Si la contaminación se realiza por conidios, se aprecian pequeñas manchas marrón claro sobre la baya, que progresivamente se expanden hasta colonizar toda la uva. A partir de una baya atacada, el hongo se va a desarrollar para invadir la totalidad del racimo (Fig. 1 B).

Durante el reposo vegetativo de los viñedos, sobre todo en viñedos vendimiados mecánicamente, se pueden observar en los sarmientos unas pequeñas prominencias negras y duras de dimensiones variables llamadas esclerocios. Asimismo, los sarmientos pueden presentar un micelio blanquecino indicativo de la presencia del hongo. A la primavera siguiente, los esclerocios y zonas blanquecinas, que han actuado como formas resistentes durante el invierno, fructifican produciendo conidios.



**Figura 1.** Infección de *B. cinerea* sobre vid.

A-Variedad Verdejo (Peñafiel, Burgos); B- variedad Malvasía (Toro, Zamora).

Los síntomas durante el almacenamiento en frío de la uva de mesa presentan unas necrosis marrón claro de forma circular que acaban invadiendo toda la uva. Se puede desarrollar una podredumbre húmeda sobre el raquis que se recubre de un micelio estéril gris. La podredumbre se expande por proximidad de unos racimos a otros.

### 1.1.2. Daños cuantitativos

Antes y durante la floración las inflorescencias se pueden marchitar, aunque generalmente sólo se producen pequeñas pérdidas del futuro racimo. El daño producido en este estado es difícilmente calculable y se podría decir que se trata de un aclarado de la fruta natural. Desde el inicio de la maduración a la recolección las pérdidas son considerables sobre todo si las condiciones climáticas favorecen la infección del hongo. En Francia el daño producido por *B. cinerea* en viñedos se estima entre un 15 a un 40 % de la cosecha dependiendo de las condiciones climáticas.

### 1.1.3. Daños cualitativos

Los daños cualitativos que puede producir la podredumbre gris en vid se pueden agrupar en los siguientes puntos:

- Acción sobre el metabolismo de azúcares y ácidos. El ataque del hongo sobre la uva se manifiesta en primer lugar por un aumento del nivel de los azúcares, seguido de un fenómeno de concentración de éstos. En este estado, rápidamente, y sobre todo coincidiendo con la salida de los conidióforos, el hongo experimenta un fuerte consumo de glucosa. Al mismo tiempo, se elevan los niveles de ácido glucónico y de glicerol. El ácido glucónico se combina con el SO<sub>2</sub> durante la vinificación produciendo así su inactivación y el consecuente efecto en la calidad del vino.
- Oxidación enzimática de compuestos fenólicos. *Botrytis* produce fenoloxidasas en cantidades directamente proporcionales al nivel de podredumbre gris en la vendimia. Estas enzimas son muy estables y responsables de la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos responsables del color y aromas en los vinos tintos. De esta forma, los vinos tintos toman un color marrón con olores y sabores desagradables.
- Incidencia sobre el aroma de los vinos. En los vinos de variedad Moscatel el ataque de *B. cinerea* produce la reducción de terpenos responsables del aroma de los mostos. En la variedad Sauvignon, las quinonas producidas por la oxidación de los compuestos fenólicos reaccionan con los precursores de aromas destruyendo los sabores propios de esta uva.
- Producción de polisacáridos. El metabolismo de *B. cinerea* produce polisacáridos extracelulares, glucanos, que dificultan considerablemente las operaciones de filtración y clarificación de los vinos.
- Indirectos. El efecto de una temprana recolección de la uva para reducir los posibles daños ocasionados por el hongo puede reducir la calidad de los vinos drásticamente.

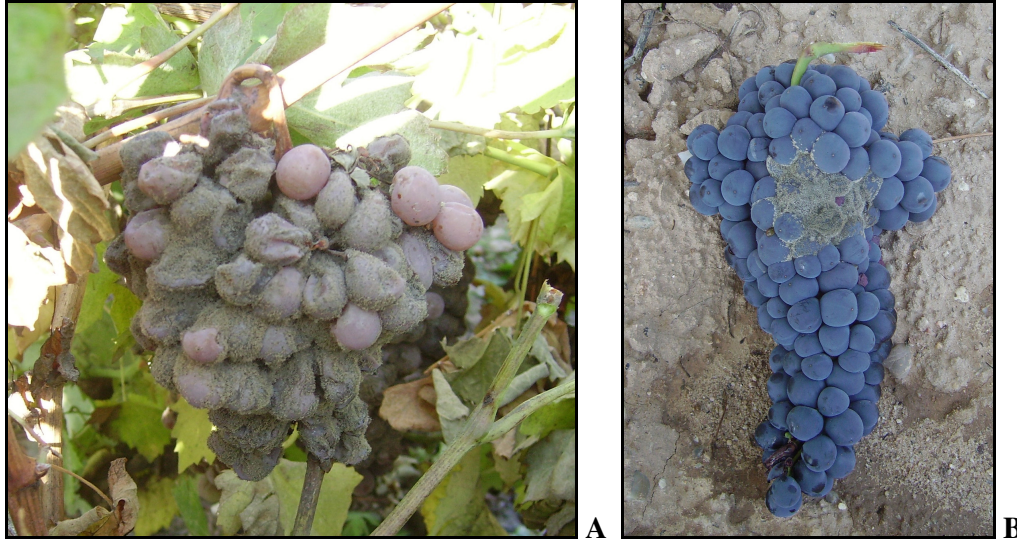
#### 1.1.4. Sensibilidad del huésped (*Vitis vinifera*)

El estudio de la sensibilidad de cepas a la podredumbre gris tiene una gran importancia económica. La arquitectura del racimo es uno de los factores más importantes que influyen en las diferencias de sensibilidad observadas en las diferentes variedades. Las cepas con racimos compactos, donde la podredumbre se puede desarrollar más fácilmente por proximidad, son en general más sensibles que las cepas con racimos más ralos. Así, la misma cepa de *B. cinerea* puede tener diferente respuesta en virulencia dependiendo de la variedad de vid infectada (Vallejo *et al.*, 2003).

La producción de fitoalexinas causa un efecto antimicrobiano que frena el desarrollo del patógeno (Jeandet *et al.*, 2002). Variaciones en la producción de fitoalexinas o de la degradación de éstas por parte del hongo producen un efecto directo en la infección producida por *B. cinerea* (Kliebenstein *et al.*, 2005).

Variedades más resistentes presentan una epidermis más difícilmente franqueable por *Botrytis*. La cantidad y calidad de las pectinas constituyen una de las mayores barreras celulares, así como la cantidad de los compuestos fenólicos (Lionetti *et al.*, 2007; Valette-Collet *et al.*, 2003). De este modo, las variedades menos resistentes tienen mayor cantidad de pectinas solubles en agua que serán más fácilmente degradables por el hongo y una menor cantidad de compuestos fenólicos.

En la figura 2 se observa la infección de *B. cinerea* sobre Malvasía y Tinta del País, las cuales tienen una alta sensibilidad a la enfermedad. Otras variedades de uso común en España, como la Merlot o la Cabernet Sauvignon, tienen una mejor resistencia a la enfermedad principalmente por la configuración de sus racimos.



**Figura 2.** Infección de *B. cinerea* sobre racimos de uva.

A- Infección sobre la variedad Malvasía en la denominación de origen Toro (Zamora). B- infección sobre la variedad Tinta del País en la denominación de origen Ribera del Duero (Burgos).

La receptividad de los órganos vegetales está bien delimitada en el tiempo. Las hojas y las ramas son atacadas en los estados juveniles, las inflorescencias son siempre receptivas, incluidos el raquis y los botones florales, y las uvas no suelen ser receptivas hasta el inicio de su maduración.

### **1.1.5. Factores que afectan la agresividad del patógeno**

#### **1.1.5.1. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES**

La profundidad del suelo tiene una gran influencia sobre el desarrollo de la podredumbre gris. Un suelo profundo favorece un enraizamiento profundo y un suelo poco profundo lo contrario. De este modo, si el suelo es profundo, la absorción de agua por la planta es débil y no se produce un aumento del contenido del agua de las bayas. Sin embargo, si el enraizamiento es superficial, la absorción de agua es muy rápida, las bayas se llenan de agua y son más sensibles al hongo.

El clima ejerce un papel esencial en el desarrollo de la podredumbre gris, pero no sólo en las semanas anteriores a la vendimia, sino también durante y después de la floración. De este modo, las lluvias durante y después de la floración



condicionan el estado fisiológico de la cutícula de las bayas haciéndolas más vulnerables al ataque de *B. cinerea*. También el granizo y la lluvia violenta pueden ocasionar lesiones en las bayas que facilitan la infección por el hongo.

#### **1.1.5.2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES BIOLÓGICOS**

Los factores biológicos que pueden afectar al progreso del hongo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a- Insectos. Las polillas del racimo consisten en varias especies de lepidópteros, destacando en España *Lobesia botrana* Den. y Shiff. Las galerías causadas por las larvas constituyen puertas de entrada para *B. cinerea*. Así, la larva penetra en la baya transportando el inóculo del hongo y favoreciendo las heces del insecto la germinación de los conidios.
- b- Oidio. La rotura de las bayas que produce el patógeno favorece el desarrollo posterior de *B. cinerea*.
- c- Intervención humana.
  - La elección de porta injerto influye en la tasa de podredumbre gris. De este modo, el porta injerto S04 es notablemente más sensible a *B. cinerea* que las cepas 41B y Fercal.
  - La fertilización nitrogenada puede afectar el desarrollo de la enfermedad, aunque esta afirmación es bastante discutida. Sin embargo, las tasas de nitrógeno en el mosto sí tienen un claro efecto.
  - La forma de mantenimiento del suelo influye en el enraizado de las plantas y así en su absorción de agua y nitrógeno, el vigor de las plantas y el grosor de las bayas. Parcelas que tienen una cobertera vegetal tienen una menor tasa de podredumbre gris.
  - La forma de poda y el entresacado de los racimos influyen en la aireación y en el riesgo de desarrollo de la enfermedad.

#### **1.1.5.3. INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS**

*B. cinerea* tiene una inusual variabilidad que le caracteriza y dificulta su control. Esta variabilidad es evidente en características tales como la patogenicidad

(Lorenz, 1983), la capacidad y los patrones de crecimiento (Grindle, 1979), la producción de enzimas *in vitro* e *in vivo* (Leone, 1990) o las resistencias a fungicidas que aparecen rápidamente en el campo cuando se aplican agentes químicos para proteger los cultivos (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 1996). El origen de esta variabilidad fenotípica y, por lo tanto, genética, y los mecanismos responsables de la misma aún no se comprenden de manera adecuada. Con frecuencia se observa que la descendencia asexual de determinados aislados es fenotípicamente muy diversa, asumiéndose que, al menos en parte, esta diversidad tiene su origen en la naturaleza multinucleada y heterocarionte del patógeno (Grindle, 1979; Lorenz, 1983). Por otra parte, la relevancia de la reproducción sexual como mecanismo generador de variabilidad genética en esta especie es en la actualidad motivo de controversia porque, aunque se ha descrito el teleomorfo de *B. cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, y se ha demostrado que la especie mantiene la sexualidad y es posible reproducir el ciclo sexual incluso en el laboratorio, las estructuras sexuales han sido identificadas en la naturaleza en muy contadas ocasiones (Lorbeer, 1980).

El uso de marcadores de tipo RAPD para caracterizar una pequeña colección de aislados de *B. cinerea*, demostró que todos ellos eran genéticamente diferentes y que los marcadores RAPD detectados segregaban independientemente de forma mendeliana y que no estaban ligados (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993). El estudio de una colección más numerosa de aislados de *B. cinerea* recogidos dentro y fuera de invernaderos en Holanda demostró que, con muy raras excepciones, todos ellos eran genéticamente diferentes, no pudiendo establecer, además, ninguna relación entre los aislados analizados en cuanto a niveles de patogenicidad, origen o año de aislamiento (Kerssies *et al.*, 1997).

El trabajo realizado con una colección de 259 aislados recogidos sobre vid en distintos viñedos franceses y 107 aislados recogidos en otras especies vegetales cultivadas en los alrededores de viñedos mostró una elevadísima diversidad genética en esta especie, incluso aislados procedentes de la misma planta mostraban diferentes haplotipos y hasta cinco haplotipos diferentes fueron purificados a partir de un único fruto infectado (Giraud *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 1999). Este nivel de diversidad genética sugiere que el impacto de la propagación clonal en las poblaciones naturales de *B. cinerea* es reducido y la recombinación probablemente juega un papel

importante. Asimismo, en este trabajo se estudió las frecuencias alélicas en los aislados que diferían en la presencia o ausencia de dos elementos transponibles (Flipper y Boty), donde han encontrado evidencias que sugieren que en la naturaleza están coexistiendo en realidad dos especies muy próximas pero genéticamente diferentes de *B. cinerea*.

Trabajos llevados a cabo sobre poblaciones de aislados recogidos en invernaderos en dos regiones de Almería, indican que en las poblaciones analizadas existe un muy alto grado de diversidad genética, existiendo una diferenciación muy reducida entre las subpoblaciones procedentes de distintos invernaderos o entre las dos regiones (Alfonso *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2003b). Más recientemente, estudios de la variabilidad de genes funcionales de la poligalacturonasa mostraron ser altamente polimórficos aunque su influencia en patogenicidad es limitada (Rowe y Kliebenstein, 2007).

## **1.2. B. CINEREA EN OTROS HUÉSPEDES**

*B. cinerea* ataca un amplio espectro de plantas en climas templados incluyendo algunos cultivos con gran importancia económica como frutas, hortalizas, flores o bulbos. Como ya hemos indicado en el punto anterior, el mayor impacto que produce el hongo es sobre vid. Sin embargo, cabe mencionar la importancia de la enfermedad sobre otros cultivos.

En cultivos de fresa, *B. cinerea* es una de las más importantes enfermedades, ya que es capaz de infectar tejidos vegetales, tanto jóvenes como senescentes (Powelson, 1960). Las inflorescencias jóvenes son muy susceptibles a la infección y con frecuencia el hongo llega a extenderse por el pedicelo. Las infecciones del fruto normalmente se desarrollan como lesiones blandas de color marrón claro que rápidamente se extienden por el fruto originando, posteriormente, una cubierta de conidios. El hongo se desarrolla mejor en las zonas protegidas de la planta donde la humedad es más alta por la ausencia de aireación. Asimismo, las operaciones de recolección del fruto pueden transmitir la enfermedad a otras fresas sanas acrecentando el problema. Para reducir la incidencia de la enfermedad, durante el

cultivo de fresa se realizan una serie de operaciones agronómicas como la separación de la planta del suelo para aumentar la aireación y evitar la contaminación de los frutos.

Los cultivos de invernadero tienen a *B. cinerea* como uno de sus mayores problemas. El hongo se desarrolla en épocas frías, cuando se dan las mejores condiciones para su desarrollo, atacando hojas, tallos, flores y sobretodo frutos. Sin embargo este periodo de tiempo coincide con la máxima actividad de los invernaderos. El control químico produce rápidamente resistencias en el hongo y se hace necesario, en este ambiente, la implementación de sistemas de control integrado (Moyano *et al.*, 2003a).

*B. cinerea* es uno de los principales hongos que afectan a la post-cosecha de muchas frutas y verduras sobre las cuales causa importantes daños con una enorme depreciación económica. La alta humedad relativa, la proximidad de los frutos y la baja temperatura favorecen el daño ocasionado por el hongo. Además, el control químico está restringido, ya que no se pueden cumplir los plazos de seguridad y múltiples estrategias de control se han desarrollado como alternativa. Tal es el caso de extractos de semilla de pomelo en uva de mesa (Xu *et al.*, 2007), la bacteria *Rahnella aquatilis* en manzana (Calvo *et al.*, 2007), los compuestos volátiles emitidos por la baya de *Vitis lambrusca* en kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Kulakiotu *et al.*, 2004) o el metil jasmonato en flores cortadas de *Freesia hybrida* (Darras *et al.*, 2007).

### 1.3. SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN

La forma perfecta del hongo, *Botryotinia fuckeliana* Whetzel, pertenece a la división *Ascomycota*, orden *Leotiales*, familia *Sclerotiniaceae*. Fue descrito por de Bary en 1886 como un apotecio pedicelario de color marrón que nace sobre un esclerocio. La parte fértil está formada por ascas entremezcladas por hifas de longitud similar e incolora. Las ascas son cilíndricas, planas en la parte superior y contienen 8 ascosporas elípticas, incoloras y de dimensiones sobre 6-9 por 5-6  $\mu\text{m}$ . La forma sexual es poco común en la naturaleza.

La forma imperfecta es *B. cinerea*. El micelio es marrón oliva de 11 a 23  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tiene conidióforos de 1 a 3 mm de largo que se dividen en numerosas ramas para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios. Los conidios (10-12  $\times$  8-10  $\mu\text{m}$ ) son ovoides o globulosos, lisos, unicelulares y ligeramente grisáceos. También produce microconidios unicelulares de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro a partir de micelio viejo.

Cuando las condiciones climáticas se vuelven desfavorables en el otoño y principios del invierno, el micelio produce esclerocios (2-4  $\times$  1-3 mm) negros, discoidales y fuertemente sujetos al sustrato. Están formados de una médula constituida de filamentos agregados de micelio y de una cobertura de células corticales melanizadas.

En cultivo *in vitro*, el micelio se desarrolla muy rápidamente, con un color blanco que cambia posteriormente a un marrón oliva. A temperaturas inferiores a 15°C el micelio produce numerosos esclerocios. A temperaturas superiores a 15 °C, el micelio esporula profusamente produciendo conidios de color gris.

## 1.4. BIOLOGÍA DEL HONGO

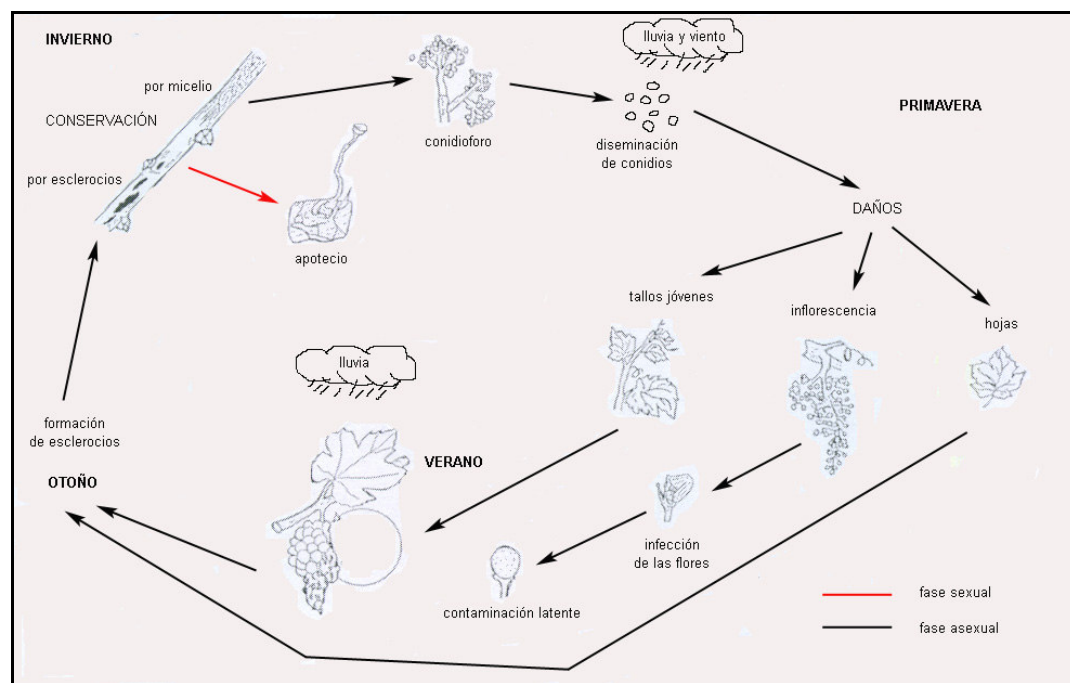
*B. cinerea* tiene características particulares dentro de los hongos fitopatógenos. Es polífago y puede atacar prácticamente a todas las especies de plantas cultivadas y salvajes. Es ubicuo y se encuentra alrededor del mundo y en casi todos los climas. Pero la característica que le hace más especial es que se sitúa en la frontera entre el saprofitismo y el parasitismo, desarrollándose como saprofito sobre residuos vegetales antes de convertirse en parásito. La figura 3 ilustra el ciclo de vida del hongo en vid.

El hongo se conserva en forma de esclerocios durante el invierno en ramas y sarmientos, pero a su vez lo puede hacer en forma de micelio sobre la epidermis de la corteza de la planta. Los conidios pueden igualmente sobrevivir en grietas de la corteza de las ramas.

En la primavera los esclerocios y el micelio producen conidios que el viento y la lluvia se encargan de diseminar. Durante el día la cinética de diseminación está en

función de la humedad relativa, reduciéndose esta diseminación drásticamente durante la noche (Jarvis, 1962). Desde abril la tasa de diseminación se incrementa hasta llegar a su máximo en el momento de maduración de frutos.

Los conidios germinan en un rango de temperaturas entre 1 °C a 30 °C, con un óptimo de temperatura de 18 °C. En medio acuoso, la germinación es estimulada por nutrientes exógenos que pueden provenir de polen o exudados celulares. En ausencia de agua libre la germinación puede tener lugar si la humedad relativa es superior al 90 %. La infección se produce a una temperatura óptima entre 15 °C y 20°C en presencia de agua libre o de una humedad relativa superior al 90 % por al menos 15 horas. Para temperaturas más bajas la duración de la humectación o la humedad relativa debe ser más alta para el éxito de la infección.



**Figura 3.** Ciclo de vida de *B. cinerea* en *V. vinifera*.

## 1.5. MÉTODOS DE LUCHA

### 1.5.1. Control Químico

Desde la primera utilización de los metil benzimidazol carbamatos hace 35 años, se observó el riesgo que tiene la aplicación repetida de fungicidas en el incremento de la resistencia generada por *B. cinerea*. Para reducir la selección de cepas resistentes a fitosanitarios se deben aplicar dosis altas, sin sobrepasar los límites de residuos, y alternar fungicidas con diferente modo de acción sobre el hongo. Sin embargo, cuando se trata de proteger cultivos durante periodos largos de tiempo, en los que hay una continua floración y fructificación, surgen problemas de resistencia. Asimismo, el tiempo desde la aplicación del fitosanitario y la recolección puede ser insuficiente para la protección del cultivo y evitar niveles altos de residuos en el producto, no siendo de utilidad el control químico.

Existen cinco categorías de fungicidas según su modo de acción: los que afectan a la respiración, a la formación de microtúbulos, a la osmoregulación, inhibidores de la síntesis de esterol y aquellos cuya toxicidad es revertida por aminoácidos (Williamson *et al.*, 2007). Los fitosanitarios multiana que afectan a la respiración han sido ampliamente utilizados contra *B. cinerea* sin resultar en un amplio desarrollo de resistencias. Tal es el caso del tiram, mancozeb, captan, diclofluanida, tolifluanida. Sin embargo, se ha comprobado que los genes *Dic1* y *Dic2* confieren resistencia a diclofluanida en aislados de campo (Pollastro *et al.*, 1996). Los metil benzimidazol carbamatos inhiben la formación de la  $\beta$ -tubulina pero desarrollan rápidamente resistencia mediada por el gen *Mbc1*, obligando, para evitar resistencias, al uso de altas concentraciones, las cuales producen una gran persistencia del fitosanitario, lo que limita su uso (Weeds *et al.*, 1999). Las dicarboximidas presentan actividad contra conidios y micelio al afectar al estrés osmótico. Sin embargo, un solo gen polimórfico, *Daf1*, confiere la resistencia de *B. cinerea* a dicarboximidas, aunque proporciona una menor supervivencia de esclerocios (Raposo *et al.*, 2000).

Desde mediados de la década de los noventa, tres nuevos compuestos con una acción potente contra *B. cinerea* están disponibles en el mercado: las

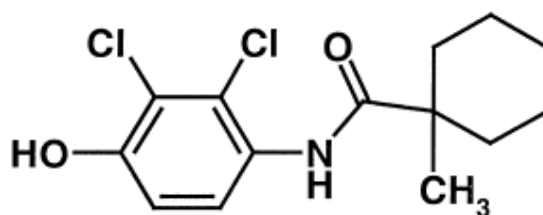
anilino pirimidinas, los fenilpirroles y, más recientemente, las hidroxianilidas (Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

Las anilino pirimidinas están representadas por los compuestos ciprodinilo, pirimetanilo y mepanipirima. Éstos no afectan a la germinación de esporas, pero inhiben la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial inicial en *B. cinerea*. Las anilino pirimidinas se extienden hasta ciertos niveles sistémicamente y están recomendadas como uso preventivo para lograr una buena eficacia y minimizar el riesgo de resistencias a fitosanitarios. El modo de acción de las anilino pirimidinas se basa en la inhibición de la biosíntesis de metionina y probablemente la diana sea la cistaronina- $\beta$ -liasa (Fritz *et al.*, 1997). Asimismo, son capaces de inhibir la secreción extracelular de proteínas, incluyendo hidrolasas fúngicas relacionadas con la patogénesis como cutinasas, lipasas, celulasas y proteasas (Milling y Richardson, 1995). *B. cinerea* es capaz de generar resistencia a las anilino pirimidinas (Moyano *et al.*, 2004) y, a su vez, no perder la capacidad de crecimiento e infección (Bardas *et al.*, 2008).

Los fenilpirroles están representados por el fludioxonil. No es sistémico, pero es altamente resistente a la luz solar debido a sus anillos de fenilo. Inhibe la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento de micelio de *B. cinerea*. Se ha demostrado la existencia de resistencia cruzada entre fenilpirroles y dicarboximidas debida a dos genes situados en el mismo locus (Vignutelli *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha encontrado resistencia cruzada en campo (Hilber *et al.*, 1995). La diana de acción de esta familia está en las cascadas de señalización de osmoregulación y en concreto afectan a la proteína kinasa PK-III, probablemente responsable del control de la síntesis de glicerol (Pillonel y Meyer, 1997).

Las hidroxianilidas, representadas por la fenhexamida (Fig. 4), tienen un modo de acción diferente a las otras clases de fitosanitarios, el cual está relacionado con la integridad y función de la membrana citoplasmática, ya que la aplicación sobre hifas produce secreciones anormales (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Se ha descrito resistencia a este químico, aunque no se ha observado resistencia cruzada con benzimidazoles y carboximidas (de Guido *et al.*, 2007).





**Figura 4.** Fórmula química de la fenhexamida.

### 1.5.2. Control Biológico

El uso del control biológico se ha incentivado en aquellos casos en los que el uso de fitosanitarios ha sido restringido debido a los residuos acumulados en las producciones agrícolas. Los agentes de control biológico utilizados incluyen hongos filamentosos como *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*) y *Ulocladium oudemansii*, levaduras como *Candida oleophila* y *Cryptococcus albidus* (Helbig, 2002), o bacterias como *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas syringae* (Elad y Stewart, 2004). Sin embargo, los agentes de control biológico presentan una serie de problemas como rangos limitados de temperatura y humedad para una máxima eficiencia e influencia de las fluctuaciones naturales de la microflora aborigen según los cambios en el ambiente y en los exudados de la planta.

### 1.5.3. Prácticas culturales

La podredumbre gris es potenciada por una alta humedad, una baja luminosidad y temperaturas moderadas. Una alta humedad promueve la generación de conidios y permite la germinación y penetración en el huésped. La poda del exceso de vegetación facilita la aireación y la reducción de las condiciones que favorecen el desarrollo de *B. cinerea*, siendo ésta muy eficaz para el control del hongo en vid (Gubler et al., 1987). La alta humedad relativa ocasionada por la lluvia se puede reducir en frutos blandos en floración como la fresa o la frambuesa por medio de túneles de plástico o coberturas protectoras de la lluvia lo que permite una

gran expansión de estos cultivos. De este modo, en fresa se consigue una reducción de la enfermedad en un 90 % por medio de estas protecciones en comparación con un cultivo estándar (Xiao *et al.*, 2001). El manejo de los cultivos en post-cosecha se basa en el mantenimiento de la cadena de frío de frutos no madurados que no han sufrido daños durante su recolección. La predicción de la enfermedad en combinación con datos meteorológicos precisos, ha resultado muy eficaz en la reducción de los daños producidos en fresa por el hongo mediante tratamientos específicos en el tiempo (Berrie *et al.*, 2002).

#### **1.5.4. Mejora genética**

La resistencia de plantas contra *B. cinerea*, si bien es probablemente la estrategia más "limpia" y ecológica, es ciertamente una estrategia difícil y compleja, ya que no se han descrito genes mayores de resistencia frente a este patógeno en ninguna especie vegetal. Esto probablemente es debido a la gran diversidad de mecanismos de infección que un patógeno de sus características posee. En algunos cultivares de algunas especies, propiedades morfológicas (tales como el grosor de la cutícula o la vellosoidad de la epidermis) o diferencias en el crecimiento (por ejemplo en la maduración de los frutos o en la densidad de frutos en el racimo o de las hojas) pueden facilitar que la planta evite o escape a la acción del patógeno. Estas características suelen ser caracteres poligénicos, controlados por un número variable de genes, lo que complica su transferencia a los cultivares de interés. No obstante se han logrado resultados parciales interesantes en algunos casos. La cepa LYC4 de *Solanum habrochaites* ha sido utilizada para investigar la resistencia de *Solanum lycopersicum* por medio de poblaciones F2 para obtener una segregación de la que se dedujeron tres QTLs para resistencia a *B. cinerea* (Finkers *et al.*, 2007b). Asimismo, se obtuvieron otras siete QTLs a partir de 30 líneas individuales las cuales contenían fragmentos diferentes y bien definidos de cromosomas *S. habrochaites* LYC4 en el fondo genético de *S. lycopersicum* (Finkers *et al.*, 2007a). El uso de QTLs de resistencia a *B. cinerea* ofrece perspectivas excelentes para la mejora de su control en tomate.

## **2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN *B. CINEREA***

El genoma de *B. cinerea* se compone de unos 42,66 millones de pares de nucleótidos. El proyecto de secuenciación del genoma de la cepa B05.10 ha permitido identificar un total de 16.448 genes (Botrytis-cinerea-Sequencing-Project, 2008). *B. cinerea* tiene una amplia variación natural en virulencia y morfología (Vallejo *et al.*, 2003). Por ello, el análisis de su genoma es una poderosa herramienta en el estudio de los procesos que permiten la infección del hongo en la planta.

### **2.1. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN *B. CINEREA*.**

Dada la importancia de las pérdidas económicas que determina *B. cinerea* en numerosos cultivos y dadas las dificultades encontradas para controlar al patógeno en campo de manera permanente y segura desde el punto de vista medioambiental, han sido muy importantes los esfuerzos de investigación llevados a cabo para identificar factores o elementos clave en el proceso de infección de *B. cinerea* sobre los que intervenir desarrollando estrategias de control alternativas al control químico. Con este objeto, distintos grupos de investigación han trabajado, y trabajan en la actualidad, tratando de diseccionar genéticamente los mecanismos de patogenicidad de *B. cinerea*.

Podemos definir “factor de patogenicidad” como cualquier factor que contribuya a la penetración, invasión, colonización y maceración de un tejido vegetal vivo (Benito *et al.*, 2000). Su identificación puede abordarse desde distintos puntos de vista y aplicando estrategias experimentales diferentes. Podemos considerar, en primer lugar, una aproximación que prejuzga la participación de un determinado factor o de una determinada serie de factores teniendo en cuenta la información adquirida sobre la biología y la fisiología del patógeno durante su interacción con la planta huésped o la similitud del comportamiento observado en nuestro patógeno con

el comportamiento de otros organismos patógenos más o menos próximamente relacionados. Se abordará, entonces, el estudio de factores que “a priori” pudieran estar implicados en el proceso de infección.

Es posible aplicar, en segundo lugar, una aproximación no sesgada ni dirigida basada en la identificación de factores que juegan un papel real en el proceso de infección. A la hora de identificar estos factores, en particular trabajando en un contexto genético, la herramienta esencial y fundamental es la obtención de mutantes alterados en el proceso de infección, ya que cualquier cepa mutante deficiente en el proceso de infección deber ser portadora de una mutación en un gen que juega un papel importante en alguna fase del mismo. Es decir, la pérdida de función permite identificar el factor alterado y valorar su implicación y participación en el proceso de infección. Es ésta una tarea nada sencilla en el caso de *B. cinerea*, dada la naturaleza multinucleada de sus esporas y la frecuente formación de micelios heterocariontes en la naturaleza. Pero disponemos de estrategias de tipo funcional complementarias. Podemos asumir que el patrón de expresión génica del hongo durante su interacción con la planta huésped debe reflejar la activación de los mecanismos específicos necesarios para que la interacción tenga lugar y que el hongo infecte la planta. Siendo así, mediante la caracterización de aquellos genes del hongo que se expresan específicamente durante la interacción resultará posible obtener información sobre los mecanismos y sobre los factores de patogenicidad implicados en la capacidad del hongo para infectar a su huésped.

Recientemente se ha secuenciado el genoma de dos cepas de *B. cinerea*, la cepa B05.10 y la cepa T4, y el genoma de la cepa 1980 de *Sclerotinia sclerotiorum*, especie muy próxima filogenéticamente a *B. cinerea*. La información derivada de estos tres proyectos de secuenciación ha sido liberada y está a disposición de la comunidad científica. En el caso de la cepa B05.10, cepa de referencia con la que trabajamos en nuestro laboratorio, el análisis de la información generada indica que el genoma de *B. cinerea* se compone de unos 42,66 Megapares de bases pudiendo identificarse 16.448 genes (Botrytis-cinerea-Sequencing-Project, 2008). La anotación el genoma mediante el trabajo coordinado de numerosos laboratorios de todo el mundo integrados en un consorcio internacional nos ofrece en la actualidad un

catálogo de genes de *B. cinerea* (y de su pariente cercano *S. sclerotiorum*) que constituye una herramienta de trabajo de extraordinaria utilidad.

Estas estrategias y herramientas proporcionan el punto de partida para llevar a cabo el análisis funcional de posibles “factores de patogenicidad” de *B. cinerea*: la identidad de las unidades informativas, los genes, que determinan o codifican dichos factores. Identificados éstos, los desarrollos de la genética molecular en general, y de la genética molecular de *B. cinerea* en particular, nos permiten caracterizar el papel que estos factores puedan jugar en el proceso de infección. En este contexto, la herramienta esencial es la obtención de mutantes alterados específicamente en un gen dado y su caracterización funcional.

## **2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN GÉNICA EN *B. CINEREA***

La herramienta fundamental utilizada para llevar a cabo un análisis funcional de los genes implicados en cualquier proceso biológico en un sistema vivo se basa en la obtención de mutantes en el gen o genes de interés y en la caracterización de dichos mutantes en comparación con el organismo tipo silvestre. Ello supone el desarrollo de estrategias de mutagénesis dirigida que suponen, a su vez, la generación de determinados tipos de construcciones que luego serán introducidas en el organismo objeto de estudio mediante transformación. El desarrollo de procedimientos de transformación eficientes constituye, pues, un paso previo a la hora de abordar el análisis funcional y la disección genética de cualquier proceso.

La primera transformación con éxito del género *Botrytis* se llevó a cabo en 1989 en *B. squamosa* (Huang *et al.*, 1989). Desde entonces se han desarrollado y descrito diferentes métodos para la transformación y el análisis de la función génica en *B. cinerea*. Unos se basan en la obtención de protoplastos y en la utilización de PEG (Hamada *et al.*, 1997). Otros se basan en la utilización del sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (Rolland *et al.*, 2003). Tanto en un caso como en el otro es necesario disponer de marcadores seleccionables que permitan identificar las células transformadas. En *B. cinerea* se han generado diferentes construcciones que dirigen la expresión de distintos genes de resistencia a fleomicina, higromicina,

nourseotricina y glufosinato (Williamson *et al.*, 2007), los cuales son de utilización común en los procedimientos aplicables en los distintos métodos de análisis de la función génica utilizados en *B. cinerea*.

### **2.2.1. Mutagénesis dirigida por disrupción génica**

Para obtener mutantes por disrupción génica, un fragmento interno del gen objetivo carente del codón de iniciación y terminación, es insertado en un plásmido que contiene un casete con un marcador de selección de resistencia a un antibiótico. El hongo es transformado con la construcción y entre los transformantes obtenidos se buscan e identifican aquellos en los que se ha producido un único evento de recombinación homóloga lo que determina la integración de la construcción en el locus homólogo. La configuración resultante contiene dos partes truncadas del gen objetivo interrumpido por el plásmido con el casete con el marcador de resistencia (Prins *et al.*, 2000). Sin embargo, existen duplicaciones parciales del gen que podrían causar múltiples problemas como silenciamiento (Fulci y Macino, 2007) o RIP (Braumann *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Mutagénesis dirigida por reemplazamiento génico**

Las regiones flanqueantes del gen objetivo son insertadas a ambos lados de un casete con un marcador de selección por resistencia a antibiótico mediante clonación (van Kan *et al.*, 1997) o mediante extensión por PCR (Kars *et al.*, 2005a). El hongo es transformado con la construcción que se integra mediante recombinación homóloga con un doble sobrecruzamiento en ambas regiones flanqueantes, lo que determina la sustitución del gen objetivo por el casete con el marcador de selección.

### **2.2.3. Mutagénesis aleatoria por inserciones de T-DNA**

El método estándar de transformación utilizado en la mayoría de los laboratorios que trabajan con *B. cinerea* se basa en la generación de protoplastos. Sin embargo, se pueden obtener buenas eficiencias de transformación con *A. tumefaciens* (Rolland *et al.*, 2003). Procedimientos de este tipo harían posible la producción de

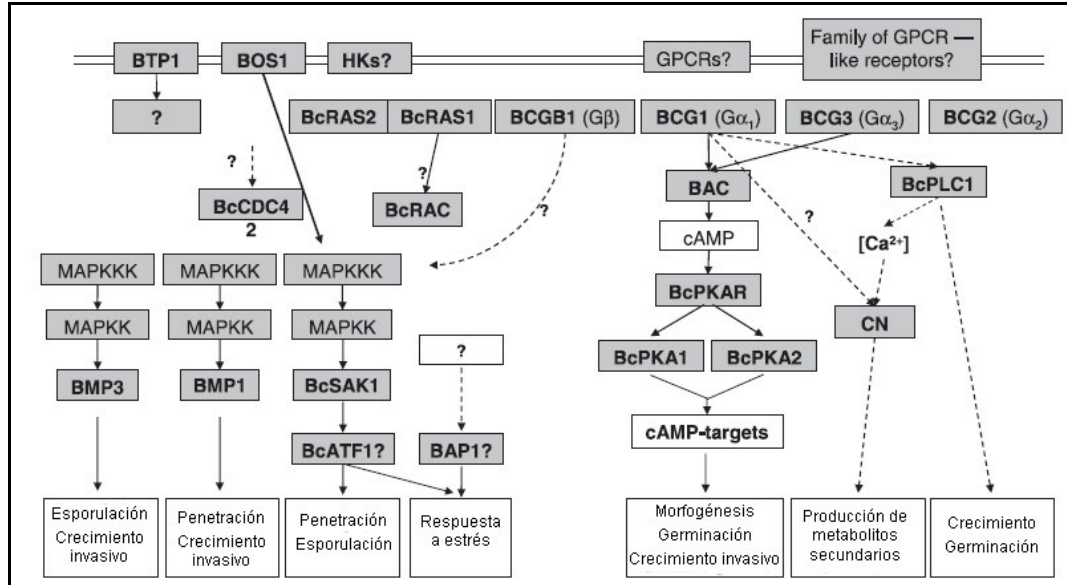
una colección de cepas mutantes por inserción, como, por ejemplo, ha sido el caso en *Arabidopsis* (Alonso *et al.*, 2003). Las cepas obtenidas serían luego analizadas fenotípicamente tratando de identificar mutantes con un fenotipo de interés en los cuales resultaría factible, además, identificar el punto de inserción del T-DNA y, por tanto, el gen alterado. Esta estrategia, utilizada en algunas especies de hongos (Jeon *et al.*, 2007), aunque utilizada en el caso de *B. cinerea* (Williamson *et al.*, 2007), no ha generado resultados de interés.

#### **2.2.4. Silenciamiento génico por ARN de interferencia.**

La técnica del silenciamiento se basa en la introducción de un transgen con la consecuente reducción de la expresión del gen mediante un sistema similar al ARN de interferencia de mamíferos o la cosupresión en plantas (Fulci y Macino, 2007). El silenciamiento génico se ha mostrado como una técnica muy efectiva en hongos patógenos de plantas (Kadotani *et al.*, 2003) y puede ser de gran interés en genes que son importantes en viabilidad o que son esenciales, ya que su expresión se mantiene a diferentes niveles. El Silenciamiento simultáneo de múltiples genes es factible usando construcciones génicas quiméricas (Fitzgerald *et al.*, 2004). Estrategias de silenciamiento génico parcial o inducido pueden permitir examinar las consecuencias de la eliminación de los productos del gen (van Kan, 2006), así como el análisis de familias génicas (Williamson *et al.*, 2007).

### **2.3. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE LA PATOGÉNESIS**

La percepción de las condiciones ambientales y asegurar la apropiada respuesta celular son dos factores esenciales para un correcto desarrollo de la infección del hongo. Existen varias rutas de señalización identificadas en *B. cinerea* que participan en distintos procesos fisiológicos del patógeno, algunos de ellos relacionados más o menos directamente con la capacidad para infectar a la planta huésped. Estas rutas se resumen en la figura 5 y se describen a continuación.



**Figura 5.** Mecanismos de señalización de *B. cinerea* (Williamson *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Ruta de señalización dependiente de la AMPc

La ruta de señalización dependiente de la AMPc está implicada en múltiples procesos en hongos fitopatógenos como crecimiento, conidiación, germinación de esporas, detección de nutrientes y vilurencia (Kronstad, 1997).

En la cascada de señalización en *B. cinerea* encontramos en primer lugar las subunidades  $G\alpha$  de las proteínas G: BCG1, BCG2 y BCG3. Mutantes  $\Delta bcg1$  son capaces de producir conidios y penetrar en el tejido vegetal. Sin embargo, son incapaces de producir lesiones dispersivas (Gronover *et al.*, 2001). La adición de AMPc no restaura el tipo silvestre, lo cual indica que BCG1 está implicada al menos en otra ruta de señalización. Mutantes  $\Delta bcg2$  mostraban un retraso en el crecimiento de las lesiones dispersivas (Gronover *et al.*, 2001). Mutantes  $\Delta bcg3$  mostraban una reducción en la producción de conidios, una germinación inducida por azúcar desigual y un retraso en el proceso de infección, restaurándose el fenotipo del tipo silvestre al añadir AMPc (Doehleemann *et al.*, 2006).

El siguiente paso en la cascada de señalización es el gen codificador de la adenilato ciclasa (*bac*), el cual está activado por BCG1 y BCG3. El mutante  $\Delta bac$  es incapaz de esporular *in planta* aunque la conidiación *in vitro* no resulta alterada



(Klimpel *et al.*, 2002). Al final de la ruta se encuentran las proteínas kinasas dependientes de AMPc (PKA).

### **2.3.2. Ruta de señalización controlada por la MAP kinasa.**

Las MAP Kinasas (“mitogen-activated protein kinase”) de hongos fitopatógenos son esenciales en las primeras fases de infección y en especial en la penetración de la superficie cuticular de la planta (Solomon *et al.*, 2005). El gen *bmp1* de *B. cinerea* codifica una MAP Kinasa homologa a PMK1 de *Magnaporthe grisea* (Xu, 2000); la eliminación del mismo resulta en una alteración del crecimiento, reducción de la conidiación, imposibilidad de entrar en el tejido vegetal y alteración de la germinación de conidios inducida por fuente de carbono (Doehlemann *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2000). BcSAK1 es otra MAP Kinasa de *B. cinerea*, homologa a la proteína HOG1 de *S. cerevisiae*, cuya supresión produce un fenotipo que no genera conidios, desarrolla más esclerocios y no es viable en la infección de plantas; asimismo, la proteína es fosforilada bajo estrés oxidativo y osmótico y cuando es expuesta a fungicidas (Segmuller *et al.*, 2007). Una tercera MAP Kinasa es la BMP3, homologa a *Slr2* de *S. cerevisiae*, cuyo mutante muestra un crecimiento reducido en medio con baja presión osmótica, una conidiación reducida y es incapaz de formar esclerocios (Rui y Hahn, 2007).

### **2.3.3. Ruta de señalización dependiente Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.**

La calcineurina fosfatasa y la ciclofilina A son componentes altamente conservados en la ruta de señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina presentes en *B. cinerea* (Viaud *et al.*, 2003). El mutante del gen *BcP1*, el cual codifica para la ciclofilina A, es capaz de desarrollar estructuras de infección, aunque manifiesta alteraciones en el desarrollo de los síntomas de *B. cinerea* sobre hojas de tomate y judía. Sin embargo, la inhibición de la calcineurina fosfatasa mediante ciclosporin A produce una modificación de la morfología de las hifas y la imposibilidad de infección (Viaud *et al.*, 2003).

BCG1 está implicada en la producción de la fitotoxina botridial, lo que la conecta con la ruta de señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, conexión que

se confirma al considerar la coregulación de genes como la fosfoliasa C (*BcPLC1*) (Schumacher *et al.*, 2008). De este modo, los mutantes  $\Delta Bcplc1$  reprimen la expresión de varios genes controlados por BCG1 y la ruta de señalización dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina.

#### **2.3.4. Ruta de señalización de las proteínas GTPasas.**

Ras y Rho GTPasas juegan papeles variados y superpuestos en la polarización y desarrollo celular en hongos filamentosos (Boyce *et al.*, 2005; Rolke y Tudzynski, 2008). Cinco proteínas han sido caracterizadas en *B. cinerea* correspondientes a esta ruta de señalización: BcRAS1, BcRAS2, BcRAC, BcCDC42 y BcRAB (Williamson *et al.*, 2007). Los mutantes  $\Delta bcras1$  muestran una morfología irregular de las hifas, una pérdida de la capacidad de crecimiento polarizado, una carencia en la producción de esporas y una ausencia de patogenicidad. El fenotipo de los mutantes  $\Delta bcras2$  se caracteriza por presentar una moderada incapacidad de esporular, un ligero descenso de la patogenicidad en planta y una reducción del crecimiento saprofito. Por su parte, el mutante  $\Delta bcrac$  presentaba unas características similares a  $\Delta bcras1$ , lo que indica que los dos genes actúan sobre la misma ruta de señalización. Sin embargo,  $\Delta bccdc42$  no tiene efectos en crecimiento y patogenicidad a pesar de pertenecer a la subfamilia de las GTPasas tipo Rho como  $\Delta bcrac$ .

Las proteínas de la subfamilia Rab de GTPasas funcionan como reguladores del transporte vesicular y están implicadas en exocitosis, endocitosis y diferenciación celular (Siriputthaiwan *et al.*, 2005). Un ortólogo de estas proteínas en *B. cinerea*, *Bcrab2* (Williamson *et al.*, 2007), es esencial para la invasión de las células vegetales mediante la regulación del transporte intracelular de vesículas secretoras implicadas en el transporte de proteínas al medio extracelular.

#### **2.3.5. Sensores y receptores**

Los hongos responden a una variedad de señales ambientales que regulan su desarrollo y metabolismo así como las interacciones con el huésped. Los receptores situados en la superficie de las células fúngicas perciben estas señales y las transmiten a vías intracelulares de señalización. En este sentido, las familias de los

receptores de proteínas tipo G (GPCRs) han sido ampliamente investigadas en hongos patógenos (Kulkarni *et al.*, 2005). En *B. cinerea* se ha identificado un gen perteneciente a este tipo de proteínas, *btp1* (Schulze-Gronover *et al.*, 2005). El mutante  $\Delta btp1$  tenía ligeramente afectada su virulencia y, probablemente, la proteína BTP1 no interactúa con BCG1 durante la patogénesis.

Las histidina kinasas de dos componentes (HKs) son proteínas capaces de detectar señales extracelulares y adaptarse a su entorno. El genoma de *B. cinerea* muestra 20 HKs pertenecientes a 11 clases (Catlett *et al.*, 2003). La clase III de HKs, BOS1, está implicada en osmoregulación, resistencia a dicarboximida y fenilpirroles y virulencia. El fenotipo de los mutantes  $\Delta bos1$  es similar al de los mutantes  $\Delta bcsak1$ , aunque  $\Delta bos1$  puede penetrar en la planta (Viaud *et al.*, 2006).

## **2.4. MOLÉCULAS, MECANISMOS Y PROCESOS IMPLICADOS EN LA PATOGENICIDAD DE *B. CINEREA***

### **2.4.1. Efectores fúngicos**

#### **2.4.1.1. ENZIMAS**

*B. cinerea* es un patógeno oportunista. Sin embargo, es capaz de penetrar en el huésped atravesando la cutícula de la planta cubierta por ceras. Existen pruebas citológicas y genéticas de que *B. cinerea* es capaz de generar apresorios. La proteína BcPLS1, homóloga a PLS1, la cual es esencial en la formación del apresorio de *Magnaporthe grisea* (Clergeot *et al.*, 2001), es una proteína asociada a la membrana que es necesaria para que *B. cinerea* penetre una superficie intacta de la planta (Gourgues *et al.*, 2004). Los apresorios en *M. grisea* son capaces de generar un extremo que ejerce presión sobre el tejido del huésped por medio de la alta presión osmótica generada en el apresorio (de Jong *et al.*, 1997). Sin embargo, *B. cinerea* no es capaz de generar grandes presiones al carecer del septo que separa el apresorio del tubo germinativo y no disponer de las grandes cantidades de melanina que posee *M. grisea* (Doss *et al.*, 2003). Resulta, por lo tanto, que es incapaz de abrirse camino en la cutícula vegetal por medios físicos.

*B. cinerea* necesita secretar enzimas como cutinasas y lipasas para abrirse paso a través de la cutícula vegetal. Sin embargo, cuando se generan mutantes alterados en el gen *cut1* (van Kan *et al.*, 1997) o el gen *lip1* (Reis *et al.*, 2005), éstos no muestran diferencias significativas en relación con la cepa silvestre en cuanto a su capacidad para infectar a la planta huésped. Este hecho es probablemente consecuencia de que en el genoma de *B. cinerea* existen 5 copias adicionales de genes codificadores de cutinasas y 12 de genes codificadores de lipasas (van Kan, 2006) cuyos productos génicos pueden asumir, al menos parcialmente, la función o funciones de las proteínas cuyos genes codificadores han sido alterados.

Un factor adicional que puede facilitar la penetración de *B. cinerea* a través de la cutícula es la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte del propio patógeno. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuye a la modificación de la cutícula proporcionando un sustrato más fácil de descomponer a las oxidasas (Schouten *et al.*, 2002).

Una vez que el hongo ha roto la cutícula, crece a lo largo del muro anticlinal alcanzando las células epidérmicas (Mansfield y Richardson, 1981). Este muro anticlinal es rico en pectinas que *B. cinerea* necesita degradar para abrirse paso y que, además, le sirven como fuente de carbono por medio de las seis endopoligalacturonasas que posee (Wubben *et al.*, 1999). Las endopoligalacturonasas poseen una regulación diferencial *in vitro* (Wubben *et al.*, 2000) e *in planta*; su expresión depende de la especie de planta, el tejido vegetal y las condiciones de incubación (ten Have *et al.*, 2001). Se ha demostrado que principalmente dos de los genes de endopoligalacturonasas tienen una elevada influencia en la virulencia del hongo sobre varios huéspedes (Kars *et al.*, 2005b; ten Have *et al.*, 1998). Asimismo, las enzimas capaces de degradar hemicelulosas, tales como la endo-β-1,4 xilanasa (codificada por el gen *xyn11A*), tienen un pronunciado efecto en la virulencia de *B. cinerea* al retrasar la aparición de lesiones secundarias y reducir el tamaño medio de lesión en más de un 70 % (Brito *et al.*, 2006).

## 2.4.1.2. COMPUESTOS FITOTÓXICOS

### 2.4.1.2.1. Metabolitos fitotóxicos

*B. cinerea* produce un amplio espectro de metabolitos fitotóxicos de bajo peso molecular, de los cuales el más estudiado es el botridial (Colmenares *et al.*, 2002). El botridial fue primeramente descubierto en medio líquido y por un largo tiempo no se sabía si se producía una concentración suficiente durante la infección como para producir un efecto tóxico. Sin embargo, con el desarrollo de métodos espectroscópicos, fue posible la determinación de la concentración de botridial en plantas infectadas cuya correlación con la susceptibilidad en planta muestra que el botridial es un factor esencial pero no primario de la infección (Deighton *et al.*, 2001). Asimismo, el mecanismo de producción de botridial es conocido (Colmenares *et al.*, 2002). El gen *bcbot1* bajo el control de BCG1 forma parte de la ruta de producción de botridial aunque el efecto de este gen en patogenicidad es dependiente de la cepa de *B. cinerea* (Siewers *et al.*, 2005). Las cepas con menos toxinas son menos virulentas, pero el efecto sinérgico con otras toxinas diferentes al botridial como las botcinolidas tiene un efecto determinante en la patogenicidad de diferentes cepas de *B. cinerea* (Reino *et al.*, 2004).

### 2.4.1.2.2. NEP

*B. cinerea* puede producir al menos tres proteínas fitotóxicas: dos proteínas tipo NEP1 (Staats *et al.*, 2007) y una homóloga a las proteínas “Snodprot”, BcSPI (Kunz *et al.*, 2006). De este modo, las proteínas NEP-1 de *B. cinerea* son capaces de causar la muerte de las células del huésped mediante una combinación de mecanismos apoptóticos y necróticos.

### 2.4.1.2.3. Ácido oxálico

Tanto *B. cinerea* como su pariente *S. sclerotiorum* son productores de ácido oxálico (Germeier *et al.*, 1994). El ácido oxálico o ácido dicarboxílico es una molécula simple, versátil y conveniente para *Botrytis* pues acidifica el medio

favoreciendo la producción y actividad de un amplio espectro de enzimas secretadas (Manteau *et al.*, 2003), actúa como quelante de calcio y hierro y reduce el choque oxidativo producido por la planta en el hongo (Cessna *et al.*, 2000). Mutantes de *S. sclerotiorum*, generados por luz ultravioleta, carentes de la producción de ácido oxálico son no patogénicos (Godoy *et al.*, 1990), lo que hace pensar que en *B. cinerea* pudiera pasar lo mismo al compartir sistemas similares de infección.

#### **2.4.2. Participación de *B. cinerea* en la muerte celular programada del huésped**

*B. cinerea* como patógeno necrotrofo necesita matar las células del huésped mediante compuestos tóxicos y enzimas líticas, las cuales consecuentemente descomponen el tejido vegetal para la alimentación del hongo. Esto requiere una interacción del patógeno para inducir la muerte de las células y de la planta para activar mecanismos de muerte celular o apoptosis. La infección de *Arabidopsis* por *B. cinerea* está requiere un programa de muerte celular activo en el huésped (Govrin y Levine, 2000). Experimentos con líneas mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en el programa de muerte celular o en la respuesta de hipersensibilidad (HR) muestran una supresión de la infección por *B. cinerea* (Govrin y Levine, 2000; van Baarlen *et al.*, 2007). *B. cinerea* no induce sistemas de resistencia sistémica adquirida (SAR) e incluso la eliminación del medio de ácido salicílico (hormona vegetal esencial en SAR) incrementa los síntomas del hongo (Govrin y Levine, 2002). De esta forma, *B. cinerea* tiene múltiples formas de facilitar la muerte celular del huésped.

Un choque oxidativo ocurre en diversas interacciones planta patógeno durante la respuesta de hipersensibilidad (HR), la cual confiere resistencia a patógenos biotrofos (Rivas y Thomas, 2005). La infección de hojas de alubia, tomate y *Arabidopsis* por *B. cinerea* resulta en una acumulación masiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en la membrana plasmática de las células vegetales como en el medio extracelular de la superficie de las hifas (Schouten *et al.*, 2002; van Baarlen *et al.*, 2007). Asimismo, la infección de *B. cinerea* puede conducir a la acumulación de radicales libres en tejido infectado (Muckenschnabel *et al.*, 2001a; Muckenschnabel *et al.*, 2003), peroxidación de lípidos (Deighton *et al.*, 1999; Muckenschnabel *et al.*, 2001b) y

eliminación de antioxidantes (Muckenschnabel *et al.*, 2002). Todos estos procesos oxidativos causan una perturbación masiva del estado de oxidorreducción en el tejido infectado y sus alrededores promoviendo el progreso de la infección. La superóxido dismutasa de *B. cinerea*, BcSOD1, es secretada al medio externo de la hifa, la cual puede producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es expresada desde el momento de la penetración de la cutícula y su mutante manifiesta una reducción de la virulencia en múltiples huéspedes (Rolke *et al.*, 2004).

En el caso de un patógeno necrotrofo como *B. cinerea*, la muerte de las células vegetales beneficia al patógeno y conduce a la susceptibilidad del huésped (Govrin y Levine, 2000). El papel de los programas de muerte celular en la infección del hongo es también observado en plantas que expresan proteínas antiapoptóticas, las cuales presentan una mayor resistencia a *B. cinerea* (Dickman *et al.*, 2001). De este modo, se propone un modelo en el cual el balance entre la vida y la muerte es un importante determinante en el éxito de la infección por el hongo (van Baarlen *et al.*, 2007).

### **2.4.3. Evasión de los mecanismos de defensa de la planta**

Las plantas, para prevenir la invasión de patógenos, activan una multitud de rutas de defensa como la producción de metabolitos antifúngicos o de proteínas relacionadas con la patogénesis. El análisis de los cambios del transcriptoma de plantas de *Arabidopsis* infectadas con *B. cinerea* mostró que la expresión de 621 genes se incrementaba y de éstos sólo un tercio estaban bajo el control de las rutas de señalización del etileno, jasmonato o ácido salicílico (AbuQamar *et al.*, 2006). Este estudio identificó 30 genes codificadores de factores de transcripción cuya expresión se incrementaba con la infección y que podrían estar implicados en la regulación de la resistencia basal a *B. cinerea*.

Las proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa (PGIPs) pueden inhibir las endopoligalacturonasas de hongos patógenos de plantas mediante una directa interacción física entre las dos proteínas (Juge, 2006). Así, la expresión de PGIPs de diferentes fuentes en plantas transgénicas incrementa de forma cuantitativa su resistencia a *B. cinerea* (Powell *et al.*, 2000).

*B. cinerea* necesita superar el efecto tóxico de los compuestos de defensa de la planta para ser capaz de tener éxito en una amplia gama de huéspedes. De este modo, plantas que carecen de los genes de síntesis de la fitoalexina camalexina tienen una mayor susceptibilidad al hongo (van Baarlen *et al.*, 2007) y la capacidad de detoxificar camalexina por el hongo produce diferencias en la agresividad de *B. cinerea* (Kliebenstein *et al.*, 2005).



## 3. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO

### 3.1. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un gas incoloro e inodoro con muy baja solubilidad en agua (4.6 ml / 100 ml H<sub>2</sub>O a 20 °C), cuya fórmula química es NO. Su peso molecular es de 30, con un punto de evaporación de -151,7 °C y una densidad en gas de 1,34 g/dm<sup>3</sup>. En el aire el NO reacciona con el O<sub>2</sub> para formar NO<sub>2</sub>, el cual es un gas anaranjado, según la reacción  $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$ , aunque esta reacción es lenta en ausencia de un catalizador a temperatura ambiente. Disuelto en agua reacciona con el O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O para formar ácido nitroso según la reacción  $4\text{NO} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{HNO}_2$ . Además, el NO es un radical libre el cual reacciona con una amplia gama de moléculas orgánicas e inorgánicas.

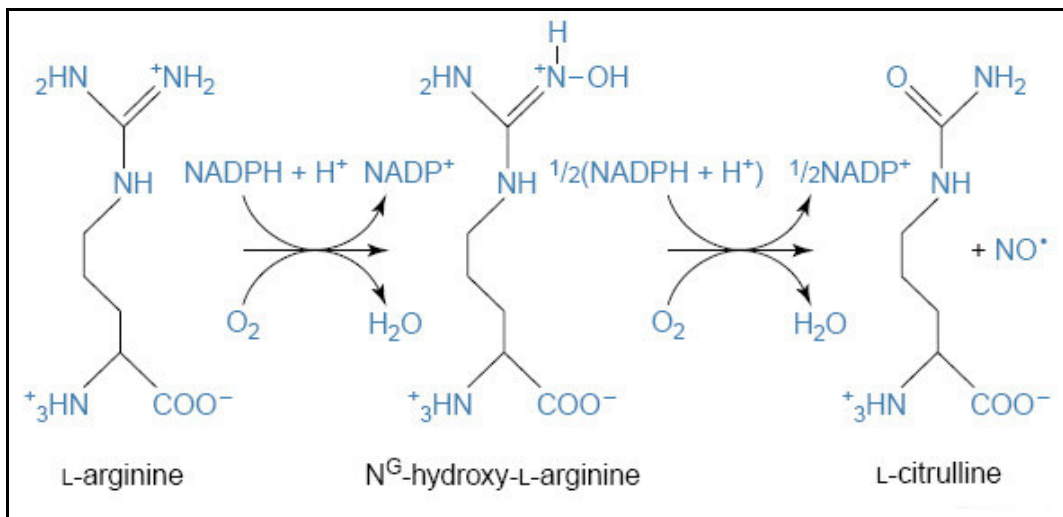
El NO se puede encontrar en altas concentraciones ambientales, debido a su emisión durante la combustión de combustibles fósiles. Tiene un efecto ambiental negativo, ya que es responsable en parte de la lluvia ácida con la producción de ácido nítrico, la pérdida de la capa de ozono debido a su reacción con O<sub>3</sub> y es un potente gas con efecto invernadero (Lawrence y Crutzen, 1999). En la naturaleza el NO es un producto intermedio en reacciones de desnitrificación donde se producen las mayores emisiones biológicas a la atmósfera.

Desde el punto de vista biológico, existen indicios de la producción de óxido de nitrógeno por humanos desde principios del siglo XX (Mitchell *et al.*, 1916). Sin embargo las funciones biológicas del NO se empezaron a estudiar a principios de la década de 1980, principalmente como reguladores endógenos del sistema vascular (Schmidt y Walter, 1994). El NO tiene enormes implicaciones en el metabolismo energético de las células ya que no sólo modula el consumo de O<sub>2</sub> de forma reversible o irreversible, sino que es capaz de modular el balance del consumo de azúcares (Bolanos *et al.*, 2007). El NO es una molécula señalizadora esencial y su implicación biológica abarca desde la interacción de la ruta de señalización de NO con Sildenafil (viagra) en mamíferos (Salloum *et al.*, 2008) hasta el cierre de estomas en plantas (Kolla y Raghavendra, 2007).

## 3.2. PAPEL DEL NO EN EL ESTABLECIMIENTO DE INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

### 3.2.1. Producción de NO en plantas.

En animales, la síntesis de NO es principalmente catalizada por la óxido nítrico sintetasa (NOS), la cual oxida L-arginina a L-citrulina y NO en dos pasos en la reacción que se presenta en la figura 6 (Moncada *et al.*, 1991). Esta reacción también puede ser catalizada por una enzima citocromo P450 (Boucher *et al.*, 1992). Existen dos isoformas de la NOS expresadas a bajos niveles de forma constitutiva en tejido neuronal (nNOS, 160 KDa) y en el endotelio (eNOS, 130 KDa) implicadas en el control de la vasodilatación y en neurotransmisión, respectivamente, y cuya actividad está controlada por la concentración de  $Ca^{2+}$  (Stuehr, 1999). Existe una tercera NOS (iNOS, 130 KDa) de expresión inducible, cuya actividad no es afectada por  $Ca^{2+}$  pero sí controlada por hormonas peptídicas producidas en respuesta a infecciones e inflamaciones (Macmicking *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Producción de NO por NOS (Wendehenne *et al.*, 2001).

Evidencias experimentales de distintos tipos indican que en plantas existen proteínas ortólogas de la NOS de mamíferos. La actividad catalítica de NOS de oxidación de L-arginina a NO y L-citrulina ha sido encontrada en plantas como el guisante (Leshem y Haramaty, 1996), altramuza (Cueto *et al.*, 1996), soja (Delledonne

*et al.*, 1998), tabaco (Durner *et al.*, 1998) y maíz (Ribeiro *et al.*, 1999). Asimismo, inhibidores de la NOS basados en la competencia con la L-arginina como el L-NAME, han sido utilizados para suprimir la producción de NO en soja, *Arabidopsis* y tabaco (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Estudios inmunológicos han demostrado que anticuerpos de NOS de mamíferos se unían específicamente a proteínas de plantas (Barroso *et al.*, 1999) e incluso localizaban estas proteínas en los peroxisomas (Corpas *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha cuestionado la especificidad de los anticuerpos utilizados para detectar la NOS en plantas (Beligni y Lamattina, 2001) y no se han encontrado homologías con las NOS de mamíferos en el genoma de plantas (Mur *et al.*, 2006). Existe un gen aislado en *Arabidopsis*, *Atnos1*, cuya eliminación reduce la producción de óxido nítrico en planta (Guo *et al.*, 2003) aunque su actividad como NOS está cuestionada (Crawford *et al.*, 2006), razón por la cual el gen ha sido renombrado recientemente (*Atnoa1* “*Arabidopsis thaliana* nitric oxide associated 1”). Probablemente *Atnoa1* actúa directa o indirectamente regulando la síntesis de NO (Hong *et al.*, 2008).

Otra enzima capaz de producir NO en planta es la nitrato reductasa (NR) dependiente de NADPH a través de la reacción  $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2$  (Mur *et al.*, 2006). En este sentido cabe destacar que aplicaciones de cantidades elevadas de nitrito bajo condiciones de anoxia (Rockel *et al.*, 2002) o en ausencia de actividad fotosintética (Botrel *et al.*, 1996), incrementan la producción de NO. Asimismo, dobles mutantes de *Arabidopsis* alterados en los dos genes codificadores de enzimas nitrato reductasa, *nia1* y *nia2*, tienen perturbado el cierre de estomas mediado por NO. A su vez, dobles mutantes de *Arabidopsis nia1* y *nia2* muestran una menor producción de NO que los controles cuando son sometidos a la infección por el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, demostrando que la mayor parte del NO durante esta interacción planta-patógeno proviene de la actividad NR con una menor intervención de la actividad tipo NOS (Modolo *et al.*, 2005). Sin embargo, durante las condiciones aeróbicas el nivel de producción de NO es bajo y no se dan niveles altos de nitrito sin comprometer la producción de NO, haciendo poco probable que la NR sea el máximo responsable de producción de NO durante el choque nitrosativo en la interacción planta patógeno (Hong *et al.*, 2008).

Existe una forma de producción no enzimática de NO mediante la reducción de nitrito según  $2\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ \leftrightarrow 2\text{HNO}_2 \leftrightarrow \text{NO} + \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ . Sin embargo, esta reacción está solamente facilitada bajo condiciones ácidas como las que se encuentran en el apoplasto de la aleurona de cebada (Bethke *et al.*, 2004).

### 3.2.2. NO en la Respuesta de Hipersensibilidad (HR).

La respuesta de hipersensibilidad (HR) consiste en el reconocimiento del patógeno por la planta y su respuesta a través de la muerte programada de células vegetales por medio de un fenómeno denominado muerte celular programada o apoptosis ampliamente estudiado en mamíferos. El concepto fue desarrollado a principios del siglo XX (Stakman, 1915) y desde entonces ha sido extensamente estudiado (Mur *et al.*, 2008).

El desarrollo de la muerte de células vegetales a través de HR necesita de un minucioso balance entre la producción de NO y de especies reactivas de oxígeno (Delledonne *et al.*, 2001). En sistemas animales, el NO reacciona con el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), resultado de la reacción de  $\text{O}_2$  con las especies reactivas de oxígeno, para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual es altamente tóxico para células de mamíferos y puede resultar en apoptosis o daños celulares (Bonfoco *et al.*, 1995). En el caso de sistemas con plantas, el  $\text{O}_2^-$  se transforma en  $\text{H}_2\text{O}_2$  por medio de la superóxido dismutasa (SOD) durante la HR, reaccionando el NO con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir  $\text{ONOO}^-$  (Delledonne *et al.*, 2001). Concentraciones de  $\text{ONOO}^-$  de 1-1000  $\mu\text{M}$  en células animales muestran una muerte celular dependiente de concentración (Lin *et al.*, 1995). Sin embargo, las células vegetales muestran una gran resistencia a  $\text{ONOO}^-$ , ya que suspensiones de células de soja resisten a 1 mM de  $\text{ONOO}^-$  (Delledonne *et al.*, 2001). Asimismo, mutantes de *A. thaliana* carentes del gen de la peroxiredoxina II E (PrxII E), la cual detoxifica  $\text{ONOO}^-$  en planta, no mostraban diferencias en muerte celular con el tipo silvestre tanto en muestras sin tratamiento como con 3 mM de  $\text{ONOO}^-$  (Romero-Puertas *et al.*, 2007).

La familia de proteínas caspasas, actúan en la regulación de los programas de muerte celular de mamíferos (Martin y Green, 1995). Las caspasas están inactivadas en células sanas y se activan durante condiciones de estrés o infección, produciéndose la liberación de citocromo c desde las mitocondrias, el cual

interacciona con la proteína Apaf1 para activar la cascada de caspasas (Adams y Cory, 2002). Los genomas de plantas no contienen homólogos a las caspasas, pero se pueden encontrar proteínas similares como las metacaspasas, cuya actividad esta regulada por NO mediante la S-nitrosilación en *Arabidopsis* (Belenghi *et al.*, 2007).

### 3.2.3. Señalización de NO en planta.

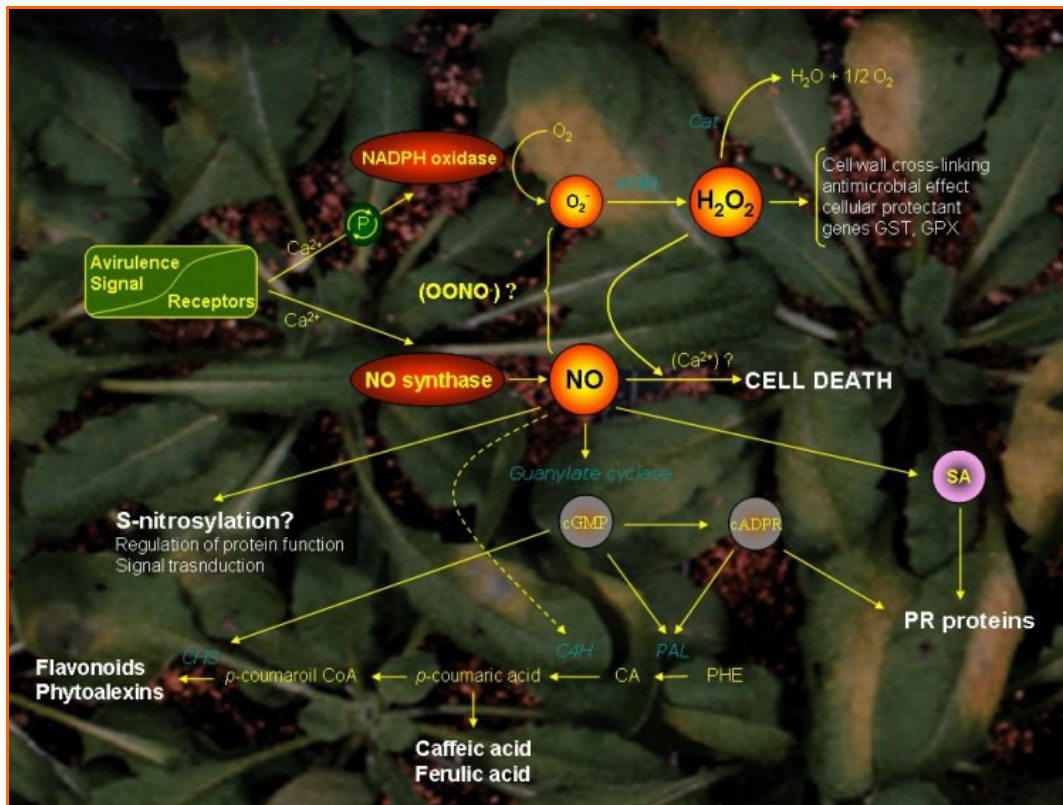
El óxido nítrico tiene efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta, interacción con hormonas, programas de muerte celular, cierre de estomas y germinación de semillas (Cevahir *et al.*, 2007). Los mecanismos en los que afecta el NO a los procesos de transducción de señales implican proteínas de señalización clave como proteínas kinasas y canales permeables de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como la movilización de mensajeros secundarios que incluyen  $\text{Ca}^{2+}$ , cGMP y cADPR (Courtois *et al.*, 2008).

La S-nitrosilación consiste en la unión covalente de una molécula de NO al grupo tiol de la cisteína (Mannick y Schonhoff, 2002). S-nitrosilación es la estrategia más extendida y funcionalmente importante de la modificación postranscripcional por NO (Hess *et al.*, 2005). Es un proceso reversible, recuperandose los grupos tiol de la cisteína y formándose S-nitrosoglutación (GSNO) gracias a la actividad en *A. thaliana* de la GSNO reductasa 1 (AtGSNOR1), la cual está a su vez implicada en la protección contra patógenos (Feechan *et al.*, 2005).

Las proteínas relacionadas con la HR identificadas como controladas por el NO por medio de la S-nitrosilación varían desde las metacaspasas a las peroxiredoxinas (Romero-Puertas *et al.*, 2008). La peroxiredoxina, PrxIII, es responsable de la degradación de  $\text{ONOO}^-$ . Sin embargo el NO es capaz de autorregular sus propios radicales mediante la desactivación de proteínas como la PrxIII (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Las metacaspasas, responsables de la señalización en los programas de muerte celular (Chichkova *et al.*, 2004), son insensibles al NO cuando están maduras, aunque pueden permanecer inactivas mediante S-nitrosilación (Belenghi *et al.*, 2007).

Respecto a la señalización en planta, existe una interacción entre el NO, el ácido salicílico y el ácido jasmónico que se traduce en la activación de grupos similares de genes como los responsables de la síntesis de ácido jasmónico, síntesis

de etileno, señalización de etileno o respuesta a ácido abscísico (Parani *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2004). La señalización por NO durante la HR se puede representar según la figura 7 (Delledonne, 2005).



**Figura 7.** Señalización de NO durante la HR en planta (Delledonne, 2005).

CA, ácido cinámico;  $Ca^{2+}$ , flujo de calcio; cADPR, ADP cíclico ribosa; Cat, catalasa; C4H, ácido cinámico 4-hidroxilasa; CHS, chalcón sintetasa; cGMP, GMP cíclico; GPX, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; NOS, óxido nítrico sintasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; PHE, fenilalanina; PR, proteínas relacionadas con patogénesis; SA, ácido salicílico; SOD, superóxido dismutasa.

### 3.3. PAPEL DEL NO EN *B. CINEREA*.

Estudios farmacológicos en la interacción de *B. cinerea* con NO demostraban la esencialidad del NO para el desarrollo de la infección (Malolepsza y Rozalska, 2005). En este estudio, tratamientos con el secuestrador de NO, c-PTIO, mostraron la reducción y el retraso de la infección de *B. cinerea* en tomate. Por el contrario tratamientos con el donador de NO, dihidrato de sodio nitroprusida (SNP), mostraron el incremento y adelanto de la infección del hongo. Asimismo, los autores

observaron el incremento en la concentración de  $H_2O_2$  en hojas de tomate tratadas con c-PTIO y una reducción de  $H_2O_2$  en hojas tratadas con SNP. De este modo se argumenta que el NO es un potente antioxidante el cual actúa directamente secuestrando especies reactivas de oxígeno y que el  $H_2O_2$  juega un papel importante en la protección de la planta durante la infección de *B. cinerea* en planta (Malolepsza y Rozalska, 2005).

Variedades de *Pelargonium peltatum* resistentes a *B. cinerea* muestran una fuerte y temprana acumulación de NO a la que sigue un segundo choque de NO. Sin embargo, variedades susceptibles muestran una débil temprana acumulación de NO seguida de una producción de NO correlacionada con el desarrollo de la infección (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007). Los autores argumentan que un temprano choque de NO señala la resistencia a *B. cinerea* en la planta y que, por el contrario, la ausencia de este choque produce sobreproducción de NO y la colonización de la planta por el hongo.

El NO afecta al desarrollo del hongo ya que se ha comprobado que la aportación de NO exógeno a *Colletotrichum coccodes* retrasa la germinación y que, por el contrario, el tratamiento con secuestradores de NO acelera la germinación (Wang y Higgins, 2005). Asimismo, el NO es una de las primeras respuestas que realiza la planta ante el ataque de patógenos fúngicos (Prats *et al.*, 2005).

Los hongos filamentosos son capaces de desnitrificar en condiciones anaeróbicas (Shoun *et al.*, 1992) y durante este proceso generar NO (Ye *et al.*, 1994). La producción de NO en condiciones anaeróbicas es debida a la actividad de la nitrito reductasa, la cual usa como sustrato nitrito para producir NO (Morozkina y Kurakov, 2007). En condiciones aeróbicas se ha demostrado mediante mediciones con una combinación de un espectrómetro de masas con entrada de membrana y de un espectrómetro de masas con entrada de capilaridad restringida que *Botrytis* produce NO como respuesta al estrés producido por el fungicida F500 (Conrath *et al.*, 2004).

La producción de NO por *B. cinerea* durante la infección *in planta* ha sido localizada mediante reacciones de quimioluminiscencia por diversos autores (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; van Baarlen *et al.*, 2004; van Baarlen *et al.*, 2007). La producción de NO por el hongo puede ser debida a la actividad de la

nitrito reductasa, aunque su actividad se ve limitada a la disposición de nitrito (Rockel *et al.*, 2002). Actividad de NOS en hongos ha sido detectada mediante métodos bioquímicos (Maier *et al.*, 2001; Ninnemann y Maier, 1996). En el hongo *Coniothyrium minutans*, mutantes carentes del gen de producción de la L-arginina (“L-arginine-specific carbonyl-phosphate synthase”) mostraron una reducción de la germinación la cual se reestablecía añadiendo NO al medio, indicando el efecto de la actividad de la NOS (Gong *et al.*, 2007). Proteínas similares a las NOS han sido detectadas en *Deinococcus radiodurans* (Adak *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Pant *et al.*, 2002) y *Staphylococcus aureus* (Hong *et al.*, 2003). El análisis del genoma de *Aspergillus niger* indica una NOS ortóloga a las anteriores. Sin embargo, en el genoma de *B. cinerea* no existe ningún ortólogo a la NOS de mamíferos



## 4. FLAVOHEMOGLOBINAS

### 4.1. BIOQUÍMICA DE LAS FLAVOHEMOGLOBINAS.

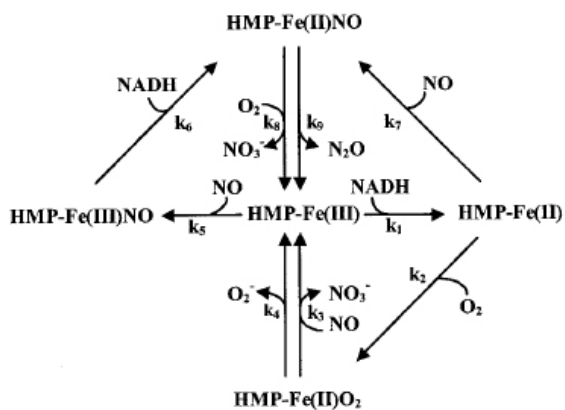
Las flavohemoglobinas fueron aisladas por primera vez de *Escherichia coli* como proteínas solubles tipo hemoglobina (Vasudevan *et al.*, 1991). Casi una década después se caracteriza la función de la flavohemoglobina de *E. coli* describiéndose como una dioxigenasa de NO dependiente de NADPH, FAD y O<sub>2</sub>, la cual produce NO<sub>3</sub> y cuyos mutantes son sensibles al NO (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998). En condiciones anaeróbicas la flavohemoglobina de *E. coli* consume NO generando N<sub>2</sub>O con la participación de NADH (Durner *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999). La sobreexpresión de diferentes flavohemoglobinas de bacterias determinan un incremento de la resistencia natural de *E. coli* a estrés nitrosativo (Frey *et al.*, 2002). Se ha observado también que la flavohemoglobina de *E. coli* puede tener otras funciones, como la derivada de la actividad de alquilhidroperoxido reductasa lo que, junto con su capacidad de unión a lípidos, sugiere que está implicada en la reparación del daño producido en membranas lipídicas por estrés oxidativo y nitrosativo (Bonamore *et al.*, 2003). Mutantes de la flavohemoglobina de *E. coli* no sólo no acumulan más NO, sino que son incapaces de producir NO detectable debido a que se correlaciona con una reducción de la actividad de la enzima nitrito reductasa responsable de la producción de NO (Corker y Poole, 2003). Sin embargo, mutantes de la flavohemoglobina de *Salmonella typhimurium* son capaces de producir NO tanto anaeróbicamente como aeróbicamente, lo que implica que esta flavohemoglobina e interviene en el control de la concentración de NO (Gilberthorpe y Poole, 2008).

El actinomiceto *Streptomyces antibioticus* es capaz de generar flavohemoglobinas en una cantidad que llega a alcanzar el 5% de las proteínas secretadas sin ninguna inducción por NO externo, lo que indica un posible efecto fisiológico diferente a la detoxificación de NO (Sasaki *et al.*, 2004). En este sistema no se detectó NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como producto de la detoxificación de NO.

La hemoglobina de *Saccharomyces cerevisiae* fue descubierta en 1953 (Keilin, 1953), aunque su función confiriendo protección frente a condiciones de estrés nitrosativo no fue caracterizada hasta 47 años más tarde (Liu *et al.*, 2000). La flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (YHB1) es necesaria para el metabolismo de NO, protege a la levadura del estrés nitrosativo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y se ha demostrado que facilita la denitrosilación de proteínas, ya que el mutante *yhb1* tiene 10 veces más de proteínas S-nitrosiladas que el tipo silvestre (Liu *et al.*, 2000).

Existen otras proteínas con implicación en la degradación de NO. Una de ellas es la tiorredoxina, cuya expresión se ha visto relacionada con la resistencia de células animales al daño producido por NO (Ferret *et al.*, 2000).

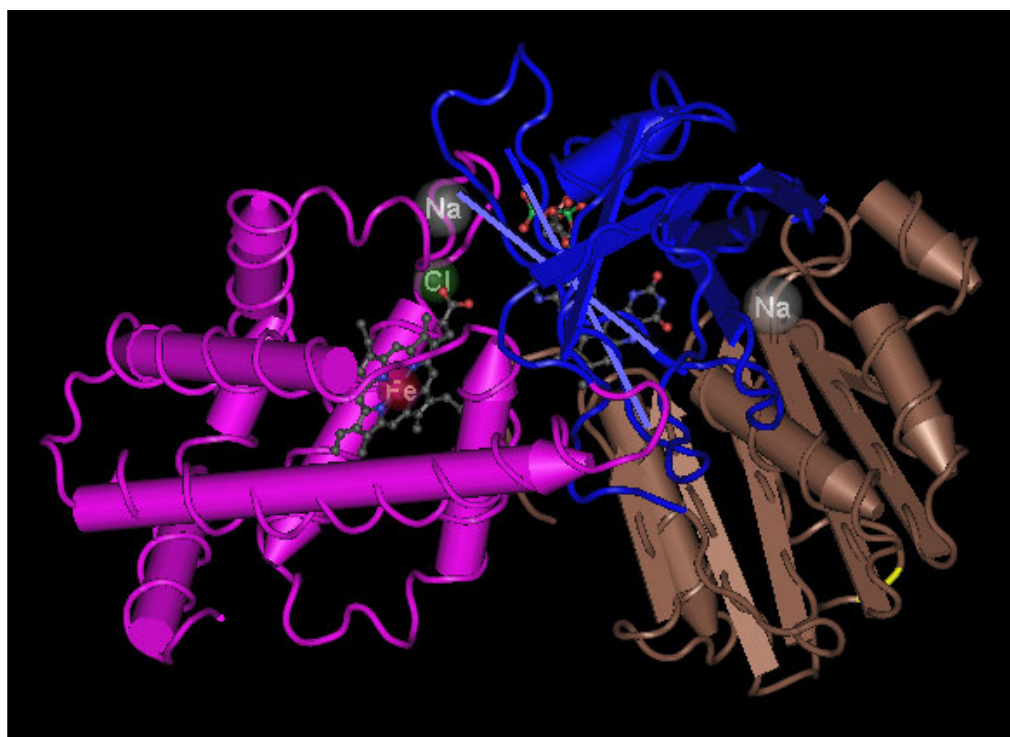
Las flavohemoglobinas catalizan la reacción de NO con O<sub>2</sub> para producir NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en un proceso en el que la enzima se une preferiblemente al NO (Hausladen *et al.*, 2001). De forma simplificada la reacción sería (Gardner *et al.*, 2000): 2NO + 2O<sub>2</sub> + NADH → 2NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NAD<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>. En la figura 8 se resume el proceso completo en el que el grupo hemo (Fe) se oxida y reduce para producir la detoxificación del NO.



**Figura 8.** Ciclo catalítico de las flavohemoglobinas (Hausladen *et al.*, 2001).

La flavohemoglobina de *E. coli* (*hmp*) contiene dos dominios, cada uno de los cuales es incapaz de detoxificar NO por sí solo, siendo imprescindible para la actividad catalítica de las flavohemoglobinas la actividad de sus dos dominios (Hernandez-Urzuza *et al.*, 2003). Los dos dominios de *hmp* son el de la globina y el de oxidoreducción que incluye el dominio de unión a FAD (FAD\_binding\_6) y el dominio de unión a NAD (NAD\_binding\_1).

La estructura tridimensional de la hmp que elabora el programa Cn3D a partir de datos experimentales obtenidos mediante rayos X (Ilari *et al.*, 2002) se puede observar en la figura 9. Está revela la presencia del grupo hemo y flavina correspondientes a los dominios de la globina (en color rosa) y oxidoreducción (dominio FAD\_binding\_6 en color azul y el dominio NAD\_binding\_1 en color marrón).



**Figura 9.** Estructura tridimensional de la flavohemoglobina de *E. coli*.

El dominio globina está dibujado en color rosa, el dominio FAD\_binding\_6 en color azul y el dominio NAD\_binding\_1 en color marrón.

La flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (YHB1) se localiza en dos compartimentos celulares distintos: el citosol y la matriz mitocondrial (Cassanova *et al.*, 2005). La localización mitocondrial de YHB1 tiene implicaciones en el control de la cadena respiratoria, ya que el NO que degrada es capaz de inhibir la citocromo C oxidasa y la respiración (Boveris *et al.*, 2000; Szibor *et al.*, 2001) y de reaccionar con el superóxido para formar peroxinitrito (Cadenas *et al.*, 2000). De esta forma, en ausencia de la flavohemoglobina los niveles de NO se incrementan (Liu *et al.*, 2000), se inhibe la citocromo C oxidasa, se incrementa la producción de superóxido y, consecuentemente, los niveles de peroxinitrito. Así, la levadura puede reducir los

niveles de superóxido no sólo mediante la superóxido dismutasa sino reduciendo su formación vía cadena respiratoria al eliminar NO mediante la flavohemoglobina. De este modo, YHB1 es esencial para la supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo (Liu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 1996). La distribución de la flavohemoglobina entre el citosol y la matriz mitocondrial se regula diferencialmente dependiendo de las condiciones de anoxia y del tipo de genoma mitocondrial, permitiendo de manera indirecta la eliminación del estrés oxidativo (Cassanova *et al.*, 2005). Las proteínas localizadas en uno y otro compartimiento subcelular son codificadas por el mismo gen, ya que la mutación de *yhb1* elimina ambas proteínas y la reintroducción del gen restaura la aparición de la proteína en el citosol y en la matriz mitocondrial (Cassanova *et al.*, 2005).

Se han descrito también proteínas de tipo flavohemoglobinas en hongos filamentosos. En *Fusarium oxysporum*, una de sus flavohemoglobinas ha sido aislada y caracterizada. Esta flavohemoglobina tiene más semejanzas con la enzima de bacterias denitrificantes que con la flavohemoglobina de levaduras (Takaya *et al.*, 1997). En *Cryptococcus neoformans*, mutantes de la flavohemoglobina muestran una inhibición parcial de su crecimiento en presencia de NO (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). La disponibilidad y el análisis del genoma de distintas especies de hongos ha permitido constatar la presencia de genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en la mayor parte de las especies estudiadas. En el caso concreto de *B. cinerea* los primeros análisis bioinformáticos de una genoteca de cDNA de este organismo permitieron identificar fragmentos de cDNA (clones AL116429.1 y AL115888.1) (Gardner *et al.*, 2000) cuya traducción da lugar a secuencias de aminoácidos con una homología significativa con regiones dadas de enzimas tipo flavohemoglobina. Estos primeros análisis proporcionan las primeras evidencias experimentales sobre las que se sustenta el trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral.

Es interesante destacar que hasta la fecha no se han descrito enzimas de tipo flavohemoglobina ni en especies vegetales ni en especies animales. Las plantas poseen hemoglobinas no simbióticas que presentan actividad de degradación de NO (Perazzolli *et al.*, 2004). Sin embargo su actividad y su modo de acción no son similares a los descritos para las flavohemoglobinas (Perazzolli *et al.*, 2004).

## 4.2. EXPRESIÓN DE LAS FLAVOHEMOGLOBINAS

El NO regula la expresión de genes en diferentes especies. En eucariotas, el NO tiene una influencia directa sobre factores de transcripción, aguas arriba de las cascadas de señalización, en la estabilidad y traducción de mRNA y en el procesamiento de productos primarios de genes (Bogdan, 2001). Interesantemente, estudios de expresión llevados a cabo sobre plantas de tabaco indican que el NO y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la expresión de rutas de señalización similares (Zago *et al.*, 2006).

El gen más inducido bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas en *Bacillus subtilis* en respuesta a tratamientos con NO en forma de gas es el gen codificador de flavohemoglobina (Moore *et al.*, 2004). Sin embargo, este mismo estudio muestra que la respuesta al estrés del NO gas y del donador SNP son diferentes. A pesar de que ambos tratamientos inducen el regulón  $\sigma^{\beta}$ , el NO gas lo hace mediante la vía energética y el SNP mediante la vía de estrés ambiental. El fenómeno en la diferencia de la respuesta transcripcional dependiendo de la fuente de NO ha sido también observada en *S. cerevisiae* (Sarver y DeRisi, 2005). Este fenómeno es debido probablemente a la cantidad de NO liberada por el donador y el tiempo de exposición a NO que tiene cada donador determinado por su vida media (Fitzhugh y Keefer, 2000).

La expresión del gen codificador de la flavohemoglobina de *E. coli* (*hmp*) está particularmente inducida por NO (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998; Membrillo-Hernandez *et al.*, 1998; Poole *et al.*, 1996) aunque esta inducción no se ve influenciada por el O<sub>2</sub> (Poole *et al.*, 1996). Asimismo, la inducción de la flavohemoglobina de *Salmonella enterica* mediante agentes generadores de superóxido se ha visto que es regulada por *RamA* (Hernandez-Urzua *et al.*, 2007).

La flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (*yhb1*) tiene una expresión constitutiva que no se ve incrementada con tratamientos del donador de NO DETA/NO en cultivos logarítmicos o estacionarios bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Liu *et al.*, 2000). Por el contrario, la respuesta de *S. cerevisiae* al tratamiento con DPTA/NONOate incrementa la expresión de *yhb1* 10 veces (Sarver y DeRisi, 2005). Este diferente comportamiento puede ser debido a las diferencias en los donadores de NO, medios de cultivo, cepas de levadura, sensibilidad del método de medida o

condiciones de cultivo utilizadas. La expresión de *yhb1* tampoco es significativamente afectada por químicos que imponen estrés oxidativo como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, paraquat y menadiona (Buisson y Labbe-Bois, 1998; Zhao *et al.*, 1996). Sin embargo, la expresión de *yhb1* es menor en cultivos anaeróbicos de la levadura que en aeróbicos (Crawford *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 1996). Asimismo, la expresión de *yhb1* se ve reducida profundamente después del cambio diauxico desde la fase logarítmica a la estacionaria, siendo este cambio independiente de la fuente de nutrientes (Crawford *et al.*, 1995).

La mutación de *Fzf1p* en *S. cerevisiae* elimina la respuesta de transcripción al estrés nitrosativo donde resalta *yhb1* y, por el contrario, la sobreexpresión de *Fzf1p* estimula la expresión de *yhb1* y del grupo de genes estimulados por NO, pero sin que se añada NO (Sarver y DeRisi, 2005). Este trabajo fue realizado utilizando microarrays los cuales constituyen una herramienta poderosa que ha sido aplicada en otros microorganismos para ver su respuesta transcripcional a NO. Tal es el caso de *Candida albicans*, cuya respuesta a NO muestra a *yhb1* como el gen cuya expresión más se induce (Hromatka *et al.*, 2005).

Se han realizado modelados de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a NO mediante una aproximación conducida por una red bayesiana (Zhu *et al.*, 2006). Las predicciones del modelo fueron confirmadas con trabajo experimental de expresión y muestran que la expresión de *yhb1* se incrementa de 2 a 4 veces al cambiar de un medio con glucosa a uno de galactosa o rafinosa, respectivamente, independientemente de *Fzf1p*.

### **4.3. IMPLICACIÓN DE LAS FLAVOHEMOGLOBINAS EN PATOGENICIDAD.**

En modelos animales las flavohemoglobinas son unos poderosos agentes detoxificadores de NO con un claro efecto en virulencia. La flavohemoglobina de *C. neoformans* es esencial para la virulencia del hongo en ratones al degradar el NO producido por la iNOS, ya que la virulencia de mutantes de flavohemoglobina se reestablece en animales iNOS<sup>-/-</sup> (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Es interesante destacar que en el mismo trabajo se indica que el estudio y caracterización de dobles

mutantes de la flavohemoglobina y de la superóxido dismutasa, responsable esta última de la protección de *C. neoformans* al estrés oxidativo, demuestran un efecto sinérgico de ambos sistemas en la reducción de la virulencia sobre ratones.

La reducción de virulencia de los mutantes de flavohemoglobina se ha descrito en *C. albicans* (Hromatka *et al.*, 2005; Ullmann *et al.*, 2004). En el genoma de *C. albicans* se identifican tres flavohemoglobinas, pero sólo una, *yhb1*, es inducida por NO y responsable de la degradación de NO y de la virulencia (Ullmann *et al.*, 2004). Sin embargo, los mutantes del gen *yhb1* de *C. albicans* no recuperan la virulencia en ratones carentes de NOS2 (Hromatka *et al.*, 2005). En la bacteria patógena humana *S. enterica* su flavohemoglobina es necesaria para la infección de ratones, restaurándose la virulencia en ratones carentes de la iNOS (Bang *et al.*, 2006).

En plantas, el NO es esencial para la HR y la resistencia a patógenos (Crawford y Guo, 2005; Delledonne *et al.*, 1998). De hecho, mutantes de *Arabidopsis thaliana* AtNOS1 cuya producción de NO se ve mermada, tienen una dramática susceptibilidad al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Zeidler *et al.*, 2004).

La flavohemoglobina de *Erwinia chrysanthemi* (HmpX) es inducida durante la infección y es esencial para el desarrollo de ésta (Favey *et al.*, 1995). HmpX consume NO y previene la inhibición de la respiración celular por NO, produciendo el mutante de HmpX la acumulación de altos niveles de NO y la HR en el huésped (Boccaro *et al.*, 2005). La expresión constitutiva de HmpX en *Pseudomonas syringae* incompatible suprime dramáticamente la HR y el desarrollo de síntomas en *Arabidopsis* (Boccaro *et al.*, 2005). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen *hmp* de *E. coli* reducen el NO acumulado *in planta* y la atenuación del choque de NO producido por el patógeno (Zeier *et al.*, 2004). Tomando todos estos datos en su conjunto podemos deducir que las flavohemoglobinas son unos potentes detoxificadores del NO que reducen la HR en plantas y el estrés nitrosativo en el patógeno.





## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El óxido nítrico es una potente molécula señalizadora con actividad en todos los grupos de organismos, desde microorganismos a mamíferos, pasando por las plantas. La investigación del papel que el NO pueda jugar en las interacciones planta-patógeno en las que participa *B. cinerea* abre un interesante campo de estudio que proporcionará información básica para profundizar en la caracterización de los mecanismos de patogenicidad del hongo, los mecanismos de resistencia de la planta y contribuirá a resolver los importantes problemas de sanidad vegetal ocasionados por este patógeno.

Son objetivos de la presente Tesis Doctoral los siguientes:

- 1- Aislamiento, identificación y clonación del gen o genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en el hongo fitopatógeno *B. cinerea*.
- 2- Estudio de los patrones de expresión del gen o genes de *B. cinerea* codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina durante el crecimiento saprofítico del patógeno, en respuesta a la exposición a NO exógeno y durante la interacción con la planta huésped.
- 3- Expresión heteróloga del gen o genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *B. cinerea* en la cepa mutante yhb1 de *S. cerevisiae*, deficiente en la actividad de la enzima flavohemoglobina, y análisis de la actividad enzimática de la proteína o proteínas BcFGH expresada/s en la levadura.
- 4- Obtención de mutantes de *B. cinerea* deficientes en el gen o genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina mediante técnicas de reemplazamiento génico.
- 5- Caracterización bioquímica y fisiológica de los mutantes de *B. cinerea* deficientes en el gen o genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina. Evaluación del papel que pueda jugar la detoxificación de NO en la capacidad de *B. cinerea* para infectar a la planta huésped.

- 6- Análisis de la producción de NO por *B. cinerea* durante el crecimiento saprofítico en cultivo en medio líquido y durante la interacción con la planta mediante métodos quimioluminiscentes y fisicoquímicos.
- 7- Optimización de los procedimientos experimentales en la transformación de *B. cinerea* para el análisis de la función génica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1. ORGANISMOS

## 1.1. PLANTAS

Las plantas de la variedad de tomate (*Lycopersicum esculentum*) Roma utilizadas en este trabajo fueron cultivadas y cedidas por los Doctores Pablo Benavides y José Luis Palomo del Centro de Diagnóstico de Aldearrubia, Salamanca, de la Junta de Castilla y León.

Las plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) utilizadas también fueron facilitadas por los Doctores Pablo Benavides y José Luis Palomo del Centro de Diagnóstico de Aldearrubia, Salamanca, de la Junta de Castilla y León.

El ecotipo columbia (Col-0) de *A. thaliana* y la línea mutante *Atnos1* (mutante de Col-0 deficiente en la producción de NO (Guo *et al.*, 2003)) fueron proporcionadas por el Dr. Óscar Lorenzo Sanchez.

El material vegetal de vid (*V. vinifera*) utilizado en este trabajo fue recogido de campos experimentales de control del Instituto Tecnológico Agrario de la Junta de Castilla y León. Se utilizaron diferentes tipos de variedades de campo cultivadas tradicionalmente y comercialmente en Castilla y León como Tinta del País, Tinta de Toro, Tempranillo, Verdejo, Garnacha o Juan García.

## 1.2. HONGOS

La cepa tipo silvestre de *B. cinerea*, B05.10, fue obtenida en el laboratorio del Professor Paul Tudzynski (Wilhelms Universität Münster, Alemania) (Buttner *et al.*, 1994). Se trata de una cepa haploide ampliamente caracterizada en diversos laboratorios y derivada de la cepa de campo SAS56 (Faretra *et al.*, 1988) mediante tratamiento con benomilo. Se utilizaron stocks de la cepa de B05.10 conservada en dos orígenes diferentes, uno de la Universidad de Salamanca (EB05) y otro de la Universidad de Münster (TB05). Asimismo, se utilizaron otras dos cepas tipo silvestre, las cepas T4 y Pi, y las cepas mutantes alteradas en el gen codificador de la enzima nitrato reductasa (*niaD*) derivadas de estas últimas, denominadas cepas pT4 y

2Pi, proporcionadas por Caroline Levis de la Estación de Patología Vegetal del INRA, Francia, (Levis *et al.*, 1997).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* cepa Sp1 (Ramos *et al.*, 2007) y *Phycomyces blakesleeanus* cepa C141B (colección del Dr. Arturo Pérez Eslava) fueron utilizadas como controles del crecimiento de *B. cinerea*.

### 1.3. LEVADURAS

Se utilizó la estirpe de *S. cerevisiae* BY4743 (MATa/a his3D1/his3D1 leu2D0/leu2D0 lys2D0/LYS2 MET15/met15D0 ura3D0/ura3D0) y su mutante correspondiente para la flavohemoglobina, *yhb1* (Liu *et al.*, 2000). Ambas estirpes fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Alexander Idnurm de la Universidad de Duke, EE.UU.

### 1.4. BACTERIAS

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

La cepa de *E. coli* LE392 (F-, *hsdR514*, *supE44*, *supF58*, *lacY1*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*,  $\lambda$ -) (Promega) fue usada en los experimentos de infección y multiplicación de bacteriófagos.

### 1.5. VIRUS

El bacteriófago Lambda3 de Promega fue usado como vector de clonación y construcción de una genoteca de DNA genómico de *B. cinerea* cepa B05.10.



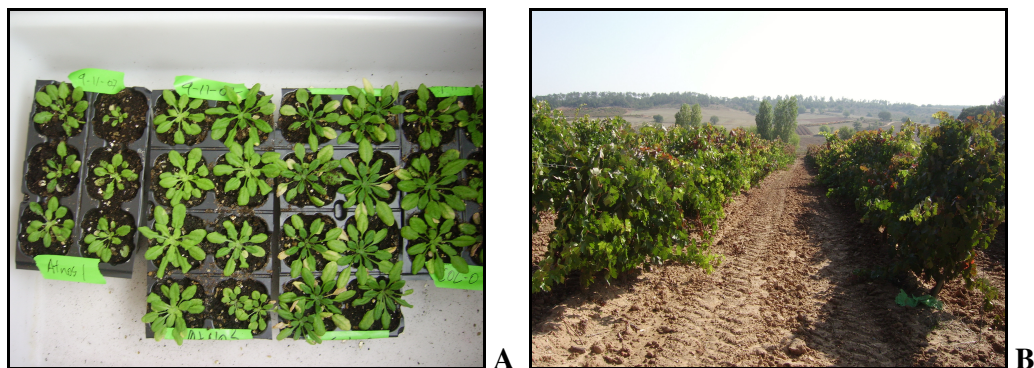
## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1. PLANTAS

Las plantas de tomate y tabaco fueron cultivadas en vermiculita en el invernadero del Centro de Diagnóstico de Castilla y León (Aldearrubia, Salamanca) durante 8 semanas.

Las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en placas de Petri estériles que contenían 2 % agar en agua. Se incubaron durante 3 días a 4 °C para eliminar la dormición de las semillas y después fueron incubadas a 22 °C con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 70 % de humedad relativa (HR). Después de una semana las plántulas fueron transplantadas a sustrato compuesto por 3 partes de turba por una de vermiculita. Las plantas fueron incubadas durante un mes a 22 °C con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 70 % de HR para la obtención de hojas bien desarrolladas. Una muestra de las plantas obtenidas se puede ver en figura 10A. Posteriormente, el fotoperiodo se cambió a 16 horas de luz para la inducción de la floración y la producción de nuevas semillas.

Las cepas de vid fueron cultivadas en campos experimentales de control sin ningún tratamiento fungicida localizados en Castilla y León (Fig. 10B). Se recogieron hojas durante el verano para realizar los ensayos de infección.



**Figura 10.** Material vegetal utilizado en los experimentos.

**A-** Plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas preparadas para recoger material para infectar. **B-** Campos experimentales donde se recogió material de vid para infectar.

## 2.2. HONGOS

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

El medio estándar usado para el cultivo de *B. cinerea* en medio líquido fue el medio B5 que contiene sales Gamborg's B5 con vitaminas (AppliChem) (3,17 g/l) suplementado con 10 mM Sucrosa y 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,0. El medio fue inoculado rutinariamente con  $5 \times 10^5$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  (sp/ml), mantenido a temperatura ambiente sin agitación por una hora para favorecer la sincronización en la germinación e incubado posteriormente a 22 °C con agitación a 180 r.p.m. Alternativamente se utilizó extracto de malta (Difco) (ME) cuando se necesitó un medio más rico para determinar un desarrollo del hongo más rápido o para obtener micelio para la preparación de protoplastos.

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

Para la obtención de conidios se sembraron placas de Petri de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) suplementadas con 30 % p/v de extracto de hojas de tomate (Benito *et al.*, 1998). Dichas placas fueron inoculadas bien a partir de suspensiones de conidios, bien a partir de trozos de micelio transferidos con pinzas estériles y se dejaron crecer durante 4 días a 22 °C. Una vez que el micelio ha cubierto la placa Petri, se favorece la conidiación al exponer el micelio a luz ultravioleta de onda larga (280-420 nm) durante 16 horas. Las placas se incuban entonces por una o dos semanas hasta tener la máxima producción de conidios.

Para el análisis del crecimiento saprofito se utilizaron placas de medio MEA (Malt Extract Agar, Difco) y de medio B5 sólido compuesto por sales Gamborg's B5 con vitaminas (AppliChem), 10 mM Sucrosa, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7 y 2 % agar.

La selección de transformantes resultado de la transformación de *B. cinerea* se realizó utilizando el medio MEA (Malt Extract Agar, Difco) al que se añadió, una vez esterilizado en el autoclave, 70  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina (Roche).

### 2.3. BACTERIAS

*E. coli* fue cultivada en medio LB (Luria-Bertani) líquido o sólido, el cual está compuesto por 0,5 % de extracto de levadura (Difco), 1 % de bacto triptona (Difco), 1% de NaCl y 2 % de agar en el caso del medio sólido. La temperatura de incubación fue 37 °C y en el caso de cultivo en medio líquido se aplicó agitación a 220 r.p.m. Cuando fue requerida la selección de colonias utilizando la resistencia a la ampicilina, se añadieron, después de esterilizar el medio LB en el autoclave, 100 µg/µl de ampicilina esterilizada por filtración. Cuando se llevaron a cabo infecciones con bacteriófagos, el medio LB fue suplementado con 0,2 % maltosa y 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 2.4. LEVADURAS

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, Difco) en medio líquido fue usado para la obtención de células competentes para la transformación de levaduras.

SC (Synthetic Minimal) es el medio de selección de levaduras cuya composición por litro de medio es: 6,7 g de Yeast Nitrogen Base without Amino Acids (Difco), 20 g Glucosa, 2 g Casamino Acids (Difco) y 20 g Agar.

El medio SC+U (Synthetic Minimal+Uracilo) no es selectivo y su composición es como el SC pero añadiendo 0,1 g de Uracilo por litro.

El medio de inducción es el medio SC+U donde se ha sustituido la glucosa por un 2 % de galactosa.

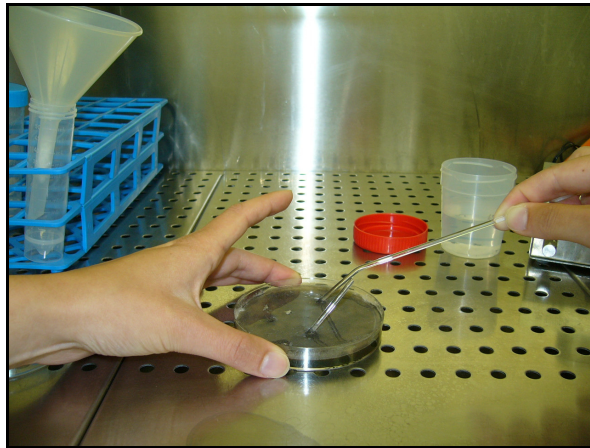
### 2.5. BACTERIÓFAGOS

Los fagos se conservaron a 4 °C en tampón de fagos (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>). *E. coli* LE392 fue cultivada en medio LB suplementado con 0,2 % maltosa y 10 mM MgCl<sub>2</sub> a 37 °C en agitación a 200 r.p.m. hasta lograr una OD<sub>600</sub> de 0,6. Se mezclaron 100 µl de diluciones de fagos con 100 µl del cultivo de bacterias y se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. La

suspensión de bacterias-fagos se mezcló con 3 ml de top-agar compuesto por LB, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% maltosa y 0,7% de agarosa, precalentado a 50 °C. Inmediatamente después de mezclarlos suavemente se vertieron sobre placas de LB las cuales se dejaron solidificar y fueron incubadas a 37 °C una noche hasta tener halos de infección.

### 3. EXTRACCIÓN DE CONIDIOS DE *BOTRYTIS CINEREA*

El trabajo de extracción de esporas se realizó en una campana de flujo laminar para garantizar las máximas condiciones de esterilidad. Sobre placas esporuladas de *B. cinerea* se añadieron 10 ml de  $5 \times 10^{-4}$  % Tween20 y se agitó suavemente con una asa de siembra para favorecer la liberación de los conidios en la suspensión de Tween 20 (Fig. 11). Posteriormente, se recogió la suspensión con una pipeta y se depositó en un embudo con lana de vidrio en su parte más estrecha utilizado como filtro de micelio. La suspensión de esporas fue transferida a un tubo de centrifugación de 50 ml. Se repitió de nuevo la operación para recoger los conidios que pudieran haber quedado sobre la placa petri.



**Figura 11.** Extracción de conidios de *B. cinerea* a partir de una placa de PDA-tomate.

La suspensión de conidios se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 20 ml de agua destilada estéril, se resuspendieron los conidios mediante agitación vigorosa y se volvió a centrifugar la suspensión a 1.000 r.p.m. por 10 minutos. Este proceso de lavado se repitió dos o tres veces. Finalmente, después del último lavado, las esporas fueron resuspendidas en 10 ml de agua destilada estéril.

Una alícuota de la suspensión de esporas resultantes se diluyó (1:100 y 1:10) para poder ser contadas en una cámara Thoma. La concentración de esporas fue calculada teniendo en cuenta las características de la cámara Thoma utilizada, las repeticiones realizadas y el factor de dilución aplicado.

Las esporas fueron conservadas a 4 °C durante una semana para su uso en fresco. Para una conservación a largo plazo, la suspensión de esporas se conservó en 15 % glicerol a -80 °C.

## 4. ENSAYOS DE CRECIMIENTO SAPROFÍTICO

Una suspensión de  $1 \times 10^5$  esporas por cada ml de agua destilada estéril fue utilizada como stock inicial de las cepas de *B. cinerea*. El medio de cultivo, diferente según las necesidades de cada experimento, fue MEA, B5 sólido o B5 sólido suplementado con 200 mg/l de Arginina (Sigma). En el centro de cada placa Petri se sembró una gota de 5  $\mu$ l de la suspensión de conidios para obtener 500 esporas totales. Por cada muestra se sembraron 3 ó 4 placas para obtener un número de repeticiones estadísticamente significativo.

Las placas se dejaron crecer a 22 °C y se midió el diámetro de la colonia a los días 3, 4 y 5 después de la inoculación de las placas. Por cada placa se midieron 2 diámetros perpendiculares registrándose para su posterior análisis. Las placas se siguieron incubando a 22 °C para observar su fenotipo respecto a la producción de conidios y micelio o el desarrollo de esclerocios.

Para la inducción de estrés nitrosativo se utilizaron los donadores de NO DETA/NO (Dietilenotriamina, Sigma) a una concentración de 0,125 mM en MEA y SNP (Dihidrato de Sodio Nitroprusida, Sigma) a unas concentraciones de 0,5 mM y 1 mM en MEA. Para la inducción de estrés oxidativo se añadió Peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 30 % de relación en peso (Sigma) a una concentración de 2,5 mM, 5 mM y 10 mM en MEA. Asimismo, para la inducción de estrés oxidativo se utilizó Menadiona (Sigma) a una concentración de 250  $\mu$ M y 500  $\mu$ M en MEA.

## 5. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTA

### 5.1. CARACTERIZACIÓN FITOPATOLÓGICA

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

Mientras las esporas reposaban, se preparó el material vegetal a infectar. En el caso de plantas de tomate, tabaco o vid se cortaron las hojas y se insertaron por el peciolo en bloques de material inerte y absorbente de floristería previamente saturado en agua y colocados sobre placas Petri con agua. Esta estructura se colocó en bandejas de plástico en cuya base se colocaron láminas de papel absorbente humedecido y una rejilla que permitiera una separación entre el papel húmedo y las hojas inoculadas (Fig. 12). En el caso de hojas de *Arabidopsis*, éstas fueron cortadas e incrustadas por el peciolo en placas Petri con agar al 2 %.

Se inocularon sobre las hojas gotas de 5 ml con 500 conidios. Se dejaron secar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se selló la parte superior de las bandejas con una película de plástico para crear un microclima con alta humedad relativa (HR). Las bandejas se incubaron en germinadores a una temperatura de 22°C, 80 % HR, 16 horas de fotoperiodo y durante 3 días. Las placas con hojas de *Arabidopsis* siguieron un procesamiento similar.

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





**Figura 12.** Sistema de infección en hojas de tomate.

Se pueden apreciar las hojas de tomate, la bandeja, el papel humedecido, la rejilla y la espuma de material inerte humedecida donde se asientan las hojas.

## **5.2. OBTENCIÓN DE MATERIAL INFECTADO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN**

Para la obtención de material infectado se utilizó el modelo tomate-*B. cinerea* (Benito *et al.*, 1998). Se preparó una suspensión de  $1 \times 10^5$  sp/ml que se inocularía en hojas de tomate preparadas en bandejas como se ha descrito en el apartado anterior. La inoculación se realizó por medio de un spray que contenía la suspensión de esporas y que creaba una red de pequeñas gotas sobre la superficie de la hoja. El spray estaba impulsado gracias a la presión ejercida por una botella de  $N_2$ . Las muestras se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente y se cubrieron por una lámina de plástico. Después se incubaron a 22 °C, 80 % HR y 16 horas de fotoperiodo. Las hojas se recogieron a las 8, 12, 16, 32, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inoculación de las hojas (h.p.i.), congelándolas en nitrógeno líquido y conservándolas a -80 °C.

## 6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 6.1. ADN GENÓMICO DE *B. CINEREA*

Se utilizaron dos métodos para la extracción de ADN genómico de *B. cinerea*: uno más eficiente y laborioso para obtener ADN de calidad (Moller *et al.*, 1992), que denominamos método estándar, y otro más rápido y sencillo para obtener ADN genómico para su utilización como molde en reacciones de PCR para el análisis de transformantes y que denominamos método rápido.

#### 6.1.1. Método estándar

En este caso, el material de partida fue pasta de micelio derivada de un cultivo en medio B5 en agitación durante 16 horas, recogido por sedimentación y secado entre piezas de papel secante. Esta pasta fue marcada y sumergida en nitrógeno líquido pudiendo ser almacenada a -80 °C para un posterior procesamiento.

Unos 200 mg de la pasta de micelio congelado fue depositada en un mortero y molida en la presencia de nitrógeno líquido.

Se añadieron 700 µl de tampón TES al mortero y se volvió a moler hasta tener una buena suspensión. El tampón TES se compone de 100 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 2 % SDS. 500 µl de la suspensión fueron apartados a un tubo de 1.5 ml.

5 µl de proteinasa K 20 µg/ µl (100 µg totales) fueron añadidos al tubo que fue incubado durante una hora a 60 °C.

Se ajustó entonces la concentración de sales (NaCl) a 1.4 M con 140 µl de 5 M NaCl y se añadieron 1/10 volúmenes de 10 % CTAB (65 µl). Se incubó toda la mezcla durante 10 minutos a 65 °C.

Transcurrido este tiempo, se añadió 1 volumen de SEVAG (cloroformo:isoamílico 24:1) (700 µl) y el volumen resultante se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifuga posteriormente la mezcla a 10.000 r.p.m., a 4 °C y durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a dos tubos

Eppendorf, dividiendo la extracción en dos tubos con aproximadamente 700 µl de muestra cada tubo.

Se añadieron entonces 112,5 µl de 5 M acetato amónico a cada tubo, se mezclaron suavemente y se incubaron los tubos en hielo durante al menos 30 minutos. Después se centrifugaron a 12.000 r.p.m., a 4 °C y durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, desechándose el resto.

En este momento se incorporaron 10 µl de RNase a una concentración de 10 µg/µl a cada uno de los dos tubos y se prolongó la incubación a 37 °C durante una hora.

Posteriormente, se extrajo dos veces la fase soluble de las muestras con 0,5 volúmenes de fenol (400 µl por tubo) y 0,5 volúmenes de SEVAG (400 µl por tubo). En cada extracción después de añadir el fenol-cloroformo la mezcla se agitó vigorosamente, se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4 °C durante 10 minutos y se separó la fase acuosa sobrenadante a un nuevo tubo.

Se extrajo después la fase acuosa de nuevo con un volumen de SEVAG. Se añadieron 800 µl a cada uno de los dos tubos, se mezcló, se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4 °C durante 10 minutos y se separó la fase acuosa sobrenadante a un nuevo tubo.

Finalmente, para precipitar el ADN se añadieron 450 µl de isopropanol (0,55 vol.) a cada tubo y la mezcla se centrifugó a 12.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 400 µl de 70% etanol a cada tubo. Se centrifugó la muestra a 13.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y de cada tubo se eliminó el etanol residual en un speedvac.

El precipitado de ácido nucleico se resuspendió en 100 µl de agua MiliQ. Para el análisis de la concentración de ADN ha sido utilizado rutinariamente un método espectrofotométrico (nanodrop ND-1000). Las muestras se almacenaron a 4°C para un futuro uso.

### **6.1.2. 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 depositan 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 NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA y 3 % 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 nuevo tubo de 1,5 ml, centrifugándose a 10.000 r.p.m durante 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 extrajo el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml.

Se añadió un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1), se mezcló, se centrifugó a 10.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 minutos y se extrajo la fase acuosa transfiriéndola cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf.

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 un speedvac. Se añadieron, finalmente, 25 µl de agua MiliQ para resuspender el precipitado de ácido nucleico y se almacenó a -20 °C.

## **6.2. ADN DE PLÁSMIDOS**

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 particulares en cada caso.

### **6.2.1. Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina**

*E. coli* transformada con un plásmido portador de resistencia a ampicilina fue cultivada en 5 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina durante una noche. El cultivo se centrifugó a 4.000 r.p.m durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se

añadieron 100 µl de solución I compuesta por 50 mM glucosa, 25 mM TRIS-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8. Se resuspendió el precipitado de células y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 200 µl de solución II compuesta por 0,2 N NaOH y 1% SDS. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 minutos. La extracción se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 150 µl de 3 M acetato sódico pH 5,2. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante a un nuevo tubo, desechándose el resto.

Un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) (450 µl) fue añadido a la extracción y agitado en el vórtex durante 30 segundos. Después las muestras se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa a un nuevo tubo, eliminándose el resto. Se añadieron 2,5 volúmenes de 100% etanol (1ml) y se centrifugó a 12.000 r.p.m. y 4 °C durante 15 minutos, desechándose el sobrenadante consecuente. Se lavó el precipitado con 200 µl 70% etanol, se centrifugó a 13.000 r.p.m. y 4 °C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se desecó en el speedvac. Finalmente el precipitado de ácido nucleico se resuspendió en 50 µl de agua MiliQ.

### **6.2.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico**

Se incubaron 100 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina hasta tener crecimiento exponencial de las bacterias. Se centrifugaron en dos tubos de 50 ml a 3.000 r.p.m. durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM TRIS-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8) a cada tubo, se transfirió la extracción a correspondientes tubos de 50 ml de ultracentrífuga y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 10 ml de solución II (0,2 N NaOH y 1 % SDS) a cada tubo, se mezcló y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 7,5 ml de 3 M acetato sódico a cada tubo, se incubó 20 minutos en hielo y se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4 °C durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante en nuevos tubos de ultracentrífuga, se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol (16.5 ml) para precipitar el ADN, se incubó de varias horas a una noche a 4 °C, se centrifugó a 20°C

10.000 r.p.m. durante 10 minutos en la supercentrífuga y se desechó el sobrenadante. Se lavó con 10 ml de etanol 70 %, se centrifugó a 20 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.

El pellet precipitado de ADN de los dos tubos de cada muestra se resuspendió en un volumen final de 8 ml de agua, se centrifugó a 20 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadieron 1/10 volúmenes de 3 M acetato sódico (0,8 ml) y 2,5 volúmenes de etanol 100% (20 ml), se centrifugó a 20 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 10 ml de etanol 70 %, se centrifugó a 20 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se añadieron 800 µl de agua MiliQ para disolver el ADN y la muestra se transfirió en dos alícuotas iguales a dos tubos de 1,5 ml. Se añadieron 20 µl de 10 µg/µl de RNase libre de DNase a cada tubo y estos fueron incubados durante al menos 30 minutos a 37 °C.

Se añadieron 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) a cada tubo. Las mezclas resultantes se agitaron en el vórtex por 30 segundos, se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C y se extrajo la fase acuosa en cada caso. Este paso de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se repitió una segunda vez.

Se añadieron 1/10 volúmenes de 3 M acetato sódico (40 µl) y 2,5 volúmenes de etanol 100 % (1ml), se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se eliminó el etanol residual en un speedvac y finalmente el ADN se resuspendió en 200 µl de agua MiliQ.

### **6.2.3. Utilización de un kit comercial para la purificación de ADN plasmídico**

Cuando se necesitó obtener pequeñas cantidades de ADN plasmídico con un grado de limpieza superior para determinadas aplicaciones específicas tales como secuenciación, se utilizó el kit comercial Fast Plasmid (Eppendorf) siguiendo las recomendaciones de uso indicadas por el proveedor. Este método proporciona ADN

plasmídico de gran pureza sin necesidad de llevar a cabo extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

### **6.3. ADN DE BACTERIOFAGOS**

Para el aislamiento de DNA de fagos se utilizó el kit “Lambda mini” (Qiagen). Los fagos fueron recogidos incubando 3 ml de tampón de fagos (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) en placas con halos de lisis confluentes durante 2-4 horas a temperatura ambiente o a 4 °C toda la noche con agitación. El tampón con los fagos y los lisados celulares se recogieron en un tubo de 50 ml para ultracentrífuga y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadió 0,3% de cloroformo para permitir la conservación de los fagos si fuera necesario. Se añadió 1 µl RNAsa (10 µg/µl enzima, 10 mM acetato sódico, 100 mM Tris-HCl pH 7,4) y 5 µl DNAsa (2 µg/µl enzima, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) para eliminar los ácidos nucleicos bacterianos. Posteriormente por medio del kit de Qiagen se extrajo el ADN del fago siguiendo las recomendaciones de utilización indicadas por el proveedor.

### **6.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE *B. CINEREA***

Para la extracción de ARN total se utilizaron dos métodos diferentes: el método basado en la utilización del kit comercial “RNeasy Mini”, comercializado por la empresa QIAGEN, y el método basado en la utilización del producto “TRI reagent” manufacturado por la empresa Molecular Research Center INC (Chomczynski, 1993). En nuestra experiencia el método basado en la utilización del “TRI reagent” que se describe a continuación ha resultado ser mejor en cuanto a la calidad y cantidad del ARN extraído.

Se pulverizaron en un mortero 100 mg de pasta de micelio en presencia de nitrógeno líquido. Se añadió 1 ml de TRI reagent y se recogió el homogeneizado en

dos tubos de 1,5 ml. Posteriormente se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 100  $\mu$ l de 100 % cloroformo a cada uno de los dos tubos, se agitó en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 2-15 minutos. Se centrifugó a 12.000 g y a 4 °C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo.

Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 12.000 r.p.m., transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo. Se repitió de nuevo la extracción. El volumen final de muestra, procesada desde un principio en dos tubos eppendorf, se unió en un mismo tubo. 0,55 volúmenes de isopropanol fueron añadidos a cada tubo (550  $\mu$ l), reposados a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugados a 12.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con 1 ml etanol 70 %, se centrifugó a 12.000 g y a 4 °C por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El etanol residual se evaporó en un speedvac.

El ARN se disolvió en 200  $\mu$ l de agua MiliQ estéril con 1 % DEPC y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente se dejó en hielo y se midió la concentración mediante un espectrofotómetro tipo nanodrop (ND-1000).



## **7. EXTRACCIÓN DE LISADOS DE PROTEÍNAS.**

Se resuspendieron pellets frescos o congelados de células de *S. cerevisiae* en 500 µl de tampón de lisis compuesto por 50 mM sulfato de sodio pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 % glicerol y 1 mM PMSF. Se centrifugó a 1.500 g durante 5 minutos a 4 °C para sedimentar las células. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen de tampón de lisis tal que se determinara una OD600 entre 50 y 100 según la OD600 calculada antes de sedimentar el cultivo celular. Se añadió un volumen igual de bolitas de cristal lavadas con ácido y se sometió el preparado al sistema de agitación FastPrep durante 3 pulsos de 15 segundos e intensidad 5,5. Se perforó la base del tubo mediante una aguja caliente y se introdujo en un nuevo tubo de 1,5 ml, centrifugándose a 10.000 r.p.m durante 10 minutos, recogándose así el sobrenadante y conservándose a 4 °C. La concentración de proteínas se calculó mediante medición espectrofotométrica (nanodrop ND-1000).

## 8. VECTORES DE CLONACIÓN

### 8.1. pGEM-T Y pGEM-T EASY

Los vectores pGEM-T y pGEM-T Easy son plásmidos utilizados en la clonación de fragmentos de PCR. Estos vectores fueron proporcionados en forma de Kit comercial por la casa Promega. Se adquieren en forma linearizada y presentan un residuo de Timina adicional en sus extremos 3' para mejorar la eficiencia de la ligación de los productos de PCR en el plásmido. Contienen 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 de los plásmidos es de 3.000 y 3.015 pares de nucleótidos para pGEM-T y pGEM-T Easy, respectivamente. La figura 13 permite apreciar las principales características estructurales de estos plásmidos y la organización del polilinker de los mismos.

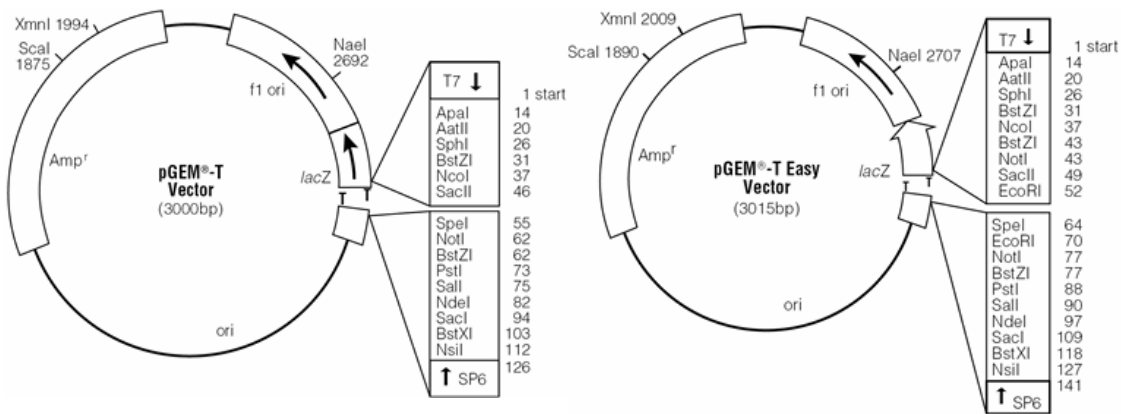
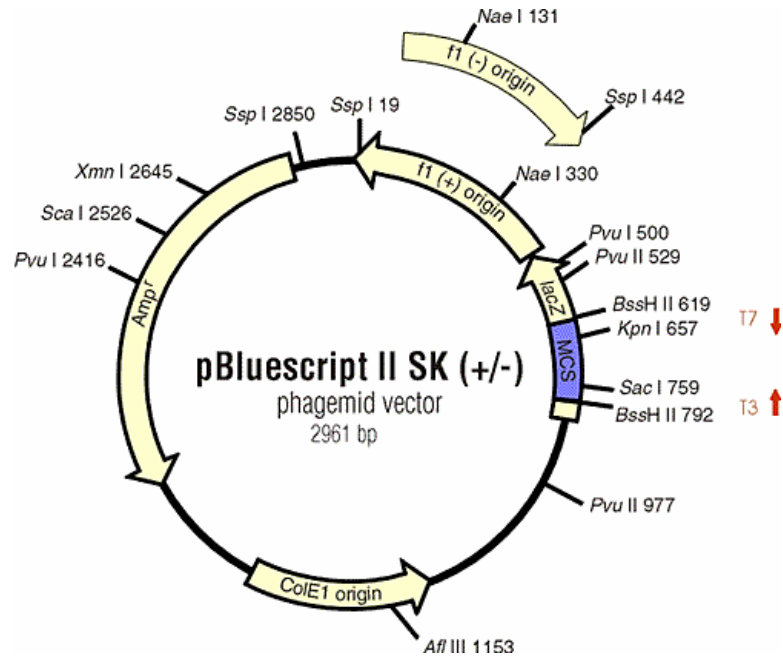


Figura 13. Estructura de los vectores pGEM-T y pGEM-T Easy (Promega).

### 8.2. pBLUESCRIPT II SK +/-

Son plásmidos de 2.961 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*, *ShoI*, *AccI*, *SalI*, *ClaI*, *HindIII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, *BamHI*, *SpeI*, *XbaI*, *NotI*, *BstXI* y *SacI*. Más detalles sobre el vector se observan en la figura 14.



**Figura 14.** Estructura del vector pBluescript (Stratagene).

### 8.3. PYES

El plásmido pYES tiene un tamaño de 5,9 Kb y está diseñado para determinar la expresión inducida de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Las características del vector permiten una sencilla clonación del gen de interés y la selección de transformantes por medio de auxotrofia de uracilo (Fig. 15). Este vector fue obtenido por la compañía Invitrogen. Contiene el promotor de levadura GAL1 que permite una elevada expresión inducida de la proteína clonada en levadura por galactosa y su represión por glucosa. También contiene el terminador transcripcional CYC1 para una eficiente terminación del mRNA.

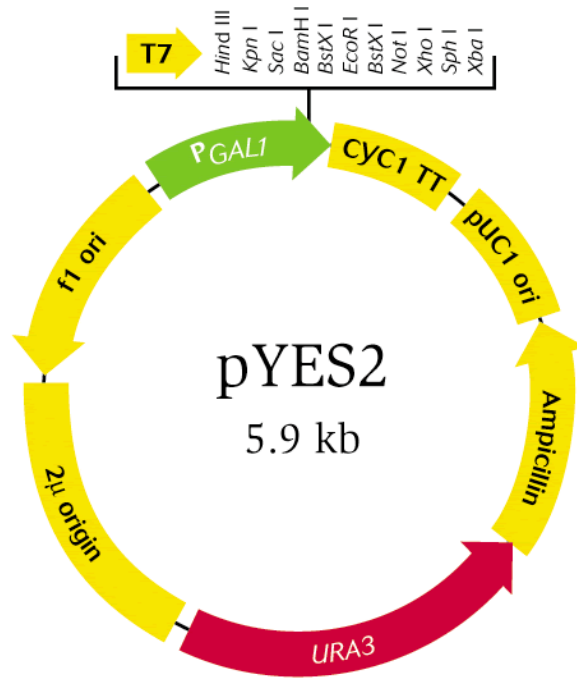


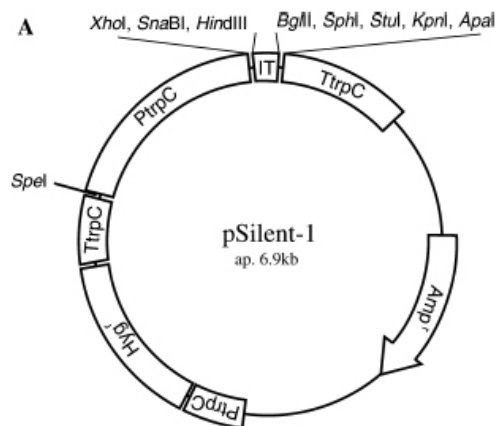
Figura 15. Estructura del vector pYES (Invitrogen).

## 8.4. pLOB

Este plásmido contiene 5.289 pares de nucleótidos y está diseñado para proporcionar resistencia a higromicina a *B. cinerea*. Está construido sobre el esqueleto del plásmido pBS+ (Stratagene) en cuyo polilinker se ha clonado una fusión génica que permite expresar el gen bacteriano de resistencia a la higromicina. Este casete de resistencia incluye la región estructural del gen que proporciona resistencia a higromicina (1.017 pares de nucleótidos) fusionada al promotor del gen OliC de *Aspergillus nidulans* (876 pares de nucleótidos) y a un fragmento de *B. cinerea* que incluye la región terminadora del gen codificador de la enzima arginino-succinato sintasa de este organismo (755 pares de nucleótidos) y fue amablemente cedido por el Dr. Jan A. L. van Kan, de la Universidad de Wageningen, Holanda (número de acceso Genbank AJ439603).

## 8.5. PSILENT-1

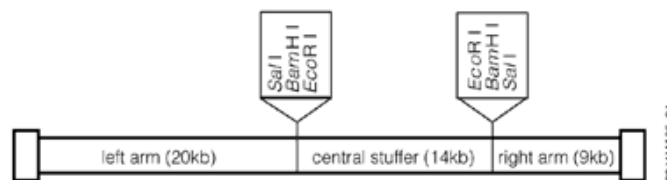
El plásmido pSilent-1 fue desarrollado como un vector para producir silenciamiento en hongos (Nakayashiki *et al.*, 2005). Contiene un gen de resistencia a la ampicilina como marcador seleccionable en *E. coli*, el promotor del gen del triptófano C (*trpC*) de *A. nidulans* seguido de un polilinker y el terminador del gen *trpC*. Incluye, además, un cassette de resistencia a higromicina que permite expresar este marcador seleccionable en *A. nidulans* y en hongos en general. Este casete se deriva de la fusión de la región estructural del gen de resistencia a higromicina bajo el control del promotor del gen *trpC* de *A. nidulans* y del terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. Se pueden apreciar los detalles del vector pSILENT-1 en el mapa que se presenta en la figura 16.



**Figura 16.** Estructura del vector pSilent-1 (Nakayashiki *et al.*, 2005).

## 8.6. EMBL3

El vector lambda EMBL3 es distribuido por la casa Promega. Se comercializa en forma de kit con ambos brazos del fago separados y defosforilados (Fig. 17).



**Figura 17.** Estructura del vector EMBL3 (Promega).

## **9. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN**

### **9.1. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo para la caracterización física de plásmidos y fragmentos de ADN y para la construcción de vectores recombinantes. Las diversas enzimas de restricción fueron proporcionadas por la casa Roche a una concentración de 10 U/ $\mu$ l. Se define una unidad como la actividad de la enzima que digiere completamente 1  $\mu$ g de  $\lambda$  DNA 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 Roche y es específico de cada tipo de enzima.

En el caso de digestiones parciales, se optimizaron las condiciones de digestión de la endonucleasa de restricción diluyendo sucesivamente la enzima en reacciones desde 1 a 0,005 unidades de enzima por  $\mu$ g de ADN.

### **9.2. DEFOSFORILACIÓN**

Esta metodología se aplica para prevenir la recircularización de plásmidos digeridos con una única enzima de restricción y favorecer la clonación de fragmentos de ADN. Se basa en la eliminación de los grupos fosfato terminal de los extremos 5' del ADN.

Después de digerir el plásmido, se eliminó la enzima de restricción mediante extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación con etanol. El sedimento de ADN se resuspendió en 40  $\mu$ l de 10 mM Tris-HCl pH 8 y se reservaron 4  $\mu$ l de ADN para servir de control de la ligación.

La reacción de defosforilación se compone de 5  $\mu$ l de tampón de fosfatasa alcalina (10 $\times$ ) (Roche), 2  $\mu$ l de fosfatasa alcalina CIP (Roche) diluida hasta 0,01 U/pmol de extremos (1  $\mu$ g ADN 1 Kb = 1,52 pmol ADN = 3,04 pmol de extremos) y agua hasta 50  $\mu$ l totales de reacción. La mezcla de reacción se incubó durante 30

minutos a 37 °C, se añadió una segunda alícuota de 2 µl de enzima y se incubó otros 30 minutos a 37 °C. Para parar la reacción se añadió 1 µl de 0,5 M EDTA y se incubó 20 minutos a 65 °C. Se extrajo 3 veces con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se precipitó con etanol y el precipitado se disolvió en un volumen de agua miliQ adecuado para las ligaciones posteriores.

### **9.3. LIGACIONES**

La ligasa DNA T4 cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre terminaciones yuxtapuestas de 5' fosfato y 3' hidroxil en DNA o RNA de doble cadena con extremos romos o cohesivos. Esta enzima requiere ATP como cofactor de la reacción que proporciona la casa comercial Fermentas en un tampón a 10 veces la concentración final de trabajo el cual está compuesto por 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT y 5 mM ATP. Las incubaciones se realizaron a 22 °C durante al menos dos horas. Como norma general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo en volúmenes de 10 o 20 µl con la diluciones apropiadas del tampón de ligación y 1 µl de la suspensión de enzima a una concentración de 1U/µl.

## 10. ELECTROFORESIS

### 10.1. ELECTROFORESIS DE ADN

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa (del 0,6 al 2%) preparados en tampón 1×TAE (40mM Tris-acetato y 1mM EDTA). Se utilizaron cubetas horizontales de 15 ó 30 cm de largo, utilizándose como tampón de electroforesis 1×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 % xilén 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 (habitualmente ADN fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Pst*I). 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  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio en 1×TAE durante 20 minutos. El ADN se visualizó por medio de luz ultravioleta y se capturaron las imágenes por medio del sistema Kodak de grabación digital de imágenes.

### 10.2. ELECTROFORESIS DE ARN

La electroforesis de ARN se realizó en condiciones desnaturalizantes siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook *et al.* (1989) y las indicaciones recogidas en el manual de marcaje de sondas DIG (Roche Molecular Biochemicals). Los geles de ARN proporcionan la matriz y las condiciones desnaturalizantes para una correcta separación y detección del ARN. Se preparan con concentraciones variables de agarosa (normalmente 1 %) en tampón 1×MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1mM EDTA pH 7) que contienen 2 % formaldehído y 0,5  $\mu$ g/ml 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  $\mu$ l 100% formamida deionizada, 83  $\mu$ l formaldehído, 50  $\mu$ l 10×MOPS, 50  $\mu$ l 100 % glicerol,



10 µl 2,5 % azul de bromofenol y 57 µl 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 1×MOPS y se corrió a una potencia de 3 V/cm durante 3 horas dentro de una campana de extracción. Debido a la poca conductividad eléctrica del tampón utilizado, cada 10 ó 15 minutos se transfería tampón del ánodo al cátodo y viceversa. Después se comprobó la integridad del ARN y las cargas de cada muestra mediante la exposición a luz ultravioleta.

### **10.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

La electroforesis de proteínas se realizó mediante geles de acrilamida tipo SDS-PAGE. Estos geles están compuestos por dos fases: una primera y superior de empaquetamiento y otra segunda e inferior de separación. El gel de empaquetamiento fue del 4 % acrilamida. La composición de la solución de acrilamida para 5ml (2 geles) fue: 0,65 ml 30:0,8 % acrilamida:bisacrilamida, 625 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % persulfato de amonio, 5 µl TEMED y 3,72 ml agua destilada. El gel de separación fue del 12% acrilamida. La composición de la solución de acrilamida para 10 ml (2 geles) fue: 4 ml 30:0,8 % acrilamida:bisacrilamida, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 µl 10% SDS, 50 µl 10% persulfato de amonio, 5 µl TEMED y 3,4 ml agua destilada.

El tampón de carga (4×) está compuesto por 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM DTT, 8 % SDS, 40 % glicerol y 0,05 % azul de bromofenol. Se mezclaron 15 µg de extracto de lisis con un volumen cuatro veces menor de tampón de carga y la mezcla se desnaturalizó hirviéndola durante 5 minutos. Como marcadores se utilizó BSA (con 66 KDa) o LMW (marcador de bajo peso molecular, Bio-Rad) (con proteínas de 97,4, 66,2, 45, 31, 21,5 y 14,5 KDa).

La electroforesis se realizó en cubetas verticales, Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). El tampón de electroforesis está compuesto por 25mM Tris, 250 mM glicina y 0,1 % SDS. Las muestras se cargaron en el gel y se separaron a una intensidad de 30

mA durante 40 minutos. El gel se desmanteló de la estructura del tanque de electroforesis y se procedió a su revelado.

Para el revelado de los geles se realizaron tinciones de nitrato de plata. El proceso se inicia con la fijación del gel sumergiéndolo durante 20 minutos en una solución de 10 % ácido acético, 50 % metanol. A continuación el gel se lava 3 veces con agua destilada y se sumerge en 0,1 % nitrato de plata, 0,056 % formaldehído durante 30 minutos. Se lava otra vez con agua destilada y se revela en 3 % carbonato sódico, 0,056 % formaldehído, 0,0002 % tiosulfato sódico. La reacción de revelado se para con 10 % ácido acético cuando se alcanza el nivel deseado de intensidad de bandas. Con ayuda de un transiluminador de luz visible y una cámara fotográfica se guardó registro de los geles obtenidos.

## **11. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN**

La muestra con el fragmento a recuperar se cargó en un gel de agarosa. La electroforesis se realizó en cada caso en las condiciones que permitían garantizar la máxima separación del fragmento a recuperar del resto de fragmentos de la muestra. Después de la tinción con bromuro de etidio, se registró la imagen del gel y se procedió a cortar la banda del fragmento a recuperar. En el caso de haber varias muestras para recuperar independientemente en diferentes carreras, éstas se protegieron de la alteración por luz ultravioleta por medio de una película de papel de aluminio.

Posteriormente, para la purificación del fragmento de ADN del bloque de agarosa se utilizó el kit comercial GeneClean (Bio101) siguiendo las indicaciones formuladas por el proveedor.

## 12. TRANSFORMACIONES

### 12.1. TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

El método empleado para la transformación de *E. coli* con plásmidos fue la transformación de células competentes mediante choque térmico. En primer lugar se prepararon células competentes que se almacenaron a -80 °C (Hanahan *et al.*, 1991). Para ello se incubaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  en 5 ml LB a 200 r.p.m. y 37 °C toda la noche. Este preinóculo se añadió a 500 ml de medio  $\phi$  cuya composición para un litro es 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0,745 g KCl, 4 g MgSO<sub>4</sub> y ajustado el pH a 7,6 con 10 N KOH. El medio se incubó a 37 °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 °C. La composición de la solución TFB1 es 12,1 g/l RbCl<sub>2</sub>, 6,3 g/l MnCl<sub>2</sub>, 2,9 g/l acetato potásico, 1,1 g/l CaCl<sub>2</sub>, 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°C durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 ml de TBF2 a 4 °C. La composición de la solución TBF2 es 2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l RbCl<sub>2</sub>, 8,3 g/l CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, con un pH ajustado a 7 con NaOH y se esteriliza por filtración. Las células competentes obtenidas se incubaron en hielo 15 minutos y se repartieron en alícuotas para su conservación a -80 °C.

Para cada ensayo de transformación se mezclaron 100  $\mu$ l de células competentes con 10  $\mu$ l de ADN procedente de reacciones de ligación y la mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Después se sometió a las células a un choque térmico que consistió en una incubación de 2 minutos a 37 °C seguido de otra de 2 minutos en hielo. Se añadieron entonces 500  $\mu$ l LB a la mezcla de transformación y esta se incubó a 37 °C y 200 r.p.m. durante 45 minutos. Las células se sembraron finalmente sobre placas de medio LB en presencia del agente selectivo y se incubaron 16 horas a 37 °C.

Cuando se pretendía multiplicar un plásmido se recurrió a un procedimiento de transformación más rápido pero menos eficiente. Se mezclaron 10  $\mu$ l de células

competentes con 1  $\mu$ l de plásmido (100 ng/ $\mu$ l), se incubó la mezcla 1 minuto en hielo, 1 minuto a 37 °C y otro minuto en hielo, se añadieron 100  $\mu$ l de LB a la mezcla de transformación y se sembraron alícuotas de la misma en placas de LB con el medio selectivo.

En el caso de que el plásmido introducido contuviera el gen *lacZ*, sobre las placas donde se siembran las células se extendieron previamente 50  $\mu$ l de una solución al 2% X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactósido) en N,N-dimetilformamida. 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 azul. Así se seleccionan colonias donde se ha insertado DNA en el polilinker del plásmido.

## 12.2. TRANSFORMACIÓN DE *BOTRYTIS CINEREA*

El procedimiento de transformación de *B. cinerea* utilizado se basa en la utilización de protoplastos y PEG (Hamada *et al.*, 1997). Para su obtención se partió de esporas de *B. cinerea* inoculados a una concentración de  $1 \times 10^6$  sp/ml en dos matraces de fondo estriado de 500 ml que contenían 100 ml de 1 % extracto de malta. Los matraces fueron incubados durante 16 horas a 22°C y 140 r.p.m. El cultivo se vertió en 4 tubos de 50 ml, se centrifugó a 2.000 r.p.m durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió agua mili-Q estéril a los tubos y se transfirió el micelio de un tubo a otro dejando sólo dos que se llenaron hasta 50 ml con agua mili-Q estéril. Se centrifugaron los tubos a 2.000 r.p.m durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió solución KC (0,6 M KCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, estéril) hasta 50 ml en los dos tubos, se resuspendió el micelio, se centrifugó a 2.000 r.p.m durante 5 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 2.000 r.p.m durante 5 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 23°C y 140 r.p.m en un matraz estéril de 250 ml durante 2 horas, comprobando periódicamente con la ayuda del microscopio el progreso de la formación de protoplastos. 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 1.500 r.p.m. durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50 ml de KC a 4 °C, se centrifugó la muestra a 1.500 r.p.m. durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado. Finalmente se resuspendieron los protoplastos en el KC restante de la eliminación del sobrenadante y se mantuvieron en hielo.

Para transformar los protoplastos se incubaron 10-20 µg de ADN de plásmido o 2-5 µg de producto de PCR disueltos en 95 µl de KC con 5 µl 5mM 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, 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 SH agar líquido a 40 °C 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 que se agita 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 48 °C con 70 µg/ml 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 70 µg/ml de higromicina.

### 12.3. TRANSFORMACIÓN DE *S. CEREVISIAE*

Se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* en 10 ml de medio YPD y se incubó toda la noche a 30 °C. Se determinó la OD600 del cultivo en un espectrofotómetro. Se diluyó el cultivo para obtener una OD600 de 0,4 en 50 ml y se cultivó durante unas 2-4 horas adicionales. Las células se centrifugaron a 2.500 r.p.m por 5 minutos, eliminándose el sobrenadante, y se resuspendieron en 40 ml de 1×TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Se volvieron a sedimentar las células y se suspendieron en 2 ml de 1×LiAc/0,5×TE (100mM acetato de litio pH 7,5, 5mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para cada transformación, se mezclaron 1 µg de DNA de plásmido, 100 µg de esperma de salmón desnaturalizado y 100 µl de células. Después se añadieron 700 µl de 1×LiAc/40% PEG-3350/1×TE (100mM acetato de litio pH 7,5, 40 % PEG 3350, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) y se mezclaron suavemente. La suspensión se incubó a 30 °C durante 30 minutos después de los cuales se añadieron 88 µl de DMSO, se mezcló y se calentó a 42 °C durante 7 minutos. Se centrifugó durante 10 segundos a 5.000 r.p.m. y 20 °C y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 1 ml 1×TE y se centrifugó de nuevo para eliminar el sobrenadante. Se suspendió el precipitado en 100 µl 1×TE y la suspensión de células se sembró en placas selectivas de SC carentes de uracilo.

### 13. GENOTECA DE ADN GENÓMICO

Una genoteca de ADN genómico de *B. cinerea* fue cedida amablemente por el Dr. Jan van Kan de la Universidad de Wageningen (Holanda). Ésta fue construida mediante el vector bacteriófago EMBL3 de la casa Promega. En primer lugar se digirieron parcialmente el ADN con la enzima de restricción *Sau3A* la cual tiene extremos compatibles con *Bam*HI. Se obtuvieron fragmentos de 15.000 a 23.000 pares de bases que se ligaron con los brazos del bacteriófago EMBL3 con extremos *Bam*HI según el protocolo de Promega. El ADN fue empaquetado en partículas de bacteriófago proporcionado por el extracto Packagene de Promega. Con la solución resultante se cultivaron los fagos hasta obtener halos de lisis no confluentes. Los halos fueron contados y de este modo se calculo la representatividad de la genoteca.

## **14. PCR, REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

### **14.1. PCR ESTÁNDAR**

Las amplificaciones de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo utilizando distintas enzimas polimerasas de ADN dependiendo del objetivo de la amplificación. De este modo, para amplificaciones en las que se precisaba una gran fidelidad se utilizó la enzima AmpliTaq Gold de Applied Biosystems, para comprobaciones rutinarias, por ejemplo, la comprobación de la presencia de fragmentos clonados en plásmidos recombinantes o para identificar transformaciones “positivas”, se aplicó la enzima Biotools DNA polimerasa de B&B labs, y para amplificación de fragmentos de ADN de gran tamaño se utilizó el TripleMaster PCR System de Eppendorf. Estas ADN polimerasas son enzimas altamente termoestables producidas por organismos termófilos como *Thermus aquaticus* (AmpliTaq Gold) 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 ó 50 µl que contenían 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada uno de los dos oligonucleótidos cebadores (primers) y 0,05 unidades de polimerasa por µl de reacción. La cantidad de MgCl<sub>2</sub> varió según la enzima utilizada o el fragmento de ADN a amplificar. Normalmente se utilizó una concentración de 1,6 mM en el caso de la enzima AmpliTaq Glod, 2 mM en el caso de la polimerasa de Biotools y 2,5 mM en en el caso de TripleMaster. Cada enzima tiene su tampón específico proporcionado a 10 veces la concentración final de reacción.

La cantidad de molde de ADN usado varió según el tipo de ADN molde y su pureza. La cantidad de ADN usada en el caso de ADN genómico fue entre 50 y 100 ng y para ADN de plásmido o fago fue entre 0.01 y 10 ng. En el caso de que la muestra de ADN contuviera impurezas que entorpecieran la PCR, el ADN se diluyó



con agua MiliQ estéril para tener una mejor reacción. Cuando se quiso comprobar la clonación de un fragmento de ADN en un vector de *E. coli* se añadió directamente 1 µl de cultivo celular a la mezcla de reacción.

La enzima AmpliTaq Gold se presenta en forma inactiva para prevenir la actividad de la enzima durante la preparación de la reacción, impidiéndose la actividad inespecífica de la enzima. Para su activación se debe calentar durante 10 minutos a 95 °C antes de iniciar los ciclos del programa de PCR. Los termocicladores utilizados fueron un termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems y un termociclador modelo Mastercycler Gradient de Eppendorf. En los ciclos del programa de PCR la desnaturalización se realizó a 94 °C durante 30 segundos, la hibridación del cebador durante 30 segundos a una temperatura que osciló entre 48°C y 59 °C dependiendo del cebador (tabla 1) y la extensión a 72 °C durante 1 minuto, tiempo al que se le sumó un minuto por cada 1.000 pares de nucleótidos de fragmento amplificado. Normalmente se aplicaron entre 30 y 40 ciclos seguidos de una última fase de extensión de entre 1 y 5 minutos de duración.

Cuando se quiso superponer fragmentos de PCR se utilizaron como molde productos de PCR con extremos libres que funcionaban como cebadores para la unión con otros fragmentos de PCR. En estos casos se utilizaron 50 ng de los productos de PCR y la hibridación del cebador se extendió durante 2 minutos.

Los distintos oligonucleótidos utilizados como cebadores en las diferentes aplicaciones descritas en este trabajo se presentan en la tabla 1.

## 14.2. RT-PCR

Para la obtención 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” de la casa Ambion. Se trataron 5 µg de ARN total en un volumen de reacción de 20 µl, con 1 unidad de Turbo DNase y su correspondiente tampón. La reacción se incubó durante 30 minutos y se procedió a la inactivación de la enzima.

**Tabla 1.** Cebadores (Primers) utilizados en las reacciones de PCR.

El número indicado en la sección posición se refiere a la distancia en nucleótidos desde el comienzo de la transcripción de cada gen. Los símbolos + y - se refieren a la orientación del primer respecto a la orientación de la transcripción del gen.

Nombre	Secuencia de 5' a 3'	mT <sup>a</sup> (°C)	Gen	Posición
FH1A	CGTATCAGTGTGAAGCG	52,8	<i>Bcfhg1</i>	648 +
FH1B	TCCATAAATCCTCCCGG	52,8	<i>Bcfhg1</i>	1.154 -
FH2A	GACCAGAACTACTACCCG	55,2	<i>Bcfhg1</i>	274 +
FH2B	TCTGGGAGGACACCAGC	57,6	<i>Bcfhg1</i>	689 -
FH3A	GCACCACTTAGTAGCTG	52,8	<i>Bcfhg1</i>	-141 +
FH3B	TCACTTGCCGGCTCTTG	55,2	<i>Bcfhg1</i>	442 -
FHP1	CCGGTACTAACACCACCA	56,0	<i>Bcfhg1</i>	-1.555 +
FHP2	GGCGTGCTTCTGACATAT	53,7	<i>Bcfhg1</i>	261 -
FHT1	AAAGTTAAAGACGCTGCG	51,4	<i>Bcfhg1</i>	1.077 +
FHT2	CAGTCAAACACGCAAAGC	53,7	<i>Bcfhg1</i>	3.334 -
FHP3	TAGTCGACTGTGTTGTTG	51,4	<i>Bcfhg1</i>	-18 -
BcfhgF	GCATGCGTTGCTTTGTTATT	53,2	<i>Bcfhg1</i>	-809 +
BcfhgR	ATACCCCACTTTTCTCAATG	53,2	<i>Bcfhg1</i>	1.686 -
BcNR-F	ATGGCTAGTGCTCAATTCAT	53,2	<i>Bcniad</i>	36 +
BcNR-R	GTTATGGGTACGGTGATTG	55,3	<i>Bcniad</i>	536 -
Bchb1F	AAGCTTAAGATGGCACTCACACC	60,6	<i>Bcfhg1</i>	-8 +
Bchb1R	GCATGCATTACGACGAACACC	59,8	<i>Bcfhg1</i>	1.264 -
AssF	TGCACAAATCACAGTCGCCC	59,4	<i>Bcass1</i>	1 +
AssR	GACGAGCAATGGCGTTGGAT	59,4	<i>Bcass1</i>	475 +
AssTR	GTCAAGCGAGTGCAGCATGG	61,4	<i>Bcass1</i>	1.266 +
ShphF	TCCGAGGTGCCGTCTATCAT	59,4	<i>hph</i>	-791 +
ShphR	CTATTCCTTTGCCCTCGGAC	59,4	<i>hph</i>	1.020 -
SBcfhgF	GTCCGAGGGCAAAGGAATAG- CTCACCCCATGGTATCCAT	75,0	<i>Bcfhg1</i>	849 +
SBcfhgR	TTGGAGTAGAGGTTGGGGAG	59,4	<i>Bcfhg1</i>	1.597 -
EB-AC1	TGTTGGAGATGAAGCGC	54,0	<i>BcactA</i>	158 +
EB-AC2	CATAGTGGTTCCACCAG	54,0	<i>BcactA</i>	915 -
HphB	GCCTGAAACCGAACTGCCCG	61,0	<i>hph</i>	303 +
HphA	CACAGCCATCGGTCCAGACG	61,0	<i>hph</i>	958 -
HphAc	CGGCAGTTCGGTTTCAGGC	61,0	<i>hph</i>	322 -
HphBc	CGTCTGGACCGATGGCTGTG	61,0	<i>hph</i>	938 +
Universal	ACATTTTGCTGCCGGT	52,0	plasmid	0 +
Reverso	AACAGCTATGACCATG	52,0	plasmid	0 -

Posteriormente, para generar fragmentos de ADN copia (cDNA) a partir de la población de ARN total tratado, se utilizó la enzima SuperScript II Reverse Transcriptasa de Invitrogen. Esta enzima genera moléculas de cDNA de cadena sencilla que podrían ser utilizadas en procedimientos tales como la PCR cuantitativa, o que servirán como molde para sintetizar la cadena complementaria dando lugar a las correspondientes copias de cDNA bicatenario.

En la reacción de transcripción inversa primero se mezclaron 10 µl de ARN libre de ADN (2,5 µg), 1 µl 100 µM Oligo dT<sub>16</sub> y 2 µl 2,5 mM de cada dNTP. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C y se dejó en hielo. Seguidamente se añadieron 4 µl de 5×tampón (Invitrogen) y 2 µl 0,1 M DTT, mezclándose suavemente e incubándose 2 minutos a 42 °C. Se añadió 1 µl (200 unidades) de la enzima SuperScript II RT, se mezcló con un suave pipeteado, se incubó a 42°C durante 50 minutos y se inactivó la reacción a 70 °C durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

### 14.3. PCR CUANTITATIVA

La PCR cuantitativa se realizó con la ayuda del servicio Assays-by-Design que ofrece la empresa Applied Biosystems. Este sistema está basado en la utilización de sondas Taqman MGB (marcadas con FAM) de Applied Biosystems. En primer lugar se diseñaron los cebadores y la sonda (reporter + quencher) del gen o locus objetivo, *Bcfhg1*, y del gen utilizado como control endógeno, el gen *BcactA* de *B. cinerea*. Las sondas están marcadas con el fluorocromo FAM y portan el quencher NRQ. De este modo para el gen de la flavohemoglobina se fabricaron los siguientes oligonucleótidos:

Cebador directo: Nombre: FHG-ANYF  
 Secuencia: CCTCCCAGAAGCCAACACA

Cebador reverso: Nombre: FHG-ANYR  
 Secuencia: CCTCGTGTTTGGTATCGTGAAGAAT

Sonda FAM: Nombre: FHG-ANYM1  
 Secuencia: AAGCAGGTGTGATTTC

Como control endógeno se usó el gen de *BcactA*, fabricándose los siguientes oligonucleótidos:

Cebador directo: Nombre: BactA-62F  
 Secuencia: TTGCACCATCGTCGATGAAG

Cebador reverso: Nombre: BactA-131R  
 Secuencia: CCACCAATCCAGACGGAGTATT

Sonda FAM: Nombre: BactA-83T

Secuencia: TCAAGATCATTGCACCACCCGAGAGA

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos especiales para la detección de fluorescencia en el equipo de PCR cuantitativa. En cada reacción de detección de *Bcfhg1*, se añadieron 10 µl de tampón Taqman Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG 2×), 1 µl 20×assay mix con 5 µM de sonda (FHG-ANYM1) y 18 µM de cebadores (FHG-ANYF y FHG-ANYR), 1 µl agua 1 % DEPC y 8 µl de ADN molde. En cada reacción de detección de *BcactA*, se añadieron 10 µl de tampón Taqman Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG 2×), 1 µl 20×assay mix con 5 µM de sonda (BactA-83T), 1 µl 18 µM de cebadores (BactA-62F y BactA-131R) y 8 µl de ADN molde.

La placa se selló y la reacción se llevó a cabo en un termociclador ABI Prism 7000 de la compañía Applied Biosystems. Las condiciones de reacción, registro de datos y visualización se llevaron a cabo con el programa de Applied Biosystems ABI Prism 7000 SDS. Las condiciones del termociclador fueron 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

Existen dos métodos para el análisis cuantitativo de la expresión génica: el método comparativo de la  $C_T$  y el método de la curva estándar. El  $C_T$  es el número de ciclos de PCR en el que se supera un umbral determinado de copias de ADN generadas, medido mediante la fluorescencia emitida durante la reacción. El umbral está localizado en la fase lineal de producción de fluorescencia. Mediante el  $C_T$  podemos calcular el número de copias originales de un determinado fragmento. En nuestro caso se aplicó el método de la curva estándar pues el número de muestras no era excesivamente grande y se podía incluir una curva estándar en cada reacción.

En una primera serie de experimentos de PCR cuantitativa se determinó el rango dinámico de concentraciones de trabajo y la precisión y eficiencia de la reacción. Se utilizaron una serie de muestras de cDNA de *B. cinerea* y una serie de muestras de ADN genómico de *B. cinerea* que contenían las siguientes cantidades de ADN: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng y 0,001 ng. De cada una de las condiciones se hicieron 3 réplicas para obtener datos estadísticamente representativos. Se eligió un rango de concentración de trabajo que no alcanzara un

$C_T$  de 3 a 10 por exceso de concentración de ADN o que no superara un  $C_T$  de 35 a 40 por defecto de concentración. La precisión se mide con la representatividad de la curva estándar ( $R^2$ ) según los puntos generados. Así, valores de  $R^2$  menores de 0,99 indicarían problemas de precisión. La eficiencia se mide con la pendiente de la curva estándar (E). De este modo, una E de -3,32 representa una eficiencia del 100 %.

Después de optimizar el proceso se diseñó otra reacción con las muestras problema repetidas 3 veces. La cuantificación relativa, concentración, de las muestras se realizó comparando el  $C_T$  obtenido con la curva estándar generada en la reacción. Se calculó la media y desviación estándar de la concentración de cada objetivo y del control endógeno. Después la concentración del objetivo se normalizó con la concentración del control endógeno. Las medias se normalizaron dividiendo la media de la concentración de nuestro objetivo entre la media del control endógeno. Para el cálculo de desviación estándar normalizada se calculó el coeficiente de variación del objetivo y del control endógeno. El coeficiente de variación es el resultado de dividir la desviación estándar entre la media. Luego se calculó el coeficiente de variación del cociente (cv) según:  $cv=(cv_1^2+cv_2^2)^{1/2}$ . Por último la desviación estándar normalizada se obtiene al multiplicar el cv entre la media normalizada. El resultado obtenido está expresado en unidades relativas al número de copias del fragmento objetivo presente en cada muestra.

## 15. HIBRIDACIONES

### 15.1. 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) a la secuencia de ADN objetivo. La digoxigenina es un esteroide encontrado en la naturaleza en las plántas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* que debido a sus propiedades bioquímicas tiene facilidad para unirse a anticuerpos. De este modo se puede detectar la digoxigenina y, en su caso, el fragmento marcado correspondiente.

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, del tamaño esperado. Después se realizó el marcaje sustituyendo en la reacción de PCR los dNTPs por *Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix* de la casa Roche. En paralelo, se llevó a cabo una reacción de PCR con dNTPs normales 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.

### 15.2. SOUTHERN

Los procedimientos aplicables para desarrollar esta metodología son los indicados y recomendados por la casa comercial Roche y recomendados en su manual “DIG User’s manual” y los recomendados por Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989).

Las muestras de ADN sin digerir o digeridas con distintas enzimas de restricción fueron cargadas en geles de agarosa (0,8 %) 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 sumergir el gel en un baño de 0,2 N HCl durante unos 20 minutos (hasta que el azul de bromofenol se vuelve amarillo). El gel se sumergió posteriormente durante 15 minutos en la solución de desnaturalización, que contiene 1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH, repitiéndose de nuevo el baño durante otros 15 minutos con una solución de desnaturalización fresca. El gel se lavó con agua destilada y se depositó en la solución de neutralización, que contiene 1,5 M NaCl y 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, durante 15 minutos después de los cuales se incubó otros 15 minutos con solución de neutralización fresca. El equilibrado se realizó con 10×SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M citrato sódico pH 7) durante 10 minutos.

La preparación del blot o conjunto de transferencia se hizo en un tanque que contenía el tampón de transferencia (10×SSC) sobre el que disponía una bandeja a modo de puente donde reposaban 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 Whatman 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. El gel se dejó transferir por un mínimo de 16 horas después de las cuales se retiró el filtro que se colocó sobre papel Whatman humedecido en 2×SSC. El gel se fijó 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 utilización.

En el caso de que fuera necesario trabajar con colonias de bacterias o con halos de lisis de bacteriófagos, la transferencia del DNA a la membrana se realizó poniendo en contacto directamente la membrana de nylon sobre la placa de medio de cultivo durante 20 segundos. Las membranas se transfirieron después a láminas de papel Whatman 3MM humedecido primero en solución de desnaturalización durante

5 minutos, después en solución de neutralización y por último en 2×SSC. Se lavaron finamente con 2×SSC, se colocaron sobre un papel secante y se fijó el DNA con el Stratalinker.

La hibridación de la membrana de nylon con la sonda se realizó en bolsas selladas de plástico. En un primer lugar se realizó la prehibridación que consiste en incubar la membrana con el tampón de hibridación (5×SSC, 0,1 % N-laurilsarcosina, 0,02 SDS y 1 % 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 2×SSC/0,1% SDS durante 5 minutos por cada lavado y a temperatura ambiente. Después se lavó otras dos veces en 0,5×SSC/0,1% SDS durante 15 minutos a 65 °C si se había realizado una hibridación con sonda homóloga. Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente con tampón de lavado consistente en 100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, 0,3 % tween 20, pH 7,5. La membrana se transfirió a una solución de “1×Blocking solution” disuelto en 100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, pH 7,5, durante al menos 30 minutos. Posteriormente la membrana se incubó en “1×Blocking solution” con 0,75 U/μl de antidigoxigenina (Roche) durante media hora 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, 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. La membrana se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, transcurridos los cuales fue transferida a una nueva lámina de plástico y se procedió a detectar la quimioluminiscencia. Para ello se utilizaron películas autorradiográficas Kodak X-OMATAR o se utilizó el equipo de detección de quimioluminiscencia Intelligent Dark Box II de Fujifilm.

Para la eliminación de la sonda de la membrana, ésta fue lavada con agua y posteriormente se realizaron dos lavados con 0,1×SSC/0,1% SDS hirviendo. Para la



posterior conservación de la membrana, ésta se lavó con 2×SSC y se dejó secar a temperatura ambiente sobre una pieza de papel Whatman 3MM.

### **15.3. NORTHERN**

Las muestras de ARN separadas mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes fueron transferidas a una membrana de nylon de forma similar a como fueron transferidas las muestras de ADN. En este caso, todas las soluciones utilizadas fueron tratadas con 1 % DEPC. Para una correcta eliminación de RNAsa y la desactivación del DEPC fue necesario incubar la solución con 1% DEPC durante una hora a 37 °C o toda la noche a temperatura ambiente y después las soluciones fueron esterilizadas en el autoclave.

Después de acabar la electroforesis del ARN el gel se incubó dos veces en 20×SSC durante 15 minutos. La metodología para la transferencia fue esencialmente la misma que la descrita en el caso de los southern, incluyendo únicamente 2 lavados adicionales del gel, una vez concluida la electroforesis, en 20×SSC durante 15 minutos y utilizando 20×SSC como tampón de transferencia.

La prehibridación y la hibridación se realizaron con el tampón de hibridación de alta concentración de SDS (high SDS buffer) que se compone de 7 % SDS, 50 % formamida desionizada, 5×SSC, 50 mM fosfato sódico pH 7 y 0,1 % N-laurilsarcosina. La prehibridación se realizó a 50 °C durante una hora. La sonda se desnaturizó a 95 °C durante 10 minutos y se añadió a la membrana prehibridada con el tampón de hibridación de alto SDS. La hibridación se llevó a cabo durante más de 16 horas y una vez finalizada se conservó el tampón con la sonda a -20 °C para futuros usos.

Los lavados de la membrana y los procedimientos de detección de la sonda fueron semejantes a los descritos en el caso de las hibridaciones con filtros de ADN, así como los procedimientos para la eliminación de la sonda y de reutilización de los filtros.

## **16. SECUENCIACIÓN**

El servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca fue el responsable de la secuenciación de ADN. El servicio consta de un secuenciador ABI PRISM 377 de la casa Applied Biosystems. Para la obtención de la secuencia se proporcionaron 500 ng de ADN de plásmido y 3 pmol de cebador en un volumen de 8  $\mu$ l. La información generada fue proporcionada en forma de cromatograma que fueron visualizados y editados con el programa informático Chromas.

## 17. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Para optimizar la expresión de proteínas recombinantes introducidas en *S. cerevisiae* se realizó un análisis temporal desde la inducción por galactosa.

*S. cerevisiae* fue transformada con el plásmido pYES que contenía una copia del gen *Bcfhg1* bajo el control de un promotor inducido por galactosa. Una colonia aislada de *S. cerevisiae* fue inoculada en 15 ml de medio SC-U con 2 % glucosa, a 30°C toda la noche. La OD600 del cultivo resultante fue determinada para preparar 50 ml de medio de inducción con una OD600 de 0,4. La cantidad de cultivo calculada se centrifugó a 2.000 r.p.m durante 5 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 ml de medio de inducción que se añadieron al resto de los 50 ml de medio de inducción. Después, las células inducidas fueron incubadas a 30 °C con agitación.

Se extrajeron alícuotas de 5 ml a las 0, 1,5, 3, 6 y 9 horas desde el inicio de la inducción. Para cada alícuota se calculó la OD600 para la posterior extracción de lisados. Los cultivos se centrifugaron a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,5 ml de agua estéril. Se transfirieron las células a un tubo de microcentrifugación y se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se almacenaron a -80 °C.

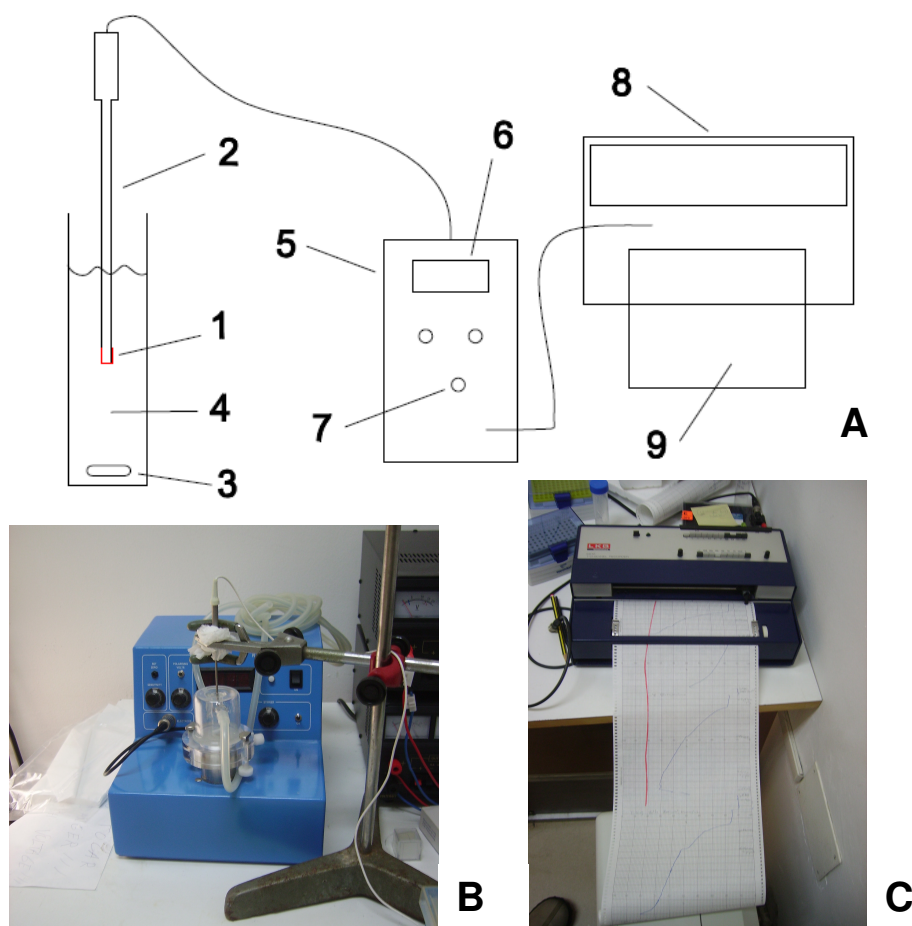
## **18. MEDICIÓN Y DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO**

### **18.1. ELECTRODO DE ÓXIDO NÍTRICO**

Para la medición de la concentración de óxido nítrico (NO) en medio líquido se utilizó el electrodo ISO-NOP de la compañía Word Precision Instruments (WPI) conectado a un sistema temporal de registro (Fig. 18). El electrodo dispone de una membrana selectiva de NO dispuesta en un sensor de 2 mm de diámetro. El instrumento tiene un tiempo de respuesta menor de 5 segundos, un límite de detección mínimo de 1 nM de NO y una sensibilidad de 2 pA/nM. Asimismo, el electrodo es sensible a temperatura, no tiene deriva y carece de interferencias fisiológicas.

Las mediciones se realizaron en un volumen de 2 ml de agua destilada, de medio de cultivo B5, de medio de inducción de levadura o de tampón salino de fosfato (PBS, Sigma). En los experimentos realizados con lisados celulares se añadieron al PBS 250  $\mu$ M de NADH (Sigma), cofactor necesario para la correcta actividad enzimática de la proteína flavohemoglobina. El experimento se realizó en constante agitación y todo el sistema se encontraba en una habitación a 22 °C.

El electrodo se calibró con 2  $\mu$ M de NO que se obtuvo al añadir 2  $\mu$ l de agua destilada saturada de NO. El agua saturada de NO se preparó a partir de 3 ml de agua destilada donde primero se burbujeaba N<sub>2</sub> gas durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar el O<sub>2</sub> y seguidamente se burbujeaba NO gas durante 15 minutos también a temperatura ambiente.



**Figura 18.** Electrodo de NO.

**A-** Sistema de detección de óxido nítrico. Los números corresponden a las siguientes partes del sistema de detección: 1- Membrana permeable a NO; 2- Sensor, 3- Imán agitador, 4- Muestra líquida, 5- Electrodo, 6- Pantalla digital, 7- Ajuste, 8- Sistema de registro, 9- Papel calibrado. **B-** Imagen del sensor de NO. **C-** Imagen del sistema de registro.

Antes de realizar cada medición, el electrodo se dejó equilibrar durante al menos 20 minutos en agua y 10 minutos en el medio en el que se iba a efectuar la medición. Una vez que el electrodo estaba estabilizado, se conectó el registro de concentración, se añadieron  $2 \mu\text{M}$  de NO y se observó la cinética de degradación de óxido nítrico durante 5 ó 10 minutos. Después de cada medición se limpió la membrana aplicando un suave chorro de agua destilada y el recipiente de medición se lavó varias veces con agua destilada.

La cantidad de NO liberada por el donador de óxido nítrico DETA/NO (diethylenetriamine) fue medida con el electrodo de óxido nítrico. Se usaron los

donadores DETA/NO proporcionados por dos casas comerciales diferentes que garantizan purezas superiores o iguales al 97 %: Alexis (Switzerland) y Sigma (EE.UU). En cada caso se usaron las siguientes concentraciones de trabajo: 0.125, 0.25 y 0.5 mM.

Para comprobar la especificidad de la detección y de la medición de NO se añadieron a los 2 ml de medio con NO, 10  $\mu$ l de una solución 50 mM c-PTIO (2-(4-carboxifenilo)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido sal de potasio, Sigma). El c-PTIO es un eficiente secuestrador de NO. También se utilizó el inhibidor de la NOS (nitric oxide synthase) L-NAME ( $N_{\omega}$ -nitro-L-arginina metil ester hidrocloída, Sigma) a una concentración de trabajo de 5 mM y a partir de un stock de 50 mM.

## 18.2. MICROSCOPIA

El fluorocromo diaminofluoresceína en su forma permeable (DAF-2DA; 4,5-diaminofluoresceína-2-diacetato; Sigma) es capaz de reaccionar selectivamente con el NO y formar el compuesto fluorescente DAF-2T (diaminotriazolfluoresceína). Esta reacción indica la presencia de NO y su localización. Como control en estos experimentos de detección de NO se utilizó c-PTIO, un potente secuestrador de NO que previene la formación de fluorescencia. Es un método que nos permite la visualización *in vivo* y la localización de la producción de óxido nítrico con altos niveles de confianza y precisión (Foissner *et al.*, 2000).

El análisis *in vitro* de la producción de NO se realizó sobre micelio de *B. cinerea* cultivado en 100 ml de medio B5 a 22 °C y diversos tiempos de incubación. Se recogió 1 ml del cultivo en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 0,5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Se añadió 1  $\mu$ l 5 mM DAF-2DA y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. En el caso del control, se añadió 1  $\mu$ l 50 mM c-PTIO 2 minutos antes de añadir el DAF-2DA.

El análisis *in planta* de la producción de NO se realizó sobre hojas infectadas de *B. cinerea*. Se recortó la zona de la hoja donde se había inoculado el hongo y se colocó aquella sobre un portaobjetos. Encima de la lesión se depositó una gota de 0,1

ml de 10  $\mu$ M DAF-2DA en 10 mM Tris-HCl pH 7,5 que se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. En el caso de los controles con c-PTIO sobre la lesión se depositó una gota de 0,1 ml de 0,25 mM c-PTIO que se incubó durante 15 minutos. Después se siguió el mismo tratamiento de las muestras con DAF-2DA.

La visualización del compuesto fluorescente se realizó mediante microscopía de fluorescencia y mediante microscopía de láser confocal (LEICA). En el primer caso la excitación y detección se llevó a cabo mediante un filtro para la GFP. En el segundo caso se utilizó un láser de argón de 488 nm de excitación y un filtro de paso de bandas de 515-530 nm. A su vez la autofluorescencia de sustancias moleculares en longitudes de onda mayores a 600 nm se registró para su uso como control y eliminación de fondo en el segundo caso.

## 19. ANÁLISIS DE DATOS

El procesamiento de secuencias, alineamiento, edición de plásmidos y diseño de cebadores se realizó gracias al programa Vector NTI suite 5.5. El programa Chromas se utilizó para la visualización y edición de cromatogramas de secuenciación. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo por medio de MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Las bases de datos de nucleótidos, proteínas y genomas se utilizaron a través de páginas Web. El servidor Expasy (<http://www.expasy.ch/>) proporcionó los programas y accesos a páginas web para la determinación de dominios, localización subcelular, alineamiento y estructura de proteínas. La base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se utilizó para consulta de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como la predicción de estructuras 3D de proteínas. El análisis de los dominios conservados de proteínas se realizó mediante el programa CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). La consulta del genoma de *B. cinerea* se realizó mediante consulta de la base de datos del Broad Institute ([http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/botrytis\\_cinerea/index.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/botrytis_cinerea/index.html)) y de Genoscope ([http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet\\_LN/organisme\\_LN.html](http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_LN/organisme_LN.html)). La consulta de la base de datos de mutantes de *S. cerevisiae* se realizó a través de las Webs [http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM\\_index.html](http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM_index.html) y <http://db.yeastgenome.org/>. Para el análisis de la secuencia promotora se utilizó el programa MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005).

El análisis estadístico de datos se realizó gracias al programa statistiXL y SPSS. A su vez se usaron los programas del entorno Office de Windows. El manejo de bibliografía se agilizó con EndNote 7. El diseño gráfico y la edición de imágenes se realizó con los programas Adobe Photoshop 7.0 y AutoCAD2007.

La visualización de imágenes de membranas marcadas con quimioluminiscencia se realizó con LAS-1000 Plus (Fujifilm). En el caso de geles teñidos con bromuro de etidio se utilizó el programa Gel Logia 100 Imaging System (Kodak); este programa también se utilizó para la cuantificación de la señal de hibridaciones tipo Northern.



## **RESULTADOS**



# 1. EL GEN CODIFICADOR DE LA ENZIMA FLAVOHEMOGLOBINA DE *BOTRYTIS CINEREA* (BCFHG1)

## 1.1. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL: BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS

Una revisión de la literatura científica en relación con el tema de detoxificación de óxido nítrico por enzimas de tipo flavohemoglobina en bacterias y hongos nos indicó que el gen codificador de esta enzima había sido caracterizado con anterioridad en diversas especies pertenecientes a estos grupos de organismos (*Salmonella typhimurium*, *E. chrysantemi*, *S. cerevisiae*, *F. oxysporum*, *C. neoformans*...) apreciándose un elevado nivel de conservación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas y de la estructura de las mismas. Teniendo en cuenta estas observaciones decidimos abordar el aislamiento del gen o genes codificador/es de enzimas de tipo flavohemoglobina de *B. cinerea* haciendo uso de una estrategia basada en la identificación de secuencias homólogas a las de genes codificadores de flavohemoglobinas de bacterias y hongos en el genoma de este organismo. Cuando se inició este trabajo se disponía de una base de datos de secuencias de fragmentos de cDNA de la cepa T4 de *B. cinerea* generada a partir de una población de mRNA derivada de micelio del hongo cultivado en medios sintéticos artificiales en condiciones de limitación de fuente de nitrógeno. Esta genoteca de cDNA y el proyecto de secuenciación correspondiente habían sido llevados a cabo por el instituto GENESCOPE (Francia). La base de datos derivada fue puesta a disposición del público en general desde un principio a través de la página web del Instituto (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Botrytis-cinerea-cDNA-library.html>).

En una primera aproximación, para obtener indicaciones sobre la posible presencia de secuencias relacionadas con las secuencias codificadoras de enzimas flavohemoglobinas de bacterias y hongos en el genoma de *B. cinerea* se llevó a cabo un análisis “tblastn” con la base de datos de la genoteca de cDNA de *B. cinerea* generada por GENESCPOE. Como secuencia de referencia se utilizó la secuencia de

aminoácidos de la proteína codificada por el gen *yhb1* de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2000) (Genbank número de acceso Z73019). Esta comparación permitió detectar nueve clones de cDNA cuya traducción mostraban una homología significativa con regiones concretas de la secuencia de aminoácidos de la proteína YHB1. Estos clones fueron los siguientes: AL111967, AL115808, AL116673, AL112789, AL112791, AL115953, AL113298, AL116765 y AL116429. Los tres primeros derivaban de un mismo mRNA (o fragmento de mRNA) y como clon representativo se seleccionó el clon AL111967. Los cinco clones siguientes correspondían a un único tipo de mRNA (o de fragmento de mRNA,) siendo seleccionado como representativo el clon AL113298. Finalmente, el clon AL116429 derivaba de un tercer tipo de mRNA (o de fragmento de mRNA). Desde este momento se trabajó únicamente con estos tres clones. Un primer alineamiento de las tres secuencias elegidas no permitió detectar con claridad secuencias compartidas o solapantes, si bien los clones AL111967 y AL116429 sí presentaban una similitud importante en uno de sus extremos. Estas observaciones nos hicieron proponer inicialmente que existían al menos dos (quizás tres) genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en el genoma de *B. cinerea*. La Figura 19 muestra la secuencia de nucleótidos de cada uno de los tres clones.

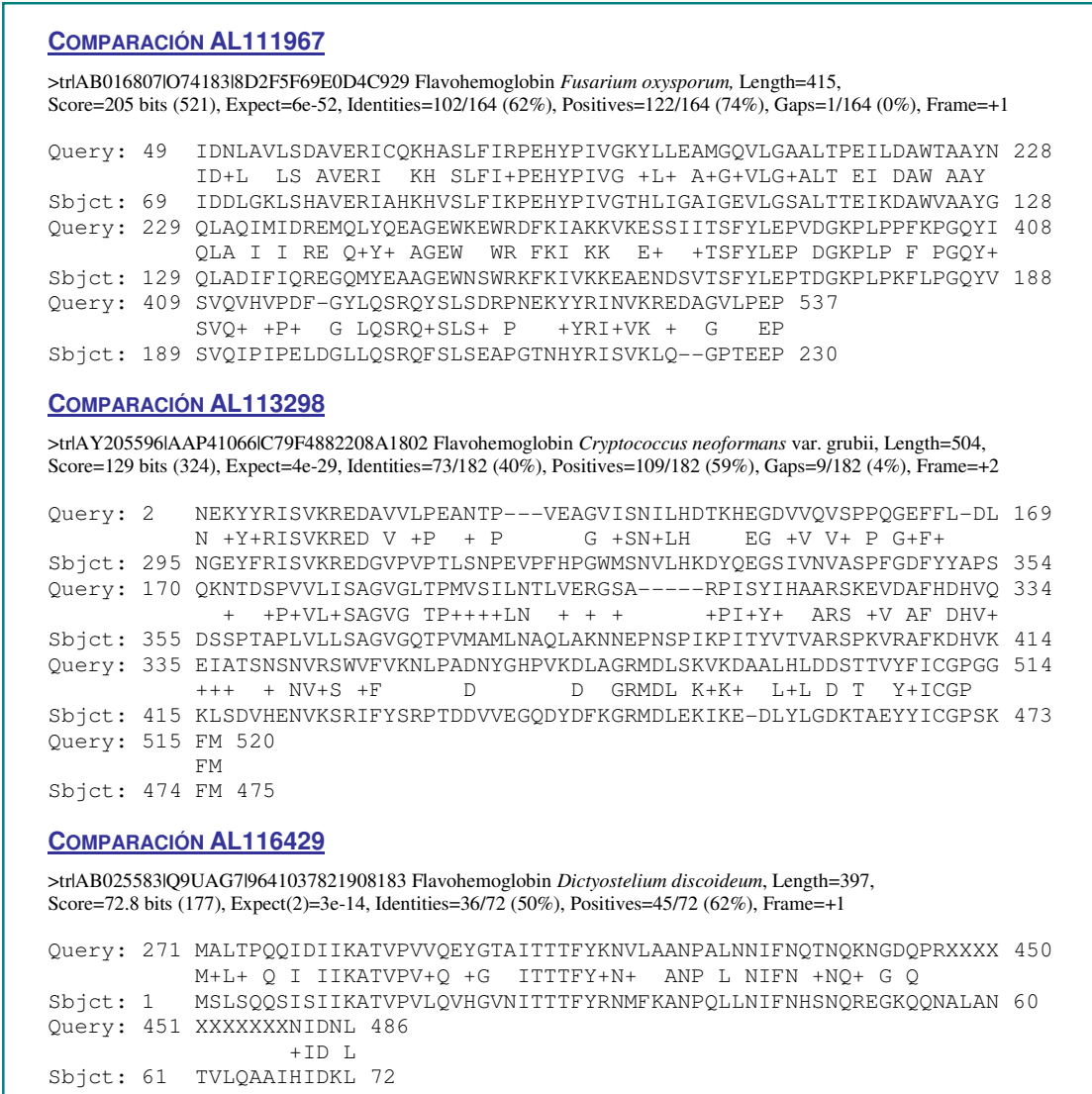
Con cada clon seleccionado se llevó a cabo un análisis “blastx”. La Figura 20 muestra el primer registro identificado con cada uno de los tres clones. En los tres casos los primeros registros corresponden a proteínas de tipo flavohemoglobina. El primer registro en cada caso es una flavohemoglobina diferente y es interesante destacar que las regiones identificadas con cada clon de cDNA en la correspondiente proteína representan regiones diferentes de una supuesta “proteína tipo”. Así, con el clon AL111967 el alineamiento presentado corresponde a una zona central de la proteína (aminoácidos 69 a 230 de un total de 415). Por su parte, con el clon AL113298 el mejor alineamiento se produce en la región correspondiente a los aminoácidos 295 a 475 de 504. Finalmente, con el clon AL116429 el alineamiento que se presenta corresponde a la región formada por los aminoácidos 1 a 72 de 397. Estas observaciones permiten considerar una situación alternativa a la planteada inicialmente: quizás no existan dos o tres genes codificadores de enzimas flavohemoglobinas en *B. cinerea*, como hemos pensado anteriormente, y los clones

que están siendo analizados representen regiones diferentes de un único tipo de mRNA transcrito a partir de un único gen.



**Figura 19.** Secuencia de nucleótidos de los tres clones de cDNA seleccionados en la genoteca de cDNA de *B. cinerea* que presentan homología con secuencias codificadoras de enzimas de tipo flavohemoglobina.

En rojo se indican en cada clon las regiones cuyas secuencias fueron utilizadas para diseñar los dos oligonucleótidos que permiten amplificar mediante PCR el fragmento de ADN correspondiente comprendido entre ambos para su posterior utilización como sonda en experimentos de hibridación. Los oligonucleótidos FH1A, FH2A y FH3A tienen la secuencia en dirección 5'→3' que se presenta en la figura. Los oligonucleótidos FH1B, FH2B y FH3B tienen la secuencia complementaria a la secuencia marcada en la figura en cada caso.



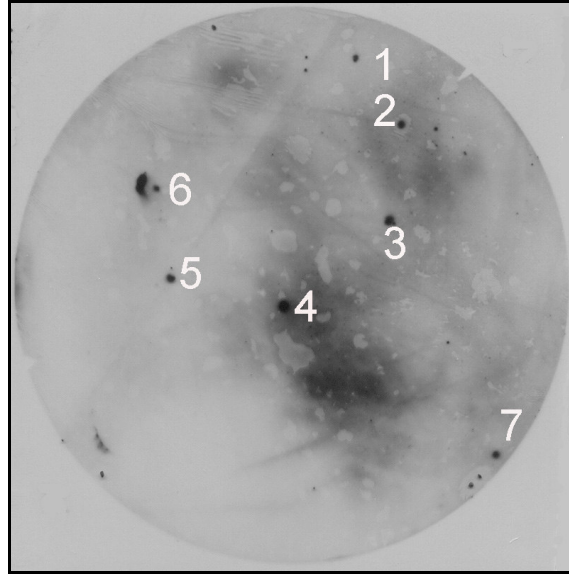
**Figura 20.** Primer registro identificado mediante análisis “blastx” con cada uno de los tres clones seleccionados y alineamiento parcial con la secuencia de aminoácidos de las regiones de mayor homología.

## 1.2. AISLAMIENTO DEL GEN *BCFHG1*

Para determinar cuál es la situación cierta decidimos generar sondas específicas de cada uno de los tres clones mediante PCR utilizando parejas de oligonucleótidos específicos de regiones concretas de cada clon, sondas que serían utilizadas en experimentos de hibridación. La Figura 19 muestra la posición, secuencia y orientación de cada uno de los oligonucleótidos utilizados. Con cada pareja de oligonucleótidos se amplificó mediante PCR el fragmento de ADN correspondiente: el fragmento FH1 del clon AL113298 (de 506 pares de nucleótidos de longitud), el fragmento FH2 del clon AL111967 (de 415 pares de nucleótidos) y el fragmento FH3 del clon AL116429 (de 583 pares de nucleótidos). Los tres fragmentos fueron clonados y secuenciados, confirmado su identidad. Puesto que el clon más ampliamente representado en el conjunto de clones de cDNA identificados era el clon AL113298 decidimos llevar a cabo la primera hibridación con la sonda FH1.

En primer lugar se realizó una hibridación Southern con un filtro ADN genómico de *B. cinerea* utilizando como sonda FH1. En este experimento se observó una sola banda indicativo de que posiblemente sólo exista una copia del gen de la flavohemoglobina de *B. cinerea*.

Para clonar el gen a partir del cual se ha derivado el fragmento de cDNA FH1 utilizado como sonda se llevó a cabo una hibridación tipo Southern sobre filtros a los que se habían transferido los halos de lisis de una genoteca de ADN genómico de *B. cinerea* cepa B05.10. La figura 21 muestra los resultados obtenidos con uno de estos filtros sometidos a una hibridación en condiciones altamente restrictivas (para detectar secuencias estrictamente homólogas). Este análisis permitió detectar siete halos de lisis positivos que se purificaron en tres escrutinios sucesivos y de los que finalmente se extrajo ADN.

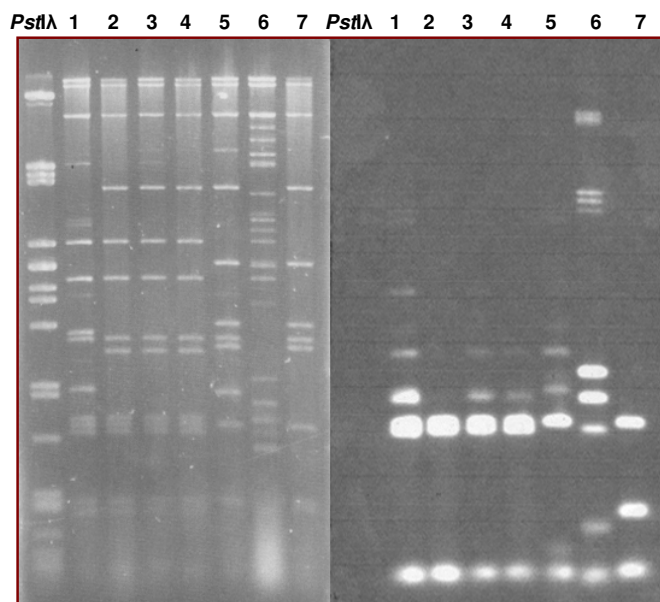


**Figura 21.** Hibridación de una genoteca de ADN genómico de *B. cinerea* con la sonda FH1. Los números indican los fagos calificadas como positivos.

El ADN de los siete fagos detectados fue digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *EcoRI* simultáneamente y las muestras de ADN resultantes fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a una membrana de nylon. Con esta membrana se llevó a cabo una hibridación tipo Southern con la sonda FH1 en las mismas condiciones de hibridación utilizadas anteriormente. La figura 22 muestra tanto los patrones de bandas resultantes de la digestión del ADN de los fagos (Panel A) como los patrones de hibridación obtenidos (Panel B). Al analizar los patrones de restricción se comprueba que casi todos los fagos tienen un patrón de restricción similar (particularmente evidente en los fagos 1, 2, 3 y 4) y que comparten algunos fragmentos restricción concretos. El fago 6 es el que presenta un patrón más diferente, si bien es cierto que en este caso la digestión no parece haber sido completa y algunas de las bandas generadas se derivan de digestiones parciales. Cuando se analizan los patrones de hibridación es interesante destacar que en todos los casos se detecta hibridación, y se detecta hibridación en varias bandas, lo que sugiere que la secuencia detectada en el genoma de *B. cinerea* incluye varios sitios de restricción para las enzimas utilizadas. El fragmento FH1 utilizado como sonda incluye, efectivamente, dos sitios de restricción para la enzima *EcoRI* separados por 197 nucleótidos y ninguno para la enzima *SalI*. Este fragmento debe ser detectado en



todos los fagos si éstos incluyen distintos fragmentos solapantes del genoma de *B. cinerea*. Efectivamente, en todos los fagos se detecta una banda de hibridación de aproximadamente este tamaño. Los demás fragmentos que hibridan en los distintos fagos representarán los fragmentos flanqueantes a este fragmento *EcoRI-EcoRI* de 197 pares de nucleótidos que podrán tener un tamaño diferente en función de la región concreta del genoma de *B. cinerea* que cada fago en particular incluya. Tomadas en conjunto, estas observaciones indican que con la sonda FH1 estamos detectando un único gen de *B. cinerea* con homología con genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina.

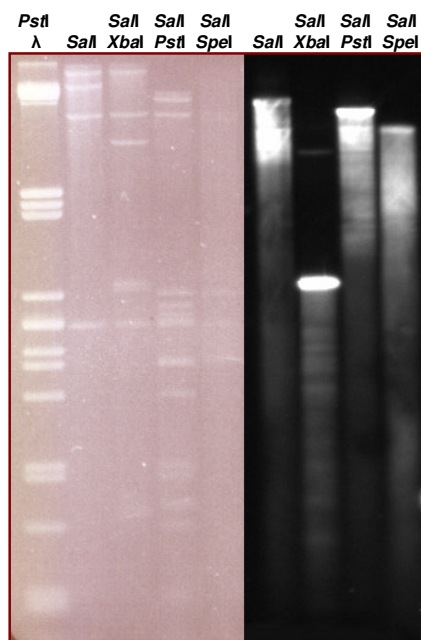


**Figura 22.** Southern de la digestión *Sall-EcoRI* de los fagos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

La imagen de la izquierda (Panel A) corresponde al gel de agarosa con su marcador *PstI*  $\lambda$ , mientras que la imagen de la derecha (Panel B) corresponde a su hibridación con FH1.

Para facilitar la clonación y subclonación de los fragmentos de ADN correspondientes a partir de estos fagos y proceder a su secuenciación decidimos trabajar con un único fago (se seleccionó el fago 2) y realizar un análisis de restricción y de hibridación más completo. Con este objeto se digirió el ADN del fago 2 con las enzimas de restricción indicadas en la Figura 23 y se llevó a cabo una hibridación tipo Southern con la sonda FH1 (Fig. 23). Los resultados obtenidos fueron analizados tratando de identificar una digestión que generara una única banda de hibridación y con un tamaño elevado para tener ciertas garantías de que el

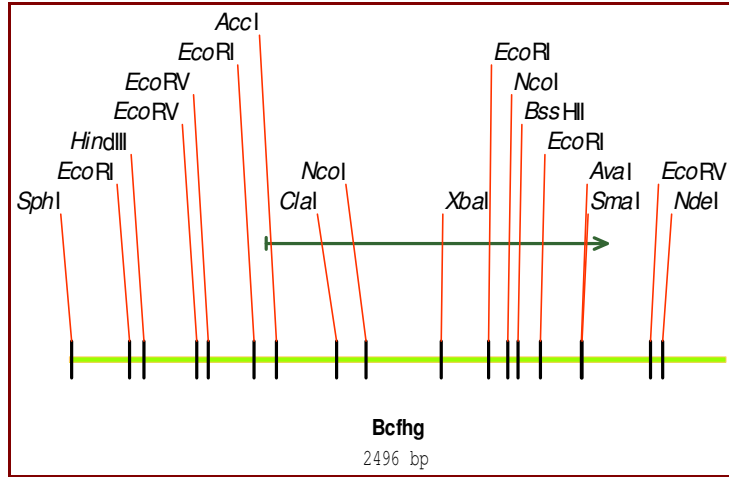
fragmento correspondiente incluyera el gen buscado completo. En la digestión *SalI-XbaI* se detectó una única banda de hibridación con un tamaño aproximado de 2.9 kb que respondía a estas características. Por esta razón decidimos clonar el fragmento de ADN correspondiente. El fragmento fue clonado en pBluescript digerido con *SalI* y *XbaI* y secuenciado con los cebadores Universal y Reverso. Los resultados obtenidos demostraron que la secuencia correspondiente al fragmento de ADN utilizado como sonda (fragmento FH1) está localizado en uno de los extremos del fragmento clonado. El estudio de la traducción de aminoácidos de la secuencia determinada en este extremo nos indicó que en el fragmento clonado estaba ausente la región 5' del supuesto gen codificador de la enzima flavohemoglobina detectado. Se hizo necesario, por tanto, abordar la clonación de otros fragmentos de ADN de los fagos que incluyeran la región 5' del gen para completar la secuenciación del mismo. Se optó entonces por clonar los dos fragmentos *EcoRI-EcoRI* de aproximadamente 850 y 900 pares de nucleótidos respectivamente que deben flanquear el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 197 pares de nucleótidos y que se visualizan como una banda de hibridación doble en la Figura 22.



**Figura 23.** Southern de las digestiones *SalI*, *SalI-XbaI*, *SalI-PstI* y *SalI-SpeI* del fago 2.

La imagen de la izquierda corresponde al gel de agarosa con su marcador *PstI*  $\lambda$ , mientras que la imagen de la derecha corresponde a su hibridación con FH1.

En el curso de esta clonación se hizo pública la información derivada del proyecto de secuenciación del genoma de *B. cinerea* cepa B05.10 (Botrytis-cinerea-Sequencing-Project, 2008) a la cual tuvimos acceso inmediato. El análisis de la base de datos ofrecida por el Broad Institute nos permitió identificar la secuencia detectada por hibridación en nuestros experimentos de clonación. Dicha secuencia apareció localizada en el Supercontig 14: 308446-309683. Esta información nos permitió simplificar el proceso de clonación ya que se pueden diseñar oligonucleótidos específicos para el estudio de la secuencia de interés. Diseñamos los oligonucleótidos BcfhgF y BcfhgR que nos permitieron amplificar un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* de 2.496 pares de nucleótidos (Fig. 24) y que incluía la región del genoma de *B. cinerea* en la que el análisis bioinformático llevado a cabo por el Broad Institute detectaba la región codificadora de un gen codificador de una enzima flavohemoglobina y sus regiones flanqueantes. El fragmento amplificado fue clonado y secuenciado completamente. Debemos señalar que la anotación automática había identificado un gen de 1.238 nucleótidos correspondiente al gen identificado con el código BC16\_0389.1, con un intrón y que codificaba una proteína deducida de 329 aminoácidos. Cuando se comparó detalladamente la secuencia determinada en el curso del proyecto de secuenciación del genoma y la secuencia determinada experimentalmente a partir de los fragmentos de ADN clonados y secuenciados a partir de la genoteca de ADN genómico de *B. cinerea* o de los productos de PCR amplificados y secuenciados se comprobó que se había producido un error en la secuenciación del genoma en la región correspondiente a la fase abierta de lectura identificada automáticamente. Se trataba concretamente de la posición 531 de la región codificante del gen: en el proyecto de secuenciación del genoma no se había identificado un nucleótido de adenina en esa posición lo que hacía cambiar la secuencia de lectura y composición de la proteína deducida.



**Figura 24.** Mapa de restricción de la región de ADN genómico de *B. cinerea* en la que se ubica el gen *Bcfhg1*.

Fragmento amplificado del gen *Bcfhg1* con los oligonucleótidos BcfhgF y BcfhgR

### 1.3. SECUENCIA DEL GEN *BCFHG1*

La secuencia definitiva de gen codificador de la enzima flavohemoglobina de *B. cinerea* identificada en el curso de este trabajo y sus regiones flanqueantes se presenta en la Figura 25. Se presenta también la secuencia de aminoácidos que resulta de su traducción en la misma figura. Un análisis detallado de la secuencia completa del genoma tratando de identificar otras secuencias con homología con genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina demostró que éstas no existen. En el genoma de *B. cinerea*, por lo tanto, existe un único gen codificador de enzimas de tipo flavohemoglobina, gen que ha sido denominado *Bcfhg1*. Esta secuencia ha sido registrada en la base de datos del Genebank con el número de acceso AM939900.

-529 AAGCTTACTAATCTCGCAAAGGGATCGGACGCACGCGGGGATGTCACGGGGCCGTGATTTA  
 -469 CCCGCAGTATTGTATTCAAATTCAAATGTTCAACCCAAATTTTCCGAAGTTGCCCGGTGGC  
 -409 CCCGGTGC GTT GATAAACAT TGATAACGTCCCTAGAAAGATGAGATAGACATCTCCCCGGA  
 -349 GATGCTTCACCCCCTGGTGGATATCGTACATAAAAGGATCAGGACGCGACCTTTTATTTTC  
 -289 AGCGATATCCCTCACTCGGCTCCCACAAACATGACACTGTTTGTGCGTGATGGACCAATTG  
 -229 CAATTGAGGTATATGTATGATTAGAGTGCAATACGATGAAATCAGGTCATAAAAATTTTCG  
 -169 TGCTCAGACGGGGGGGCGATTCTACAAGCACCCTTAGTAGCTGTGATGCTGGAGGTGG  
 -109 AATTCATACATAAGGATGCTGGAGCCAGTGTGTCCAGAATGTTTATATGTCAGAAATCAC  
 -49 CAGAGCCGGAAAACAACAACACAGTCTACTAGACAATTCAGATCTTAAG  
 1 ATG GCA CTC ACA CCT CAA CAA ATC GAC ATC ATC AAG GCT ACA GTG  
 1 M A L T P Q Q I D I I K A T V  
 46 CCT GTG GTC CAA GAG TAT GGA ACC GCC ATT ACT ACC ACC TTT TAC  
 16 P V V Q E Y G T A I T T T F Y  
 91 AAG AAC GTT CTC GCC GCA AAC CCA GCA CTA AAT AAC ATC TTC AAC  
 31 K N V L A A N P A L N N I F N  
 136 CAA ACC AAC CAA AAG AAT GGA GAT CAA CCA CGT GCT CTG TCA GGT  
 46 Q T N Q K N G D Q P R A L S G  
 181 GCT CTC GCT GCT TAT GCG GCC AAT ATC GAT AAC CTT GCT GTA CTC  
 61 A L A A Y A A N I D N L A V L  
 226 TCG GAT GCC GTG GAA AGA ATA TGT CAG AAG CAC GCC TCA TTA TTC  
 76 S D A V E R I C Q K H A S L F  
 271 ATC CGA CCA GAA CAC TAC CCG ATA GTT GGA AAA TAC CTG CTG GAG  
 96 I R P E H Y P I V G K Y L L E  
 316 GCC ATG GGC CAG GTA CTC GGT GCG GCA TTG ACG CCA GAA ATC CTA  
 106 A M G Q V L G A A L T P E I L  
 361 GAC GCG TGG ACG GCT GCC TAC AAC CAA CTG GCT CAG ATT ATG ATT  
 121 D A W T A A Y N Q L A Q I M I  
 406 GAT AGA GAA ATG CAA TTA TAT CAA GAA GCC GGC GAG TGG AAA GAA  
 136 D R E M Q L Y Q E A G E W K E  
 451 TGG AGG GAC TTC AAG ATC GCC AAG AAA GTC AAA GAA TCC AGT ATC  
 151 W R D F K I A K K V K E S S I  
 496 ATC ACC TCT TTC TAC CTA GAG CCC GTG GAC GGA AAA CCC CTC CCC  
 166 I T S F Y L E P V D G K P L P  
 541 CCT TTC AAG CCG GGC CAG TAT ATC TCA GTC CAA GTC CAT GTA CCA  
 181 P F K P G Q Y I S V Q V H V P  
 586 GAC TTT GGA TAT TTG CAA TCT AGA CAA TAC TCA TTG AGT GAT CGT  
 196 D F G Y L Q S R Q Y S L S D R  
 631 CCA AAT GAG AAA TAC TAC CGT ATC AGT GTG AAG CGA GAG GAT GCT  
 211 P N E K Y Y R I S V K R E D A  
 676 GTT GTC CTC CCA GAA GCC AAC ACA CCA GTC GAA GCA GGT GTG ATT  
 226 V V L P E A N T P V E A G V I  
 721 TCA AAT ATT CTT CAC GAT ACC AAA CAC GAG GGC GAT GTA GTC CAG  
 241 S N I L H D T K H E G D V V Q  
 766 GTA TCT CCA CCT CAA GGC GAA TTC TTC CTC GAT CTG CAA AAG AAT  
 256 V S P P Q G E F F L D L Q K N  
 811 ACC GAT TCT CCC GTA GTT TTG ATT TCC GCC GGA GTT GGC CTC ACC  
 271 T D S P V V L I S A G V G L T  
 856 CCC ATG GTA TCC ATC CTC AAT ACC TTG GTA GAA AGA GGA AGC GCG  
 286 P M V S I L N T L V E R G S A  
 901 CGA CCA ATA TCA TAC ATC CAC GCA GCA CGC AGC AAA GAA GTA GAT  
 301 R P I S Y I H A A R S K E V D  
 946 GCA TTC CAT GAC CAT GTC CAA GAA ATC GCC ACA TCG AAT TCA AAT  
 316 A F H D H V Q E I A T S N S N  
 991 GTC CGT TCC TGG GTT TTC GTC AAG AAT CTA CCC GCC GAC AAT TAT  
 331 V R S W V F V K N L P A D N Y  
 1036 GGA CAT CCG GTC AAG GAT CTA GCG GGA CGA ATG GAC TTA TCG AAA  
 346 G H P V K D L A G R M D L S K  
 1081 GTT AAA GAC GCT GCG TTG CAT TTG GAT GAT TCT ACT ACC GTG TAT  
 361 V K D A A L H L D D S T T V Y

```

1126 TTT ATC TGT GGC CCG GGA GGA TTT ATG GAT GAT ATG AGT AAG GTT
376 F I C G P G G F M D D M S K V
1171 TTG CAA ACC TTT GGA GTG AGC GAA GAT AGG ATT AAC CTG GAG GTT
391 L Q T F G V S E D R I N L E V
1216 TTC GGC ACC GGA GAA GCG CAG TGA
406 F G T G E A Q *
1240 TAGGTGTTTCGTCGTAATGCATGATGCATGAGAGATGGGAAGTGTACATAGAAGATTCCCA
1300 GAAGTTTAAACTCCACTAATATTTAAGATACCAACAAATACATATATTCTCGTAGCCAAT
1360 TGCCGCATGTTTTTTCACGCTCACATTTATAATCTCAGTGGATATCGTGATCTTCCGTATG
1420 CAATGATTGTGATGTGATCTACAATACATATGACACCACAGTACCATAGATTCAGGACTT
1480 TTAATATGGCGGCAGATTTCTCAACTCCTTATCTAAGACACGGTAAGTTCCCACACTGAA
1540 GCAATAAGTAGTCGATGTTTCATCTCAACAAGCTAATAACTCCCCAACCTCTACTCCAAT
1600 AGGTTATTGTGTCATCTCACCGTCGTTAGGTGTCAAAGTCTTGTGTAATAGATATGCAATT
1660 GTATAAGACATTGAGAAAAGTGGGGTATGCTAGCATTGAGAATTGCTTTATATACACCTT
1720 TTGATTGGGTTTCTATATAGATATAAGTTAGGGGTCTGTATTAGGAAAATTTTTAGATAG
1780 GGATTGGATCATTAGTTGTACAATATTGATCTATAGTATTGTGTGAAGAATTC

```

**Figura 25.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de *Bcfhg1*.

Los números de la izquierda corresponden al número de nucleótidos desde el inicio de la transcripción del gen. La secuencia de nucleótidos en rojo indica la región codificante del gen (ORF). La secuencia de nucleótidos en negro corresponde al promotor y terminador del gen. La secuencia de aminoácidos en azul corresponde a la traducción del ORF. Las secuencias marcadas en amarillo indican los posibles codones de iniciación de la traducción. Las probables cajas TATA y CAAT se encuentran subrayadas.

### 1.3.1. La región codificante

La región codificante del gen *Bcfhg1* consta de 1.239 nt y carece de intrones. La traducción de la misma da lugar a una proteína deducida de 412 aminoácidos. Existen varios codones de iniciación de la traducción en la misma fase de lectura aunque sólo uno forma parte de un entorno (secuencia) que responde a las características que tiene la secuencia Kozak (GCCGCC(A/G)CCAUGG, siendo AUG el codón de iniciación), secuencia consenso presente alrededor del codón de iniciación de los genes eucariotas (Kozak, 1987; Kozak, 1990; Kozak, 1991). Más recientemente, Nakagawa y colaboradores han observado que, aunque existen variaciones dependiendo de los grupos de eucariotas considerados, existe un sesgo muy importante en todos los casos por la presencia de A/G en la posición -3, A/C en la posición -2 y C en la posición +5 (el residuo A del codón AUG está numerado como +1) (Nakagawa *et al.*, 2008). Como se comprueba en la figura 25, sólo el triplete AUG seleccionado como codón de iniciación válido reúne estas características. Por otra parte, la proteína traducida considerando este codón de iniciación presenta homología con el extremo aminoterminal de otras enzimas

flavohemoglobinas previamente caracterizadas (*F. oxysporum* BAA33011, *Aspergillus fumigatus* XP\_746528).

### 1.3.2. Análisis de la región promotora

La secuencia promotora de *Bcfhg1* presenta cajas TATA (posiciones -66 y -220) y CAAT (posiciones -16, -201, -229, -235 y -434) implicados en el control de la transcripción de forma general. Posteriormente se buscaron otros elementos de regulación particulares basado en las secuencias de unión de factores de transcripción mediante el programa MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005). Los resultados de las familias de factores de transcripción localizadas se muestran en la tabla 2.

Interesantemente, se detectan secuencias de sitios de unión de factores de transcripción relacionados con la activación de genes inducidos por nitrógeno con unas probabilidades (ratios) de similitud de secuencias bastante elevadas. Estas secuencias podrían estar implicadas en la activación del gen en fases o procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Asimismo, se detecta con alta probabilidad una secuencia de unión de factores de transcripción relacionadas con la respuesta a situaciones de estrés en levadura.

### 1.3.3. La región 3' flanqueante

El análisis de la región 3' flanqueante no mostró ninguna secuencia consenso de señal de poliadenilación, AATAAA, la cual se presenta en la mayoría de los genes de organismos eucariotas (Proudfoot y Brownlee, 1976).

**Tabla 2.** Predicción de factores de transcripción que pueden unirse al promotor de *Bcfhg1*.

En la primera columna se indica el factor de transcripción que reconoce la probable secuencia señal. En la segunda columna se indica el ratio de similitud de la secuencia. En la tercera columna se indica la localización de la secuencia y su orientación. En la última columna se indica la secuencia con los nucleótidos coincidentes en rojo y en mayúsculas la secuencia central.

Familia	Ratio	Localización	Secuencia
Yeast Mlu I cell cycle box	0.842	-499, -489 (-)	ccc <b>CGCG</b> tgcg
Yeast activator of glycolytic genes	0.790	-476, -460 (+)	gtgattta <b>CCCG</b> cagta
RDNA binding factor	0.979	-472, -464 (+)	ttt <b>ACCC</b> gc
Activator of cytochrome C	0.763	-428, -414 (-)	cgggcaac <b>TCG</b> gaa
RDNA binding factor	0.860	-421, -413 (+)	gtt <b>GCCC</b> gg
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	0.993	-400, -349 (-)	<b>TATC</b> aac
Fungal GATA binding factors	0.895	-399, -389 (+)	tt <b>GATA</b> aacat
Yeast ABF factors	0.795	-395, -377 (+)	taa <b>acattgataACG</b> Tccc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	0.993	-390, -384 (-)	<b>TATC</b> aat
Fungal GATA binding factors	0.908	-389, -379 (+)	tt <b>GATA</b> acgtc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	0.993	-369, -363 (-)	<b>TATC</b> tca
Pleiotropic drug resistance responsive elements	0.941	-357, -349 (-)	<b>TCCG</b> gggag
Yeast GC-Box Proteins	0.844	-357, -341 (-)	gaagcatctcc <b>GGGG</b> ag
Pleiotropic drug resistance responsive elements	0.903	-356, -348 (+)	<b>TCCC</b> cggag
Yeast stress response elements	0.980	-340, -332 (-)	cc <b>AGGG</b> ggt
Aspergillus cell pattern formation	0.955	-309, -299 (-)	ggt <b>CGCG</b> tctt
Yeast Mlu I cell cycle box	0.840	-309, -299 (-)	ggt <b>CGCG</b> tctt
Yeast Mlu I cell cycle box	0.841	-308, -298 (+)	gga <b>CGCG</b> acct
Yeast MADS-Box factors	0.787	-218, -200 (-)	gcac <b>TCTA</b> atcatacatat
M-box interacting with Mat1-Mc	0.884	-19, -9 (-)	tga <b>ATTG</b> tcta

### 1.3.4. La proteína deducida

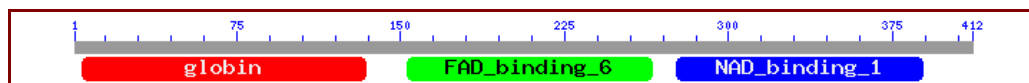
La proteína deducida del gen *Bcfhg1*, BcFHG1, tiene 412 aminoácidos, un peso molecular de 45578,7 y un punto isoeléctrico teórico de 5,34. En la tabla 3 se resume la composición de aminoácidos de la proteína BcFHG1. Esta proteína está registrada en la base de datos del Genbank con el número de acceso CAP74387.



**Tabla 3.** Contenido aminoacídico de BcFHG1.

Aminoácido	Sigla	Número	%	Aminoácido	Sigla	Número	%
Ala	A	38	9.2	Leu	L	34	8.3
Arg	R	15	3.6	Lys	K	22	5.3
Asn	N	20	4.9	Met	M	8	1.9
Asp	D	26	6.3	Phe	F	15	3.6
Cys	C	2	0.5	Pro	P	24	5.8
Gln	Q	22	5.3	Ser	S	26	6.3
Glu	E	23	5.6	Thr	T	20	4.9
Gly	G	24	5.8	Trp	W	4	1.0
His	H	10	2.4	Tyr	Y	16	3.9
Ile	I	26	6.3	Val	V	37	9.0

La proteína BcFHG1 tiene tres dominios funcionales identificados. Un dominio globina (globin) entre las posiciones de aminoácidos 4 y 134 con un E\_valor de  $5e-21$ , un dominio oxidoreductasa de unión de FAD (FAD\_binding\_6) entre las posiciones 153 y 265 con un E\_valor de  $8e-07$  y un dominio oxidoreductasa de unión de NAD (NAD\_binding\_1) entre las posiciones 276 y 386 con un E\_valor de  $2e-10$  (Fig. 26).

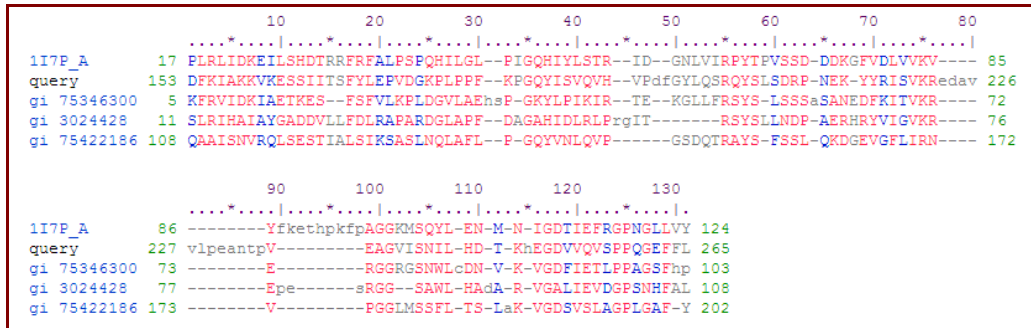
**Figura 26.** Dominios funcionales de BcFHG1.

Con el programa CDD del NCBI de identificación de dominios conservados, se puede observar la gran similitud de los dominios funcionales de la proteína flavohemoglobina de *B. cinerea* con dominios similares de las proteínas flavohemoglobinas de otros organismos (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Gráficamente se ve en las figuras 27, 28 y 29. Estos tres dominios se presentan en las proteínas tipo flavohemoglobinas, las cuales producen la detoxificación de NO.



**Figura 27.** Dominio globina (globin).

Los números de cada secuencia corresponden a dominios globina de los organismos: 1ASH *Ascaris suum*, query *Bcfhg1*, 1HDA\_A *Bos taurus*, gi5731771 *Drosophila melanogaster*, gi13810249 *Sabella spallanzanii*.



**Figura 28.** Dominio oxidoreductasa FAD (FAD\_binding\_6).

Los números de cada secuencia corresponden a dominios FAD\_binding\_6 de: 1I7P\_A *Rattus norvegicus*, query *Bcfhg1*, gi75346300 *Acinetobacter sp.*, gi3024428 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, gi75422186 *Pseudomonas putida*.



**Figura 29.** Dominio oxidoreductasa NAD (NAD\_binding\_1).

Los números de cada secuencia corresponden a dominios 1KRH\_B *Acinetobacter*, query *Bcfhg1*, gi126527 *Photobacterium leiognathi*, gi399486 *E. coli K2*, gi29611953 *Vibrio paraheomolyticus*.

Dado el nivel de homología con la flavohemoglobina de *E. coli*, cabe esperar que la arquitectura tridimensional de BcFHG1 sea similar (Ilari *et al.*, 2002). Respecto a la localización subcelular, dado el nivel de homología con la flavohemoglobina de *S. cerevisiae*, es probable que BcFHG1 esté localizada tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial (Cassanova *et al.*, 2005). No obstante, se realizó una predicción de la localización subcelular de BcFHG1 mediante el programa PSORT 6.4. La predicción realizada indicó una probabilidad de localizar la proteína en la membrana plasmática del 70 %, en la membrana del retículo endoplasmático del 20 % y en la membrana interna mitocondrial del 20 %.

#### 1.4. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE BCFHG1

BcFHG1 presenta una gran homología con flavohemoglobinas de otros hongos y bacterias. Estas proteínas presentan los mismos dominios proteicos estructurales que la flavohemoglobina de *B. cinerea*. A nivel de semejanza de secuencia de aminoácidos presenta un 73 % de identidad con la proteína de *A. niger*, 71 % con *A. fumigatus*, 67 % con *F. oxysporum*, 65 % con *C. neoformans* y 59 % con *E. coli*. El alineamiento de la flavohemoglobina de *B. cinerea* con las flavohemoglobinas de otros hongos, levaduras y bacterias está expresado en la figura 30. Esta figura fue realizada mediante la herramienta de multialienamiento del INRA, Multalin (Corpet, 1988).

El árbol filogenético de las proteínas flavohemoglobinas se realizó mediante el programa MEGA 3.1 a través de un bootstrap test mediante el método de Neighbor-Joining y la corrección de Poisson con ratios uniformes (Kumar *et al.*, 2004). La bootstrap se realizó con 1000 interacciones para calcular la fiabilidad del árbol. Las secuencias de aminoácidos utilizadas fueron tomadas del Genebank y de la base de datos de genomas fúngicos del Broad Institute. En el árbol filogenético de las flavohemoglobinas (Fig. 31) se aprecia que la secuencia del gen de la flavohemoglobina de *B. cinerea* se agrupa con las secuencias de otros hongos relacionados genéticamente según amplios estudios realizados con varios grupos de genes conservados (James *et al.*, 2006).

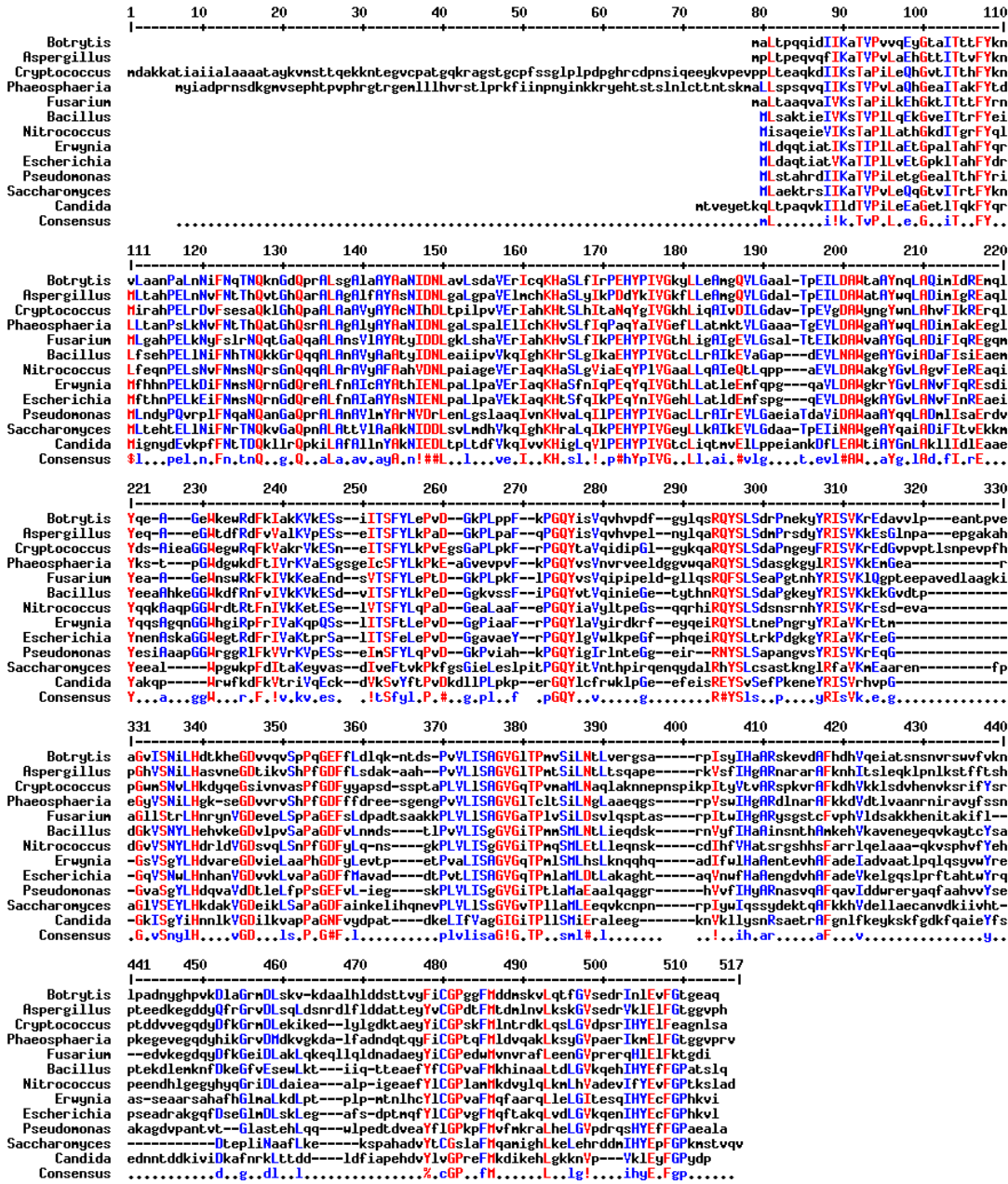
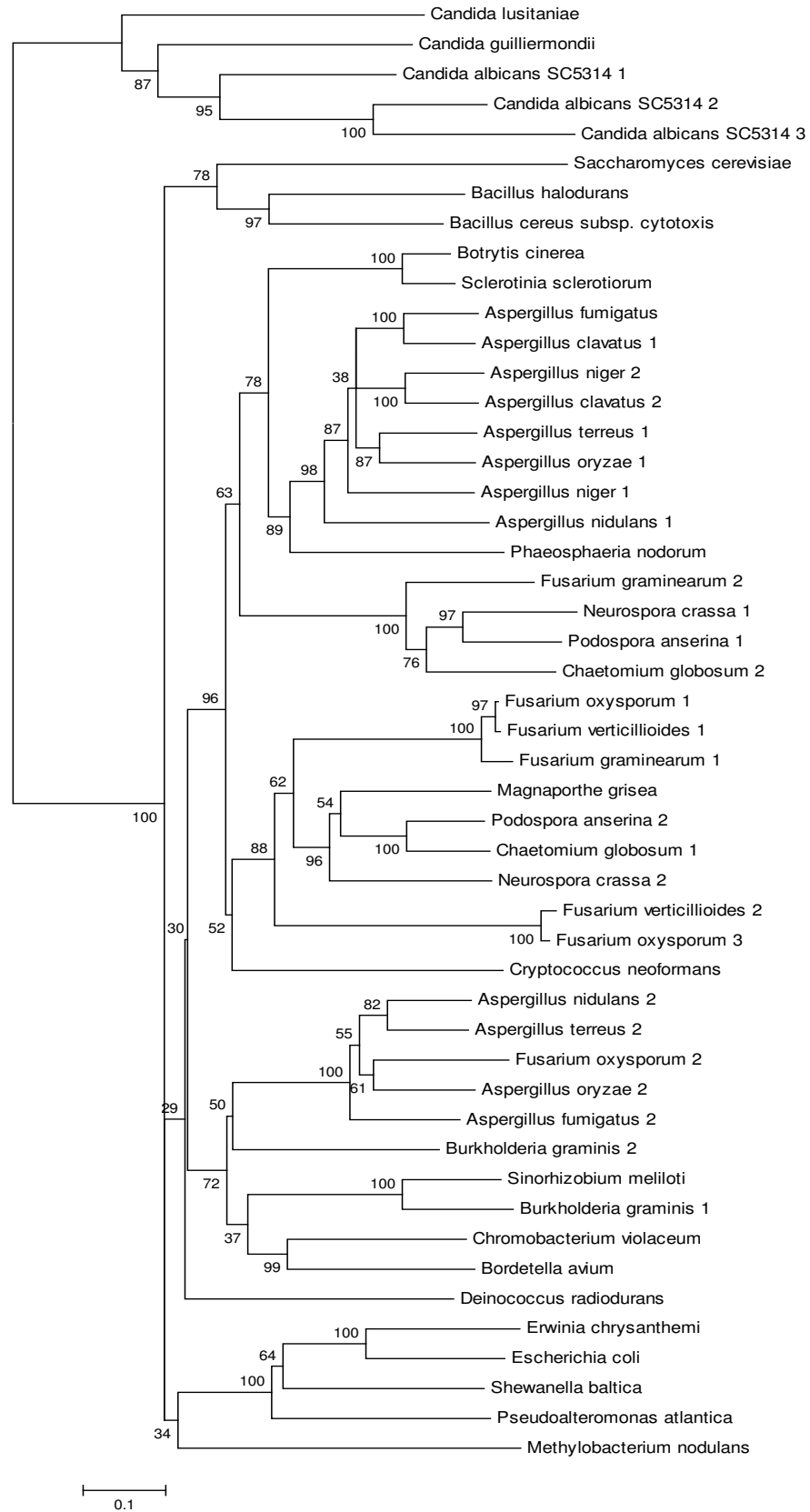


Figura 30. Alineamiento de las proteínas tipo flavohemoglobinas.

El color rojo representa más de un 90 % de consenso y el azul más de un 50 % de consenso en la secuencia de aminoácidos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas fueron: EDN61819 *S. cerevisiae*, XP\_711060 *C. albicans*, EAT86010 *Phaeosphaeria nodorum*, CAP74387 *B. cinerea*, BAA33011 *F. oxysporum*, XP\_746528 *A. fumigatus*, AAP41066 *C. neoformans*, ZP\_01127312 *Nitrococcus mobilis*, ZP\_00721718 *E. coli*, ZP\_00742333 *Bacillus thuringiensis*, Q47266 *E. chrysanthemi*, YP\_273509 *P. syringae*.



**Figura 31.** Árbol filogenético de las flavohemoglobinas.

Los números en los nudos indican el bootstrap que nos proporciona la fiabilidad de la intersección. La longitud de las ramas indican la distancia filogenética. Los números de acceso de las secuencias de proteínas utilizadas fueron: XP\_963988 *Neurospora crassa* 1, XP\_957939 *N. crassa* 2, XP\_664773 *A. nidulans* 1, XP\_661126 *A. nidulans* 2, EDN61819 *S. cerevisiae*, XP\_001588433 *S. sclerotiorum*, CLUG\_04007.1 *Candida lusitanae* (Broad Institute), XP\_001482036 *Candida guilliermondii*, EAT86010 *P. nodorum*, CAP74387 *B. cinerea*, BAA33011 *F. oxysporum*, FOXG\_15840.2 *F. oxysporum* (Broad Institute), FOXG\_17028.2 *F. oxysporum* (Broad Institute), XP\_746528 *A. fumigatus*, AAP41066 *C. neoformans*, XP\_369046 *M. grisea*, XP\_384634 *Fusarium graminearum* 1, XP\_380941 *F. graminearum* 2, FVEG\_1186.3 *Fusarium verticillioides* 1 (Broad Institute), FVEG\_13827.3 *F. verticillioides* 2 (Broad Institute), XP\_001400872.1 *A. niger* 1, XP\_001274889.1 *Aspergillus clavatus* 1, XP\_001211325.1 *A. terreus* 1, XP\_001825874.1 *A. oryzae* 1, XP\_001398637.1 *A. niger* 2, XP\_001268526.1 *A. clavatus* 2, XP\_001904160.1 *Podospora anserina* 2, XP\_001228021.1 *Chaetomium globosum* 1, XP\_001216520.1 *A. terreus* 2, XP\_001912543.1 *Podospora anserina* 1, ZP\_02882530.1 *Burkholderia graminis* 2, XP\_001727230.1 *A. oryzae* 2, EDP48702.1 *A. fumigatus* 2, XP\_001220963.1 *Chaetomium globosum* 2, NP\_285566.1 *Deinococcus radiodurans*, NP\_241924.1 *Bacillus halodurans*, AAP93662.1 *Sinorhizobium meliloti*, ZP\_01844296.1 *Shewanella baltica*, YP\_663028.1 *Pseudoalteromonas atlantica*, NP\_903158.1 *Chromobacterium violaceum*, YP\_001374491.1 *Bacillus cereus* subsp. *cytotoxis*, ZP\_02884306.1 *Burkholderia graminis* 1, YP\_786548.1 *Bordetella avium*, ZP\_02125379.1 *Methylobacterium nodulans*, orf19\_3707 *C. albicans* SC5314 1 (Broad Institute), orf19\_3710 *C. albicans* SC5314 2 (Broad Institute), orf19\_7637 *C. albicans* SC5314 3 (Broad Institute), P24232 *E. coli*, Q47266 *E. chrysanthemi*. En los microorganismos donde se ha indicado “Broad Institute”, el número de la secuencia es el correspondiente al indicado en la base de datos del genoma del citado organismo. La escala a la que se refiere la figura son sustituciones de aminoácidos por sitio.

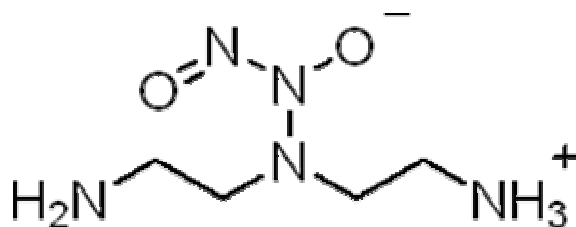
## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE *BCFHG1*

Las enzimas tipo flavohemoglobina están implicados en la detoxificación de NO. En distintos sistemas fúngicos y bacterianos la exposición a NO determina un aumento de la expresión del gen o genes codificadores de estas enzimas para contribuir a la defensa de la situación de estrés nitrosativo que la exposición a NO supone (Poole *et al.*, 1996; Sarver y DeRisi, 2005).

Decidimos analizar el posible papel de la exposición a NO sobre la expresión del gen *Bcfhg1* de *B. cinerea*. Debemos recordar que *B. cinerea* es un hongo necrotrofo que crece sobre tejido que experimenta una HR y que por lo tanto se desarrolla en un ambiente hostil expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO (Delledonne *et al.*, 2001). *B. cinerea* dispone de sistemas de detoxificación de las formas activas de oxígeno (Gilad *et al.*, 2000), incluidas las producidas durante la HR, pero no se dispone de información sobre los posibles mecanismos implicados en la detoxificación de NO de los que *B. cinerea* puede hacer uso. Para valorar esta situación decidimos establecer un sistema de exposición a NO en condiciones de cultivo *in vitro*. Haciendo uso de este sistema nos propusimos valorar el efecto sobre la expresión génica de *Bcfhg1* de distintas concentraciones de NO (siempre en un rango de concentraciones alrededor de la concentración fisiológica de NO que se produce durante la HR que desencadena la planta), concentraciones que se mantienen constantes haciendo uso de un donador de NO apropiado. Nos propusimos, además, valorar estos efectos sobre dos tipos de micelio: micelio joven, cultivado durante 4 horas en medio líquido (fase de germinación de las esporas), y micelio maduro, cultivado durante 12 horas en medio líquido (fase de ramificación de las hifas y de producción activa de micelio).

## 2.1. DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Como fuente de NO se utilizó el donador de óxido nítrico DETA/NO (Dietilenotriamina, Fig. 32). Su elección se realizó debido a que tiene una vida media de 20 horas a 37 °C en tampón fosfato pH 7,4 (Fitzhugh y Keefer, 2000), lo que proporciona una generación casi constante de NO durante los tiempos utilizados en la incubación de *B. cinerea*.



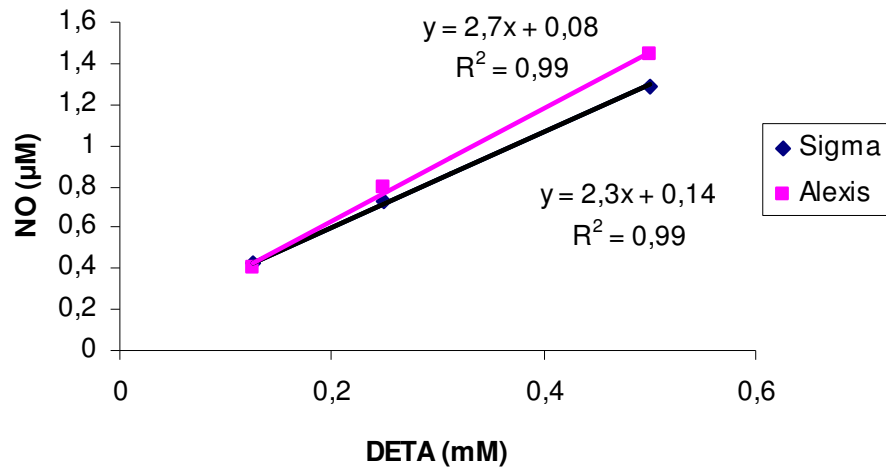
**Figura 32.** Molécula de DETA/NO, dietilenotriamina.

Los productos distribuidos por dos marcas comerciales, Sigma y Alexis, fueron utilizadas en este trabajo. Inicialmente se realizó una serie de experimentos para determinar la concentración real de NO que liberan al medio de cultivo ambos productos. Se pretendía elegir una de las dos marcas para su uso generalizado durante todos los experimentos, ya que, aunque las dos presentan una pureza similar mayor del 97 %, los precios resultan muy diferentes y, tal vez, podrían presentar grandes diferencias en la producción de NO. Las mediciones se realizaron mediante el electrodo de óxido nítrico con concentraciones de 0,125, 0,25 y 0,5 mM de DETA/NO. El DETA/NO se disolvió en agua antes de ser utilizado para obtener una concentración de trabajo de 50 mM. Previamente, el electrodo fue calibrado con una solución acuosa saturada en NO.

El DETA/NO de Sigma proporciona 1,29  $\mu\text{M}$  de NO con 0,5 mM DETA/NO, 0,73  $\mu\text{M}$  de NO con 0,25 mM DETA/NO y 0,42  $\mu\text{M}$  de NO con 0,125 mM DETA/NO. El DETA/NO de Alexis proporciona 1,44  $\mu\text{M}$  de NO con 0,5 mM DETA/NO, 0,81  $\mu\text{M}$  de NO con 0,25 mM DETA/NO y 0,40  $\mu\text{M}$  de NO con 0,125 mM DETA/NO. Gráficamente estos datos se presentan en la figura 33. La liberación de NO sigue una constante lineal según la concentración de DETA/NO con coeficientes de regresión altamente significativos ( $R^2 > 0,99$ ).



Determinando unos niveles de liberación de NO muy similares en ambos casos se eligió el DETA/NO comercializado por Sigma debido a su precio considerablemente inferior. Las concentraciones de DETA/NO utilizadas proporcionan las cantidades de NO de trabajo, ya que el óptimo de muerte celular en plantas inducida por NO es 1,2  $\mu\text{M}$  (Delledonne *et al.*, 2001).



**Figura 33.** Producción de NO por DETA/NO.

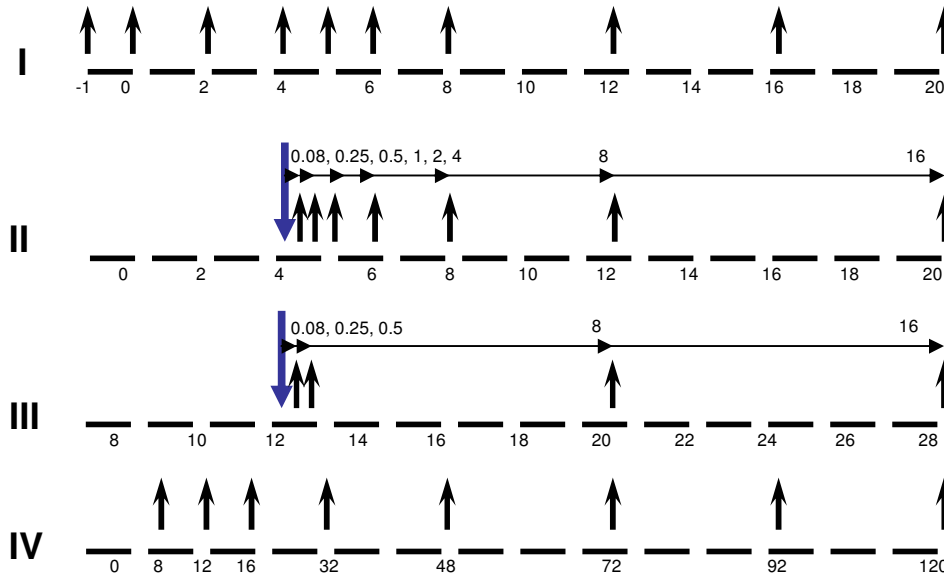
Las medidas se realizaron con un electrodo de óxido nítrico a una temperatura constante de 22° C y en medio de cultivo B5. Las ecuaciones al lado de la recta de regresión, representan los coeficientes que definen la producción de NO para cada marca de DETA/NO (Sigma o Alexis).

## 2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El análisis de la expresión de *Bcfhg1* se realizó mediante 4 experimentos cuyo diseño se presenta de manera simplificada en la figura 34. En todos se utilizaron esporas de *B. cinerea* estirpe B05.10 a una concentración de  $5 \times 10^5$  esporas por ml.

El experimento I analiza la expresión de *Bcfhg1* a lo largo del tiempo en un cultivo *in vitro* en medio B5 y en ausencia de NO exógeno (“time course”). Para cada tiempo analizado se dispuso de un matraz estriado donde se realizaba la incubación y, posteriormente, la muestra era separada del medio líquido mediante

centrifugación. Las muestras fueron extraídas de esporas en reposo, -1, al inicio de la incubación, 0, y a las 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 horas de incubación.



**Figura 34.** Diseño experimental del análisis de expresión.

Los números indican tiempo en horas. Las flechas apuntando a la parte superior indican extracción de micelio. Las flechas azules más grandes muestran el punto de inducción con el donador de NO DETA/NO. I- Análisis temporal de la expresión *in vitro*. II- Inducción de la expresión *in vitro* a partir de las 4 horas de incubación. III- Inducción de la expresión *in vitro* a partir de las 12 horas de incubación. IV- Análisis temporal de la expresión *in planta*.

El experimento II analiza la expresión de *Bcfhg1* a lo largo del tiempo de un cultivo *in vitro* en B5 sometido a la presencia de NO desde las 4 horas de incubación. Se tomaron muestras de micelio inmediatamente antes de la inducción por NO a las 4 horas de incubación de las esporas y a los siguientes tiempos después de añadir NO: 5 minutos (0.08), 15 minutos (0.25), 30 minutos (0.5), 1 horas (1), 2 horas (2), 4 horas (4) y 8 horas (8).

El experimento III analiza la expresión de *Bcfhg1* a lo largo del tiempo después de someter a un cultivo *in vitro* de B5 incubado por 12 horas a la exposición a NO. Se tomaron muestras inmediatamente antes de la inducción por NO a las 12 horas de incubación de las esporas y a los siguientes tiempos después de añadir NO: 5 minutos (0.08), 15 minutos (0.25), 30 minutos (0.5), 4 horas (4) y 8 horas (8).

El experimento IV analiza la expresión de *Bcfhg1 in planta* a lo largo del tiempo. Las infecciones se realizaron en hojas de tomate recogiendo muestras de

infección a los siguientes tiempos desde la inoculación: 8, 12, 16, 32, 48, 72, 92 y 120 h.p.i.

En todos los experimentos a partir de las muestras del material biológico recogido se extrajeron muestras de ARN total que fueron utilizadas en los correspondientes análisis de expresión, bien mediante análisis Northern, bien mediante PCR cuantitativa.

### **2.3. ANÁLISIS TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE *BCFHG1* DURANTE EL CRECIMIENTO SAPROFÍTICO (MEDIO LÍQUIDO)**

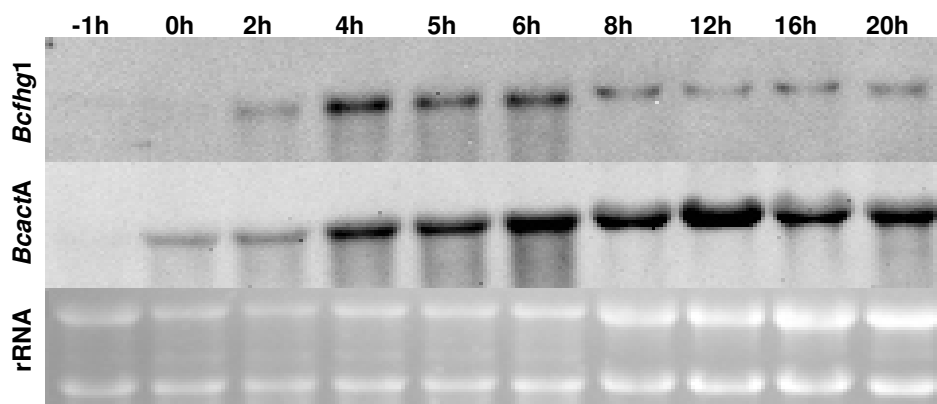
La expresión del gen *Bcfhg1* a lo largo del tiempo de incubación de conidios de *B. cinerea* B05.10 en medio B5, fue analizada mediante hibridaciones tipo Northern, pudiéndose observar los resultados obtenidos en la figura 35.

En todas las carreras del gel se intentó cargar la misma cantidad de ARN total (concentraciones estimadas con ayuda de un espectrofotómetro). Como control de uniformidad de carga en las distintas carreras se utilizó la intensidad de las bandas de rRNA 18S y 25S que se visualizan en el gel de agarosa previa tinción con bromuro de etidio. Para poder normalizar los valores de expresión del gen *Bcfhg1* en cada condición se utilizó la intensidad de la señal de hibridación obtenida con un gen de expresión constitutiva, el gen *BcactA* (Benito *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos en este experimento indican que la exposición del gen *BcactA* no es constitutivo a lo largo del tiempo, mostrando diferencias importantes en los niveles de expresión en las distintas fases de desarrollo. Como se aprecia en la figura 35, el gen *BcactA* no se expresa en esporas en estado de letargo (repose), y su expresión aumenta en las primeras fases de desarrollo, durante la activación y germinación de las esporas (desde las 0 hasta las 6 horas de cultivo en medio líquido). A partir de ese momento, cuando las esporas ya han germinado y los tubos germinativos crecen y se ramifican dando lugar a micelio cuyas hifas se ramifican y desarrollan activamente, la expresión del gen *BcactA* sí se mantiene constante y se puede considerar, por lo tanto, constitutiva. La expresión del gen *BcactA* es válida, entonces, para comparar niveles de expresión de genes en micelios

en la misma fase de desarrollo sometidos a distintas condiciones (por ejemplo ambientales o nutricionales) pero su utilidad es limitada si se comparan fases de desarrollo diferentes. En cualquier caso en nuestro trabajo, y junto con el análisis de la intensidad de las bandas de rRNA 18S y 25S detectadas en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, su utilización permite analizar la cinética de acumulación a lo largo del tiempo del mRNA derivado de la transcripción del gen *Bcfhg1*.

Las esporas en estado de letargo mostraron un nivel de expresión del gen por debajo del límite de detección de la hibridación por Northern. En las esporas al inicio de la incubación, que habían sido mantenidas durante una hora en medio B5 a temperatura ambiente y sin agitación, tampoco se detectó expresión de *Bcfhg1*. La expresión se empezó a detectar después de las 2 horas de incubación en agitación, incrementándose hasta alcanzar el máximo entre las 4 y 6 horas de incubación. Después de 8 horas de incubación los niveles de expresión se reducen de manera importante y permanecen constantes hasta las 20 horas de incubación (Fig. 35).



**Figura 35.** Análisis temporal de la expresión de *Bcfhg1* mediante Northern.

Los números indicados en la parte superior de la imagen indican los tiempos de incubación en horas. Los nombres situados a la izquierda reflejan los genes cuya expresión se analiza en cada caso (*Bcfhg1* y *BcactA*) y el gel de ARN total en el que se visualizan las bandas de rRNA 18S y 25 S.

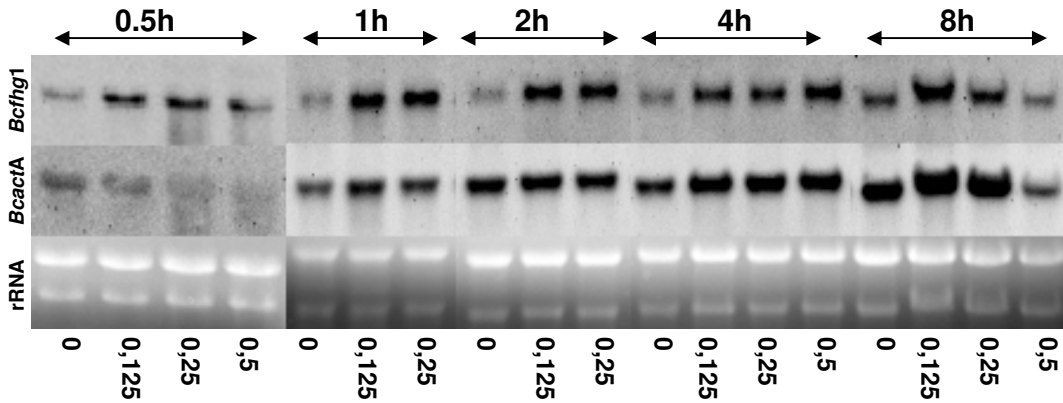
## **2.4. EXPRESIÓN *IN VITRO* A LO LARGO DEL TIEMPO EN MICELIO CULTIVADO DURANTE 4 HORAS ANTES DE LA EXPOSICIÓN A NO**

En cultivos de conidios de *B. cinerea* B05.10 incubados durante 4 horas en B5 se añadieron las concentraciones de DETA/NO 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM y el control sin el donador de NO. Seguidamente, los micelios fueron recogidos a diferentes tiempos después de añadir el donador de NO.

Los efectos de tres concentraciones diferentes de NO, 0, 0,125 y 0,25 mM de DETA/NO, fueron valoradas a todos los tiempos considerados: 0,5, 1, 2, 4, y 8 horas. A los tiempos 0, 4 y 8 horas se valoraron, además, los efectos de un nivel superior de NO, 0,5 mM de DETA/NO. El análisis tipo Northern que se puede observar en la figura 36, muestra que, aunque *Bcfhg1* es expresado en todos los tiempos considerados en ausencia de NO exógeno, la exposición a NO incrementa considerablemente la expresión. La inducción resultaba ya evidente a la media hora de exposición a NO y fue máxima transcurridas entre una y dos horas de exposición a NO con valores de expresión seis veces superiores a los observados en los controles incubados durante los mismos tiempos. A las 4 horas de exposición el nivel de expresión fue sólo el doble que en las muestras no expuestas y a las 8 horas la inducción es casi inapreciable. Por otra parte, cuando se compararon los niveles de inducción determinados por diferentes concentraciones de NO, se comprobó que la respuesta de inducción determinada por diferentes concentraciones de NO es muy similar en las tres condiciones probadas.

Al ser la respuesta a diferentes concentraciones de NO muy similar, se decidió investigar más en detalle la inducción temporal de la expresión utilizando una única concentración de NO, 0,25 mM de DETA/NO, e incluyendo tiempos más cortos y largos de exposición a NO. La figura 37, panel A, muestra que el incremento en la expresión de *Bcfhg1* ya es detectado transcurridos tan sólo 5 minutos de exposición a NO. La respuesta de inducción es, por tanto, muy rápida en términos de incremento de la expresión génica. Cuando el micelio fue expuesto a NO durante tiempos mayores, los niveles de expresión de *Bcfhg1* se redujeron a niveles similares a los observados en la ausencia de NO exógeno en los mismos tiempos de incubación. La expresión inducida por NO consigue su máximo a los 15 minutos

desde el inicio de la exposición (Fig. 37A) y ésta es mantenida durante una o dos horas (Fig. 36).



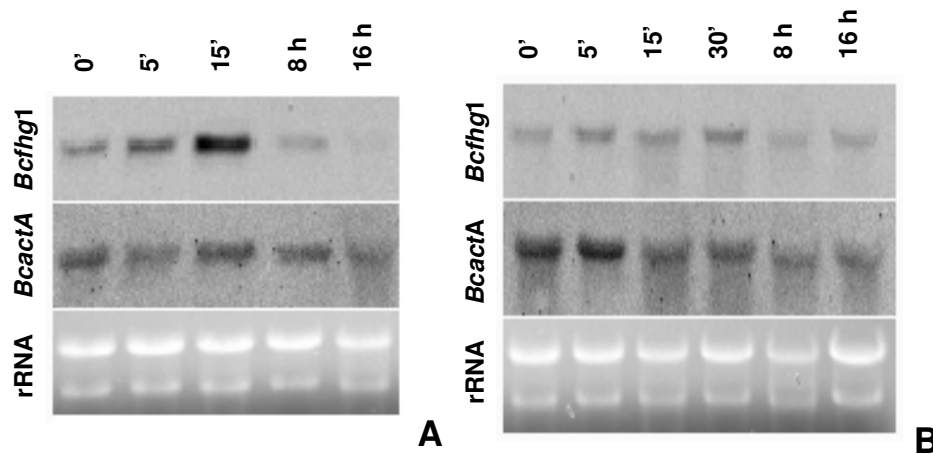
**Figura 36.** Efecto de la concentración de NO en la expresión de *Bcfhg1* a diferentes tiempos de exposición.

El NO fue añadido transcurridas 4 horas de incubación en forma del donador DETA/NO. En la parte superior de la imagen se muestran las horas de incubación transcurridas después de la inducción con NO y en la parte inferior la cantidad de donador añadida en mM. En la parte izquierda se presentan los nombres de los genes cuya expresión se analiza en cada caso. El panel inferior corresponde a los geles de ARN total transferidos en los que se visualizan las bandas de rRNA 18S y 25S.

## 2.5. EXPRESIÓN *IN VITRO* A LO LARGO DEL TIEMPO EN MICELIO CULTIVADO DURANTE 12 HORAS ANTES DE LA EXPOSICIÓN A NO.

El micelio muy joven de *B. cinerea* (esporas cultivadas durante 4 horas en medio líquido) resulta ser sensible a la exposición a NO en términos de inducción de la expresión de *Bcfhg1*. Para determinar si también es sensible el micelio del hongo en una fase de desarrollo más tardía (micelio más maduro) decidimos llevar a cabo un experimento de exposición a NO con 0,25 mM de DETA/NO, utilizando micelio cultivado durante 12 horas en medio de cultivo líquido mínimo B5, momento en el que el micelio está creciendo activamente y las hifas ramificándose con profusión. Realizada la exposición se tomaron muestras de micelio para llevar a cabo el análisis de expresión a los mismos tiempos que en el experimento anterior. Como se aprecia

en la figura 37, panel B, la respuesta de inducción de la expresión de *Bcfhg1* en estas condiciones es mínima.



**Figura 37.** Efecto sobre la expresión de *Bcfhg1* a lo largo del tiempo de 0,25 mM DETA/NO añadido a un cultivo de esporas de *B. cinerea* precultivado durante 4 horas (panel A) y 12 horas (panel B) antes de la exposición NO.

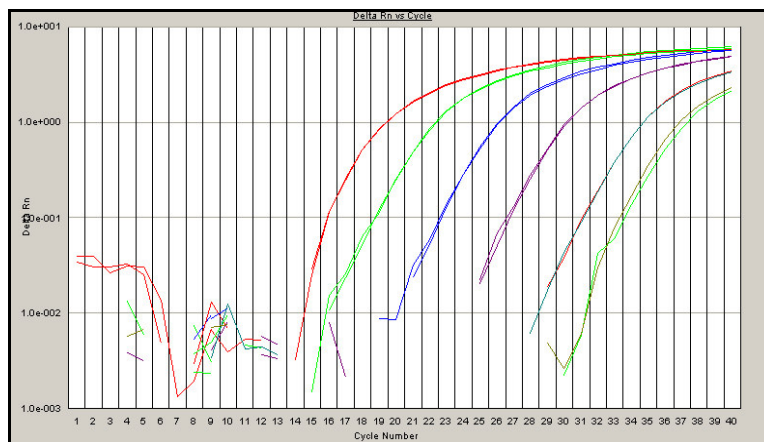
## 2.7. ANÁLISIS TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE *BCFHG1* DURANTE LA INTERACCIÓN *B. CINEREA* - TOMATE.

Para analizar la expresión del gen *Bcfhg1* durante la interacción de *B. cinerea* con su planta huésped decidimos llevar a cabo una inoculación en condiciones controladas de laboratorio sobre hojas de tomate siguiendo los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Una vez inoculadas se recogieron muestras de material infectado a distintos tiempos desde el momento de la inoculación (8, 12, 16, 32, 48, 72, 92 y 120 h.p.i.) para realizar las correspondientes extracciones de ARN total. Con estas muestras se llevó a cabo un análisis de expresión de tipo Northern incluyendo una muestra de ARN total derivada de micelio cultivado en medio mínimo líquido B5 durante 5 horas. En las hibridaciones llevadas a cabo no se detectó señal de hibridación con el gen *Bcfhg1* en las muestras derivadas de material vegetal infectado con *B. cinerea*. Estas observaciones sugieren que los niveles de expresión de *Bcfhg1* *in planta* a los tiempos considerados están por debajo del límite de detección mediante hibridación tipo Northern. Por esta razón, decidimos llevar a cabo el análisis de expresión *in planta* de *Bcfhg1* mediante

PCR a tiempo real, ya que presenta una mayor sensibilidad para la detección de mRNA que las hibridaciones tipo northern.

En un primer experimento se determinó el rango dinámico de concentraciones de trabajo y la precisión y eficiencia de la reacción. De este modo, el rango dinámico de concentraciones de trabajo fue 100 ng usándose en la práctica una dilución 1:10 del stock original de cDNA. La recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de ADN genómico tenía una alta precisión con valores de  $R^2$  de 0,9968 para el gen *BcactA* y 0,9982 para el gen *Bcfhg1*. La pendiente de las rectas patrón o curva estándar (E), que mide la eficiencia de la reacción, fue de -3,431 para *BcactA* y de -3,675 para el *Bcfhg1*. Teniendo en cuenta que una pendiente del -3,32 representa una eficiencia del 100 %, las muestras tuvieron una alta eficiencia.

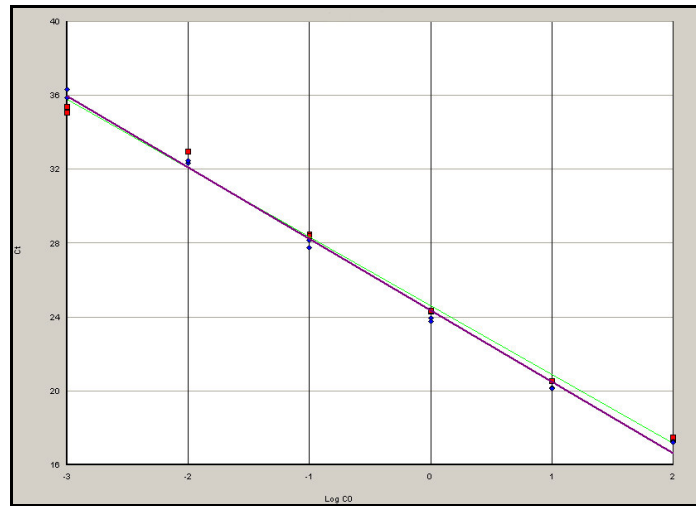
En un segundo experimento se analizó la expresión *in planta* de *Bcfhg1* a diferentes h.p.i. Se obtuvo un Ct de cada una de las reacciones de la PCR cuantitativa que se contrastó con la recta patrón obtenida en el mismo experimento para obtener así la concentración de mRNA presente en cada muestra (Fig. 38 y 39). Se realizaron las amplificaciones pertinentes como se aprecia en las figuras 40 y 41. Se calcularon para cada muestra sus respectivas medias y desviaciones estándar resultado de las repeticiones realizadas. Posteriormente, se hicieron los cálculos oportunos para la normalización de las medias y desviaciones estándar de la expresión *in planta*. En la tabla 4 se pueden apreciar los resultados de expresión obtenidos para *BcactA*, *Bcfhg1* y *Bcfhg1* normalizado con su correspondiente desviación estándar normalizada.



**Figura 38.** Representación del numero de ciclos respecto a la fluorescencia emitida para la recta patrón utilizada en el cálculo de la concentración del mRNA de *Bcfhg1*.

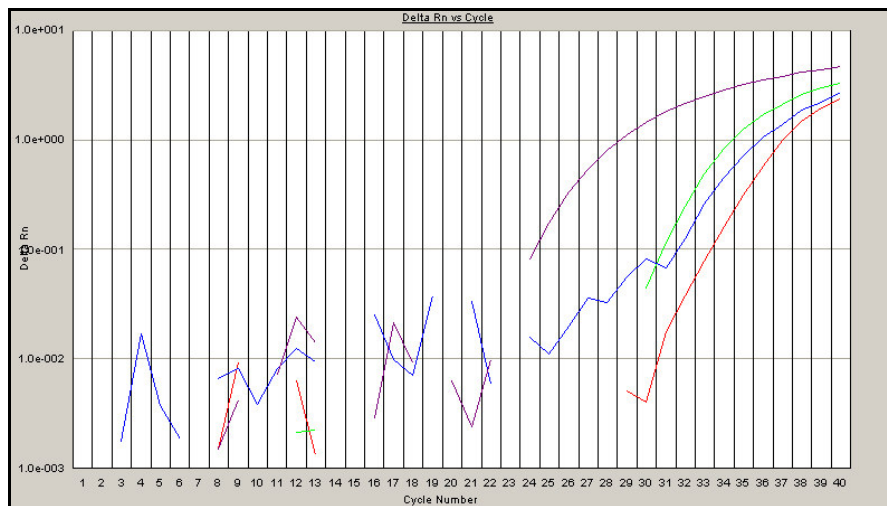
En el gráfico se representan las repeticiones realizadas para concentraciones de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 ng de gDNA.





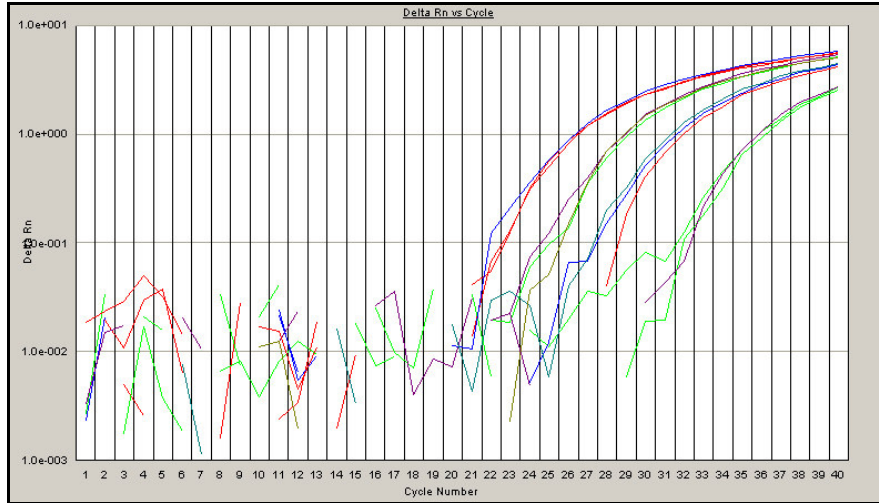
**Figura 39.** Rectas patrón utilizadas en el cálculo de la concentración de los mRNA de *Bcfhg1* y *BcactA*.

En verde se aprecia la recta para *Bcfhg1* y en morado para *BcactA*. El umbral utilizado fue de 0,320981 DeltaRn.



**Figura 40.** Representación del número de ciclos respecto a la fluorescencia emitida para 8 y 96 h.p.i.

La curva en rojo representa a *Bcfhg1* para 8 h.p.i., la curva en verde representa a *BcactA* para 8 h.p.i., la curva en azul representa a la *Bcfhg1* para 96 h.p.i. y la curva morada representa a *BcactA* para 96 h.p.i.



**Figura 41.** Representación del numero de ciclos respecto a la fluorescencia emitida para *BcactA* a 8, 12 y 16 h.p.i. y 5 horas *in vitro*.

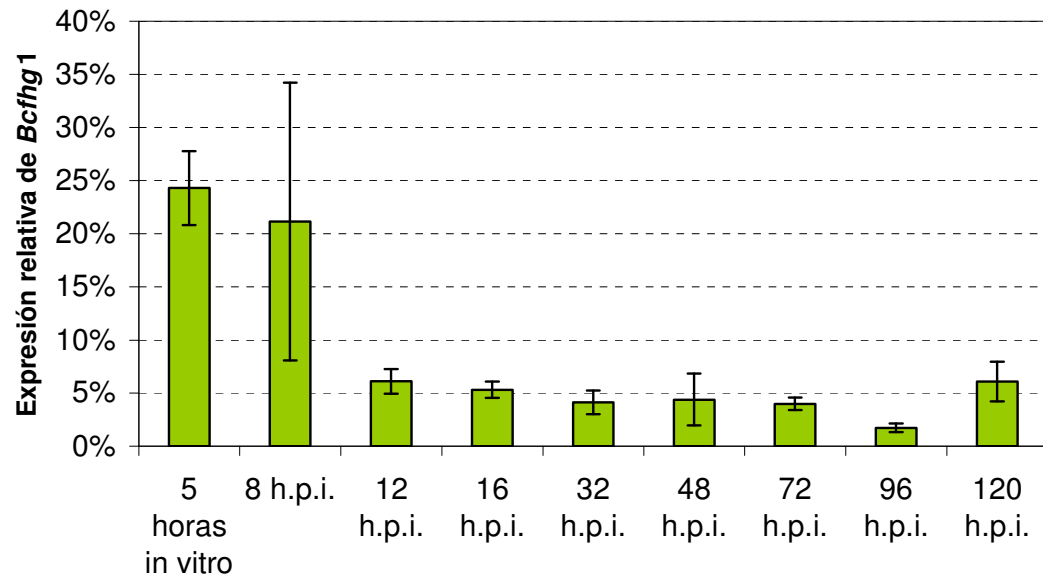
El primer conjunto de curvas por la derecha representa a 8 h.p.i., después vendrían 12 h.p.i., 16 h.p.i. y 5 horas *in vitro*, respectivamente.

**Tabla 4.** Media de la expresión de *BcactA*, *Bcfhg1* y la *Bcfhg1* normalizada con su correspondiente desviación estándar.

Muestra	Media Qty <i>Bcfhg1</i> (ng)	Media Qty <i>BcactA</i> (ng)	Media <i>Bcfhg1</i> normalizada	Desviación estándar <i>Bcfhg1</i> normalizada
5h in vitro	3,11E-01	1,28	2,43E-01	3,48E-02
8 h.p.i.	8,60E-04	4,07E-03	2,11E-01	1,31E-01
12 h.p.i.	3,27E-03	5,35E-02	6,11E-02	1,17E-02
16 h.p.i.	1,30E-02	2,44E-01	5,33E-02	7,61E-03
32 h.p.i.	2,63E-03	6,38E-02	4,12E-02	1,10E-02
48 h.p.i.	1,28E-03	2,91E-02	4,40E-02	2,44E-02
72 h.p.i.	2,65E-03	6,63E-02	4,00E-02	5,86E-03
96 h.p.i.	6,31E-03	3,64E-01	1,73E-02	4,15E-03
120 h.p.i.	2,09E-02	3,44E-01	6,08E-02	1,86E-02

Es interesante destacar que los niveles de expresión relativa de *Bcfhg1* *in planta* a las 8 h.p.i. son similares a los observados durante el crecimiento saprofito a las 5 horas de cultivo *in vitro* (Fig. 42). Los valores de desviación estándar son más altos en la muestra tomada a las 8 h.p.i. probablemente como reflejo de la mayor dificultad analítica para obtener datos precisos utilizando esta muestra, ya que presenta una menor cantidad de ARN total del hongo respecto al ARN total. En cualquier caso, disponiendo de los valores de expresión *in vitro* a las 5 horas

podemos establecer una comparación entre los niveles de expresión *in vitro* e *in planta*. Este análisis comparativo indica que el patrón de expresión *in planta* (Fig. 42) es similar al patrón de expresión *in vitro* cuando se expone micelio joven (esporas iniciando el proceso de germinación) a NO; los niveles de expresión son elevados en las fases iniciales en ambas situaciones, reduciéndose en fases posteriores a niveles de 4 a 6 veces inferiores.



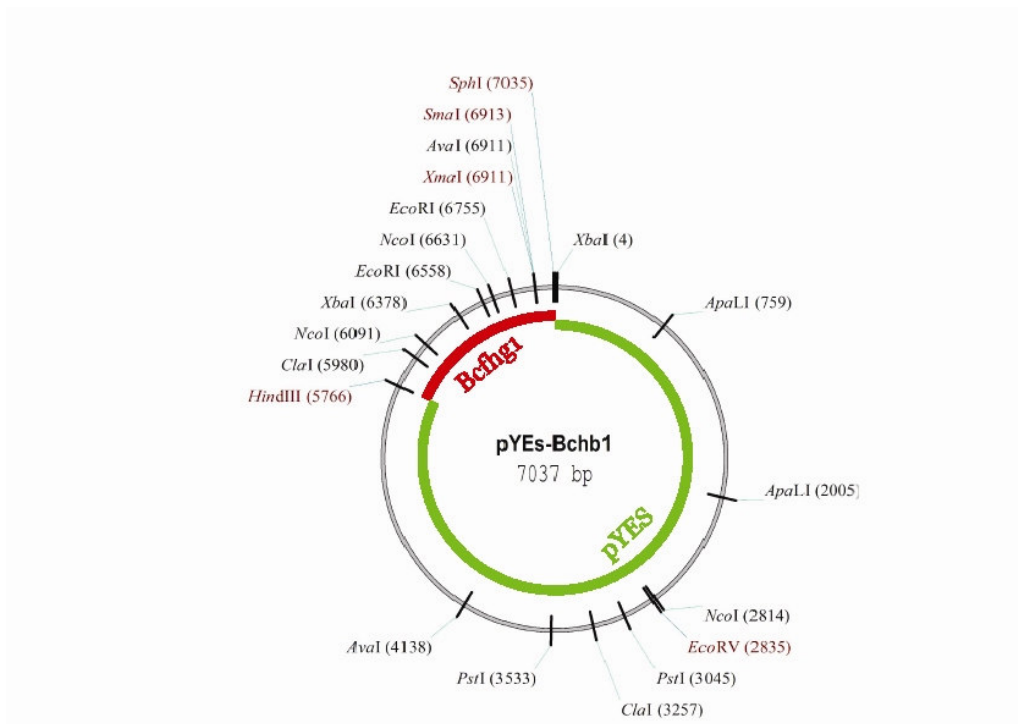
**Figura 42.** Expresión *in planta* de *Bcfhg1* obtenida mediante PCR cuantitativa.

Las medias y las desviaciones estándar representadas están normalizadas con la expresión de *BcactA*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar normalizada.

### **3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *BCFHG1* MEDIANTE EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *S. CEREVISIAE***

La secuencia de nucleótidos del gen *Bcfhg1* y la secuencia de aminoácidos deducida presentan una homología muy elevada con las secuencias de los genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina previamente descritos y con las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas. Este criterio, por sí sólo, ofrece un nivel de confianza muy importante para proponer que la proteína BcFHG1 codifica una proteína flavohemoglobina de *B. cinerea* cuya función debe ser la degradación de NO. Para obtener evidencias bioquímicas y genéticas directas de la naturaleza y función de BcFHG1 decidimos expresar el gen *Bcfhg1* en un sistema heterólogo perfectamente caracterizado, el mutante *yhb1* de *S. cerevisiae*, deficiente en el gen codificador de la enzima flavohemoglobina de este organismo y, por lo tanto, incapaz de detoxificar NO (Liu *et al.*, 2000), tratando de complementar la mutación y restaurando el fenotipo silvestre.

Con este objeto se clonó un fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* de 1.271 pares de nucleótidos que incluye la región estructural del gen *Bcfhg1* en el plásmido pYES, dando lugar al plásmido pYES-Bchb1 (Fig. 43). El plásmido pYES está diseñado para expresar genes de cualquier origen de manera inducible en *S. cerevisiae*. Para ello, el fragmento de ADN de interés se clona en el polilinker incluido a tal efecto entre el promotor GAL1 de *S. cerevisiae* y la región terminadora del gen citocromo C1 de *S. cerevisiae* (*cyc1tt*) (Fig. 15). Con esta construcción se puede controlar la expresión del gen clonado: su expresión se mantiene reprimida en presencia de glucosa en el medio de cultivo y se puede inducir mediante la eliminación de la glucosa del medio de cultivo y la adición de galactosa.

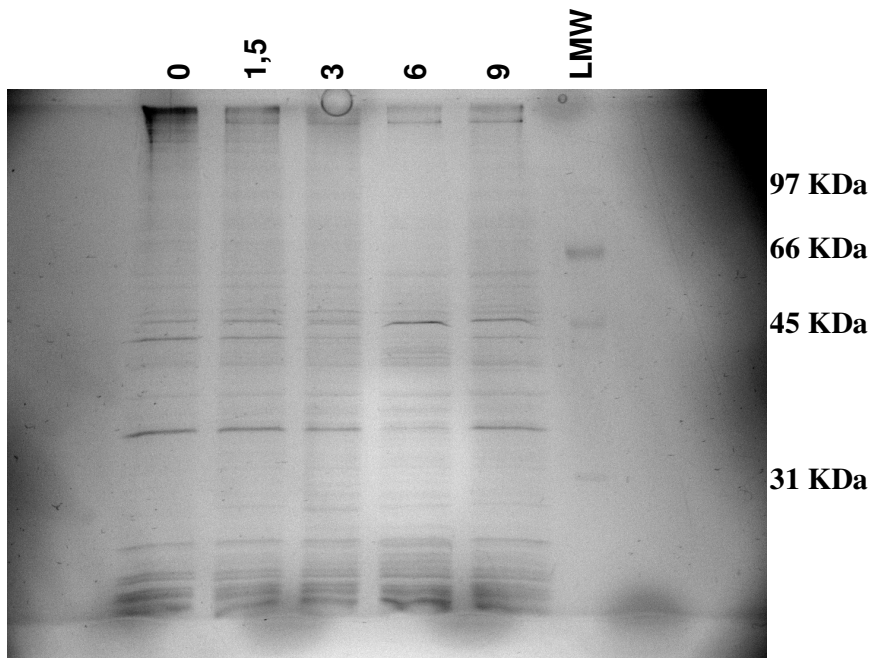


**Figura 43.** Vector de expresión inducible del gen *Bchfg1* en *S. cerevisiae*, pYES-Bchb1.

El fragmento de ADN genómico de *B. cinerea* clonado en pYES-Bchb1 fue amplificado utilizando los oligonucleótidos Bchb1F y Bchb1R. Las secuencias correspondientes se presentan en la Tabla 1. El oligonucleótido Bchb1F corresponde a la secuencia AAGCTTAAGATGGCACTCACACC y ha sido diseñado para incluir una diana de restricción para la enzima *HindIII* en el extremo correspondiente al extremo 5' de la región codificante del gen (la secuencia GATCTT ha sido modificada dando lugar a la secuencia AAGCTT). El oligonucleótido Bchb1R corresponde a la secuencia GCATGCATTACGACGAACACC y ha sido diseñado para generar un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *SphI* en el extremo 3' de la región codificante del gen (la secuencia TCATGC ha sido modificada dando lugar a la secuencia GCATGC). El fragmento amplificado con estos dos oligonucleótidos tiene 1.271 pares de nucleótidos e incluye, además de la región codificante completa, 9 pares de nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación del gen y 23 pares de nucleótidos aguas abajo del codón de terminación del gen, y puede ser clonado de manera dirigida bajo el control del promotor GAL1 en el polilinker del plásmido pYES.

El plásmido pYES-Bchb1 fue introducido en la cepa mutante yhb1 de *S. cerevisiae* mediante transformación. Se seleccionaron varios transformantes en los que se comprobó mediante PCR la presencia del gen *Bcfhg1* y finalmente se seleccionó un transformante (yhb1(pYES-Bchg1)) para todos los experimentos posteriores de complementación heteróloga.

Para llevar a cabo los análisis bioquímicos de la cepa de *S. cerevisiae* yhb1(pYES-Bchg1), ésta fue inoculada y cultivada en condiciones que permitieran la expresión del gen *Bcfhg1*. Para ello fue incubada durante 0, 1.5, 3, 6 y 9 horas en medio con galactosa. Se extrajeron lisados de proteínas y con ellos se corrió un gel SDS-PAGE con muestras a diferentes tiempos de inducción (Fig. 44). Interesantemente, a las 6 horas se apreciaba un cambio en los patrones de bandas alrededor de los 45 KDa que es el tamaño esperado de BcFHG1. Por este motivo, se eligió realizar la inducción por galactosa del gen *Bcfhg1* durante 6 horas para el análisis del fenotipo producido en relación con la degradación de NO.



**Figura 44.** SDS-PAGE gel de la inducción por galactosa de pYES-Bchb1 en *S. cerevisiae*.

Los números encima de cada carrera indican el tiempo en horas durante el que se ha inducido la expresión de la proteína recombinante. LMW es el marcador de proteínas de bajo peso molecular cuyo tamaño se indica a la derecha de la figura.

El análisis de la degradación de NO de cultivos de células donde se ha inducido la expresión de la proteína recombinante de *Bcfhg1* en el mutante de la flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (6 horas inducción yhb1(pYES-Bchb1)), mostraba la recuperación del fenotipo silvestre en estos cultivos al restaurar la capacidad de degradar enzimáticamente NO, ya que la curva correspondiente tiene una pendiente mayor que los controles negativos y una pendiente similar al control positivo. Como control positivo se utilizó el tipo silvestre de *S. cerevisiae*, BY4743, el cual permite valorar la capacidad natural de degradación enzimática de NO de la levadura. Como controles negativos se incluyeron el medio de cultivo sin células (Sin Levadura), el mutante yhb1 (yhb1) y el mutante con el vector de expresión sin inducirse (Sin Inducción yhb1 (pYES-Bchb1)). Los experimentos se realizaron con un electrodo de NO y las curvas de degradación de NO se observan en la figura 45. Para cada muestra se midió la degradación de 2  $\mu$ M de NO saturado en agua.

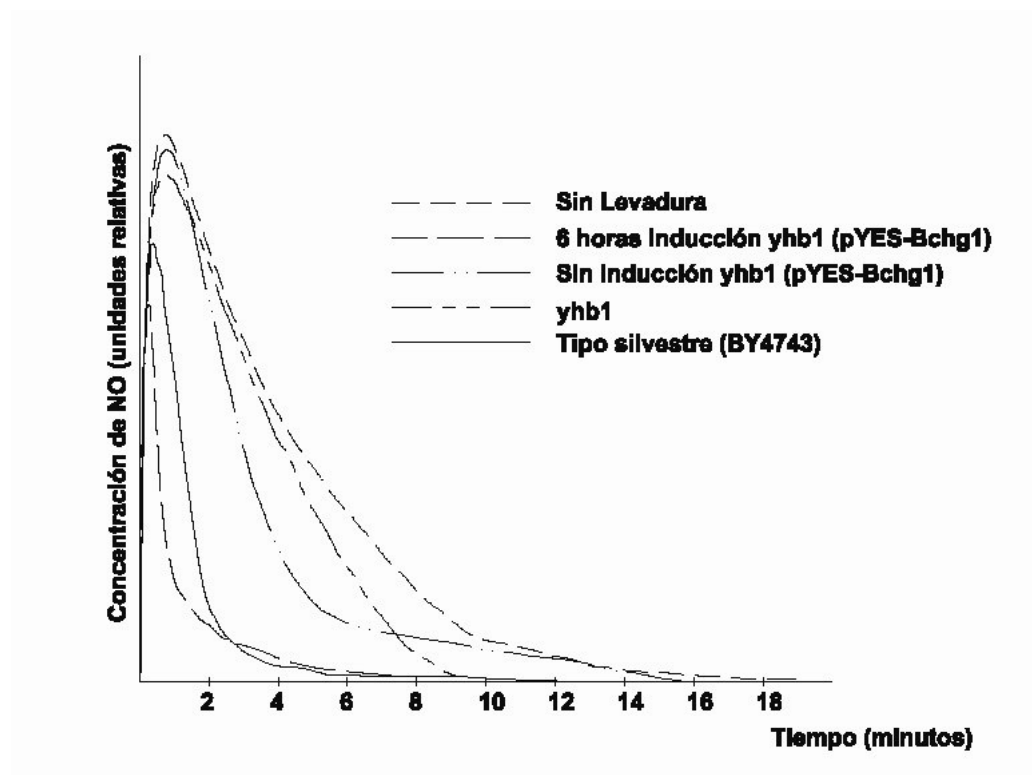
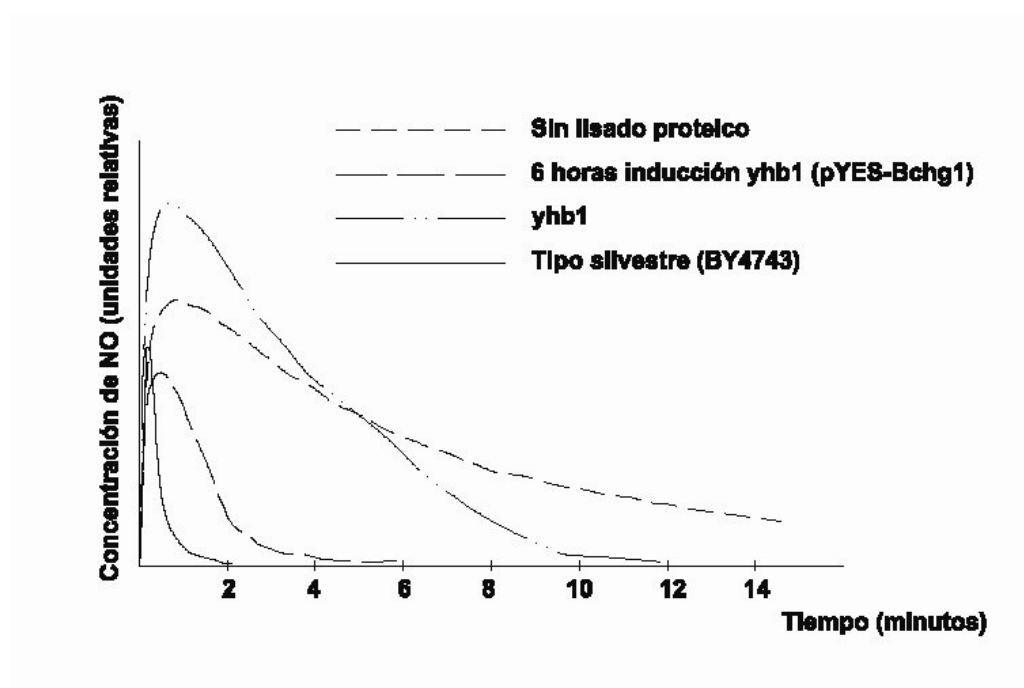


Figura 45. Curvas de degradación de NO de cultivos de *S. cerevisiae*.

El análisis de la degradación de 2  $\mu\text{M}$  de NO disuelto en agua por la proteína recombinante de *Bcfhg1* se realizó a su vez en lisados proteicos en PBS a los que se añadieron 250  $\mu\text{M}$  de NADH. La proteína recombinante mostró el fenotipo de degradación de NO y determinó la recuperación del fenotipo silvestre por parte del mutante de la flavohemoglobina (*yhb1*). Como control positivo se utilizaron los lisados proteicos del tipo silvestre de *S. cerevisiae*, BY4743, que mostraban la degradación enzimática de NO. Como controles negativos se incluyeron el medio de cultivo sin células y el mutante *yhb1*. Los experimentos se realizaron con un electrodo de NO y las curvas de degradación de NO se observan en la figura 46.



**Figura 46.** Curvas de degradación de NO de lisados proteicos de *S. cerevisiae*.



## **4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE BCFHG1 EN B. CINEREA**

### **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los experimentos de expresión heteróloga de *Bcfhg1* en la cepa mutante *yhb1* de *S. cerevisiae* demuestran que la proteína BcFHG1 detoxifica NO. Para estudiar y caracterizar la función o funciones que la proteína pueda desempeñar en la fisiología de *B. cinerea*, en particular en relación con la capacidad para infectar a la planta huésped, decidimos aplicar una estrategia basada en la obtención y caracterización de mutantes de *B. cinerea* deficientes en el gen *Bcfhg1*. Para ello se diseñó una estrategia de reemplazamiento en la que la copia genómica del alelo tipo silvestre del gen *Bcfhg1* es reemplazada por una copia de un alelo mutante en la que la región codificante del gen 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 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 regiones flanqueantes 5' y 3' tipo silvestre del gen *Bcfhg1*. Posteriormente esta construcción se introduce en *B. cinerea* mediante transformación y entre los transformantes producidos se buscan aquellos 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 detallada en comparación con la cepa silvestre utilizando las condiciones adecuadas.

### **4.2. CONSTRUCCIÓN DE TRANSFORMACIÓN**

Para la construcción del vector de transformación en primer lugar se amplificaron mediante PCR las regiones flanqueantes homólogas del fragmento a reemplazar. Los primers FHP1 y FHP2 se utilizaron para amplificar la región promotora de *Bcfhg1*, originándose un fragmento de 1.815 pares de nucleótidos. Los

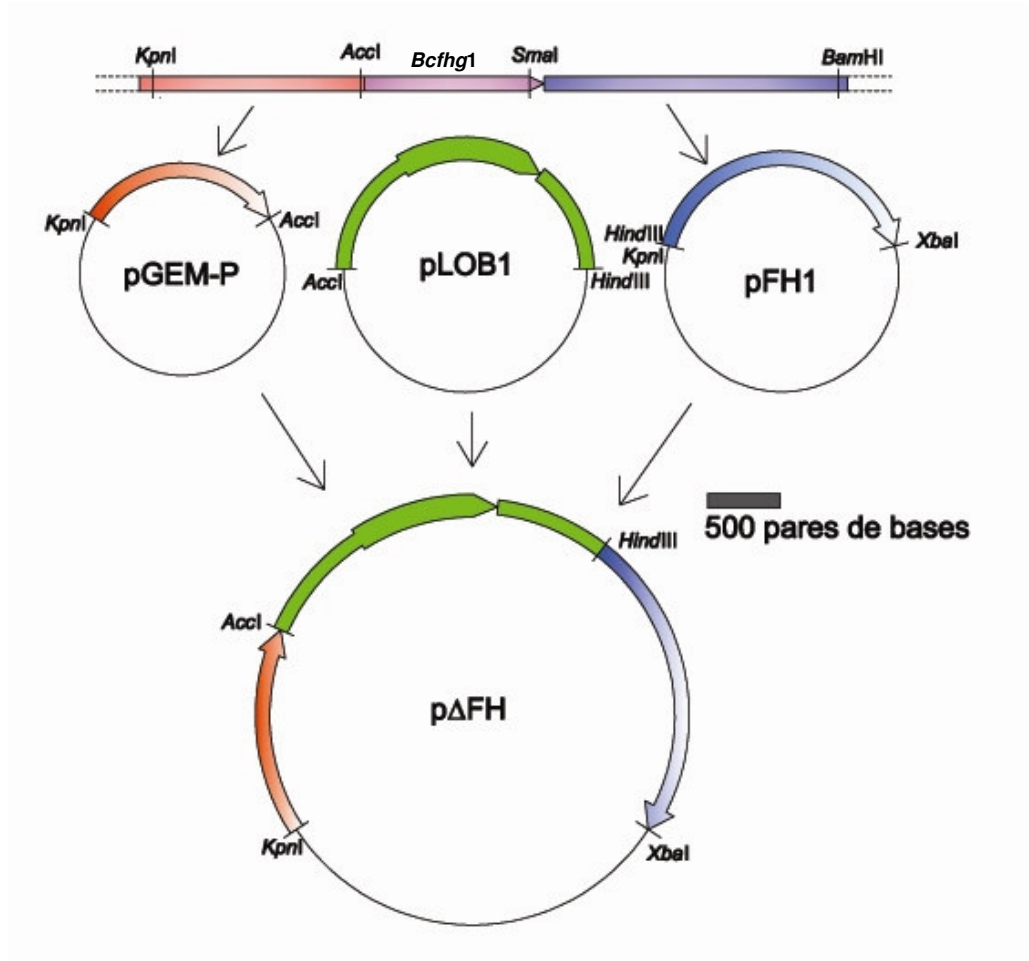
primers FHT1 y FHT2 se utilizaron para amplificar la región terminadora de *Bcfhg1* originándose un fragmento de 2.258 pares de bases. Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy.

El fragmento de la región terminadora clonado en pGEM-T-Easy se digirió con las enzimas de restricción *SmaI* y *BamHI* y se purificó un fragmento de 2.129 pares de bases. En paralelo el vector pBlueScript SK se digirió con *EcoRV* y *BamHI*. Los dos fragmentos obtenidos se ligaron generándose el plásmido pFH1 de 5.068 pares de bases. El plásmido pFH1 se digirió con *HindIII* y *KpnI* y se purificó un fragmento de 5.036 pares de bases.

El plásmido pLOB1 de 5.289 pares de bases, el cual contiene el casete que proporciona resistencia a la higromicina (número de acceso Genbank AJ439603 (Kars *et al.*, 2005a)), se digirió con *AccI* y *HindIII*. Un fragmento de 2.620 pares de bases, el cual contenía el casete de higromicina, se purificó para posteriores ligaciones.

El fragmento de la región promotora clonado en pGEM-T-Easy se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *AccI* y se purificó un fragmento de 1.439 pares de bases.

El vector de transformación, p $\Delta$ FH, se obtuvo al realizar la ligación de los tres fragmentos purificados, fragmento promotor de 1.439 pares de nucleótidos, fragmento casete higromicina de 2.620 pares de nucleótidos y fragmento terminador con vector pBluescript KS de 5.036 pares de nucleótidos. El plásmido resultante tiene un tamaño de 9.095 pares de nucleótidos. Un esquema de la estrategia de clonaje seguida se puede ver en la figura 47. Se purificó ADN del plásmido p $\Delta$ FH a gran escala y se digirió con *XbaI* para linealizar el plásmido. Las transformaciones se llevaron a cabo con el plásmido linealizado.



**Figura 47.** Esquema de la estrategia de construcción del plásmido pΔFH utilizado en los experimentos de transformación para generar mutantes  $\Delta Bcfhg1$ .

La figura está dibujada a la escala indicada usando como unidad nucleótidos de ADN.

### 4.3. TRANSFORMACIÓN DE *B. CINEREA* B05.10 CON pΔFH.

Se llevaron a cabo en paralelo dos transformaciones de protoplastos de la cepa silvestre B05.10 de *B. cinerea* con el plásmido pΔFH y una transformación control sin añadir ADN. Después de dos días en incubación con higromicina se rescataron transformantes de las placas de transformación que fueron transferidos a placas de MEA 70  $\mu\text{g/ml}$  higromicina. Algunos transformantes resultaron ser falsos positivos ya que fueron incapaces de desarrollarse en el medio selectivo y se

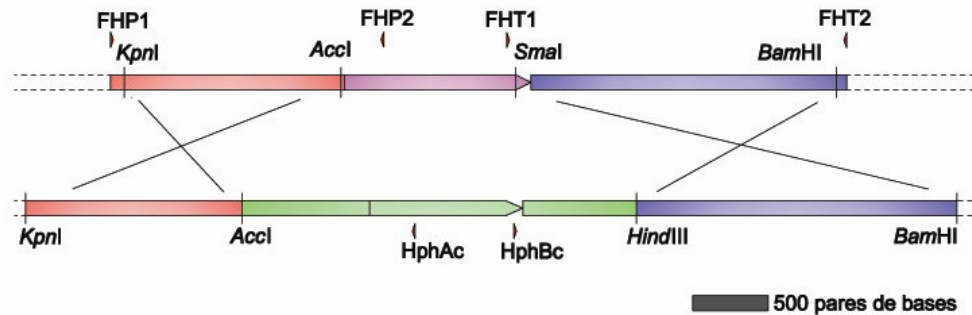
desecharon. Se seleccionaron finalmente 100 transformantes individuales para purificar y analizar. Las placas se dejaron incubar hasta que el micelio alcanzó el borde de la placa Petri. Se transfirieron entonces pequeños bloques de agar del borde de la colonia en crecimiento a una nueva placa de medio selectivo. Debido a la naturaleza multinuclear de *B. cinerea* se realizaron réplicas sucesivas (4-6) para enriquecer las hifas con núcleos transformados. Finalmente, se extrajo DNA del micelio aéreo desarrollado en placa para su análisis y selección.

#### **4.4. ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS TRANSFORMANTES DE *B. CINEREA* B05.10 OBTENIDOS CON pΔFH E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES Δ*BCFHG1*.**

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 *Bcfhg1* y que, en la medida de lo posible, no presentaron, además, núcleos portadores del alelo silvestre del gen *Bcfhg1* (Fig. 48). Serán estas cepas las que consideremos cepas mutantes Δ*Bcfhg1* y las que utilizaremos en todos los análisis posteriores.

Con este objeto se extrajo ADN genómico de cada cepa transformante purificada haciendo uso de un método de extracción rápida de ADN genómico a partir de micelio aéreo recogido directamente de la superficie de la placa de cultivo. A continuación se trató de amplificar 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. Los oligonucleótidos utilizados en este caso fueron el oligo FHP1, localizado inmediatamente aguas arriba del sitio *KpnI* del extremo 5' del fragmento flanqueante clonado en pGEM-P y cuya secuencia de anillamiento no se encuentra, por lo tanto, en el plásmido pΔFH, y el oligo HphAc, localizado dentro de la región codificante del gen que determina resistencia a higromicina. Se trató de amplificar también un fragmento de ADN derivado de la región 3' flanqueante con una combinación de cebadores que permitiría una amplificación sólo en el caso de que se hubiera producido un evento de

recombinación homóloga en el extremo 3' flanqueante del gen. Los oligonucleótidos utilizados en este caso fueron el oligonucleótido FHT2, cuya secuencia de anillamiento se localiza inmediatamente aguas abajo de la secuencia clonada en el plásmido pFH1 (por lo tanto no está presente en el plásmido p $\Delta$ FH) y el oligo HphBc, localizado dentro de la región codificante del gen que determina resistencia de higromicina (Fig. 48).

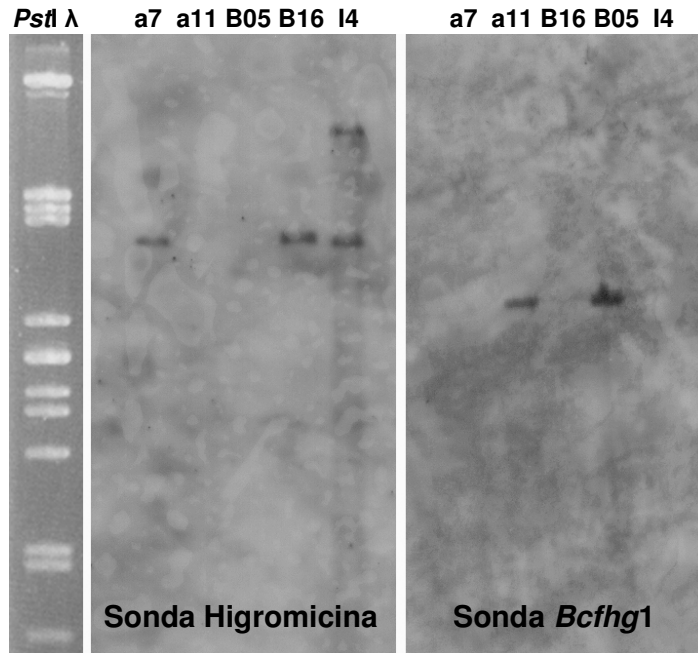


**Figura 48.** Estrategia de reemplazamiento génico de *Bcfhg1* mediante un doble evento de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes de la copia genómica del alelo silvestre del gen *Bcfhg1* y del alelo mutante construido artificialmente y clonado en el plásmido p $\Delta$ FH.

Muchos de los transformantes analizados presentaron la integración de la construcción sólo en la región 5' o sólo en la región 3'. En los transformantes que presentaron las dos bandas deseadas, se realizó una tercera reacción de PCR con una pareja de cebadores, FH1A y FH1B, que permitían la amplificación de un fragmento de ADN genómico correspondiente a la región codificante de *Bcfhg1* de 1.162 nucleótidos, eliminada en el alelo mutante clonado en p $\Delta$ FH (Fig. 48).

A partir de los transformantes originales en los que fue posible detectar un doble evento de recombinación homóloga en los extremos flanqueantes y que no daban positivo para la presencia del alelo silvestre de *Bcfhg1* en nuestro análisis, 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 la mutación  $\Delta$ *Bcfhg1* en los transformantes “candidato” seleccionados. Para comprobar esta situación se extrajo ADN genómico de los mismos mediante el procedimiento estándar (ver sección de Materiales y Métodos) y fueron sometidos a una hibridación tipo Southern realizada

mediante una digestión con la enzima *ClaI* (Fig. 24). Los resultados se presentan en la figura 49.



**Figura 49.** Análisis mediante hibridación tipo Southern de cuatro transformantes de *B. cinerea* candidatos a ser auténticos mutantes  $\Delta Bcfhg1$ .

El ADN genómico de las cuatro cepas candidato, a7, a11, B16 e I4, y de la cepa silvestre B05.10 fue digerido con la enzima *ClaI*. Los filtros resultantes de las electroforesis y transferencias de los fragmentos derivados de la digestión fueron hibridados con la sonda de la higromicina, generada mediante PCR con los oligonucleótidos HphA y HphB, y con la sonda de *Bcfhg1*, generada mediante PCR con los oligonucleótidos FH1A y FH1B.

En la hibridación con la sonda de *Bcfhg1* de la figura 49, se comprueba que en los transformantes a7, B16 e I4 el alelo silvestre de *Bcfhg1* no está presente. En la cepa a11 el alelo aún está presente, ya que presenta una banda de 3.203 nucleótidos: se trata, por lo tanto, de un heterocariote portador tanto del alelo silvestre (Southern) como del alelo mutante (detectado por PCR en el análisis preliminar). La hibridación llevada a cabo con la sonda “higromicina” demuestra que en las cepas a7 y B16 sólo está presente una copia del gen de higromicina (banda de 4.057 nucleótidos), mientras que en la cepa I4 hay dos copias presentes. A la luz de la información derivada de este análisis, se seleccionaron para una caracterización detallada posterior las cepas transformantes a7 y B16, en las cuales el alelo mutante aparece en homocariosis, y se descarta la cepa a11, probablemente un heterocariote

con el alelo silvestre y con el alelo mutante, y la cepa I4, en la que se detectó, al menos, una copia adicional del cassette de higromicina integrado ectópicamente.

#### 4.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MUTANTES $\Delta BCFHG1$

La capacidad de degradar óxido nítrico por los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  carentes de flavohemoglobina se investigó como primer paso de su caracterización funcional. Se midió la degradación de NO en dos mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (a7, B16), el tipo silvestre y un control negativo que consistía en el medio de cultivo utilizado con las distintas cepas analizadas pero sin micelio alguno. Para ello se cultivaron en matraces de 100 ml de medio de cultivo B5,  $5 \times 10^5$  esporas por ml de la cepa correspondiente (o en ausencia de la misma en el control negativo) durante 8 horas a 22 °C en agitación. Se extrajo una alícuota de 2 ml a un recipiente con agitación, se equilibró durante 10 minutos y se añadieron 2  $\mu$ M de NO en forma de solución saturada de NO en agua. La evolución de la concentración de NO se midió con un electrodo de NO y se registraron los datos obtenidos (Fig. 50).

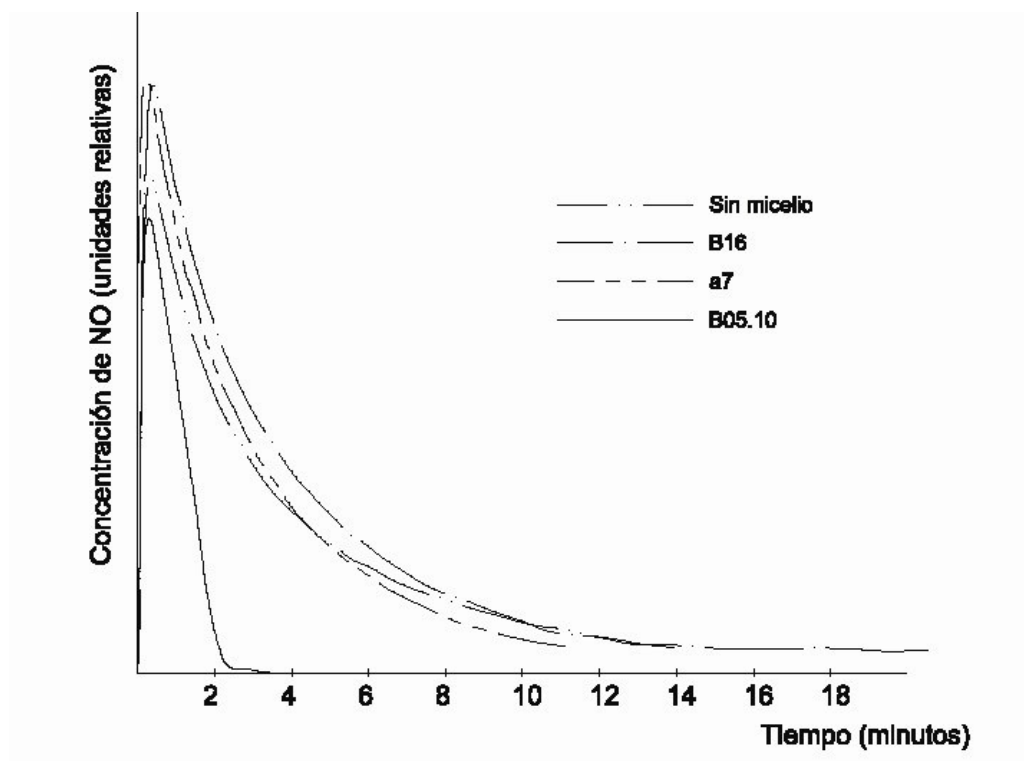
La curva correspondiente a la muestra control negativo (sin micelio) nos proporciona información sobre la cinética de degradación no enzimática de NO en las condiciones de cultivo utilizadas.

La curva B05.10 es la curva obtenida en presencia de micelio de la cepa silvestre B05.10 de *B. cinerea*. El análisis de la misma demuestra que *B. cinerea* dispone de un sistema activo de detoxificación de NO, ya que la pendiente de la curva en este caso es mayor, determinándose una disminución muy rápida de la cantidad de NO remanente. El estudio de la pendiente de la curva demuestra que la cinética de la detoxificación de NO en la cepa silvestre es lineal hasta prácticamente el agotamiento del NO en el medio de cultivo, lo que permite deducir que el sistema de detoxificación de NO de *B. cinerea* es muy eficaz y que presenta una afinidad enorme por el sustrato, NO.

Las curvas obtenidas con las dos cepas mutantes deficientes en el gen *Bcfhg1*, cepas a7 y B16, son muy similares entre sí y muy similares ambas a la curva obtenida en ausencia de micelio (control negativo). La observación de que ambos

mutantes carecen de actividad detoxificadora de NO supone que la eliminación del gen *Bcfhg1* elimina completamente la capacidad enzimática de *B. cinerea* para detoxificar NO. Cabe deducir, por tanto, que la actividad detoxificadora de NO de la proteína BcFHG1 es el principal y, probablemente, el único mecanismo de detoxificación de NO en *B. cinerea* funcional en las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo. Los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  estarán, así, expuestos durante más tiempo y a mayores concentraciones de NO que la cepa silvestre.

El experimento que se presenta en la figura 50 ha sido repetido en cinco ocasiones con nuevos stocks de soluciones, de esporas y de medio de cultivo y diferentes lotes de membranas en el electrodo de NO, obteniéndose en todos unos resultados muy similares.



**Figura 50.** Degradación de NO por el tipo silvestre y dos mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7).

Los picos de las curvas representan 2  $\mu\text{M}$  de NO que se degrada en el tiempo a diferentes intensidades.

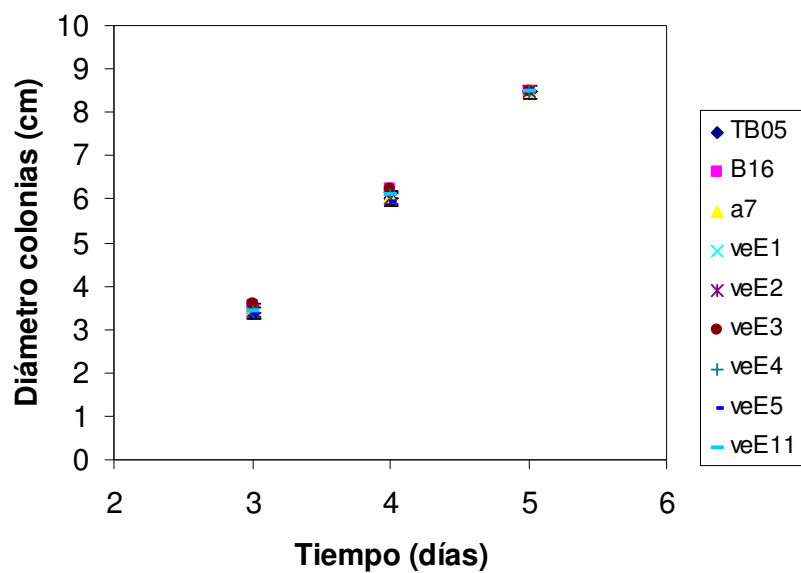


## 4.6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS MUTANTES $\Delta BCFHG1$

Una vez caracterizados bioquímicamente los mutantes, habiendo comprobado que la eliminación del gen *Bcfhg1* elimina la capacidad de *B. cinerea* para detoxificar NO, decidimos llevar a cabo una caracterización fisiológica de aquéllos para determinar las posibles funciones que el propio NO y la detoxificación de NO juegan en la fisiología de *B. cinerea*. Se analizó la capacidad de crecimiento saprofitico sobre medios sintéticos, la sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo y de estrés oxidativo y la capacidad de infectar a la planta huésped.

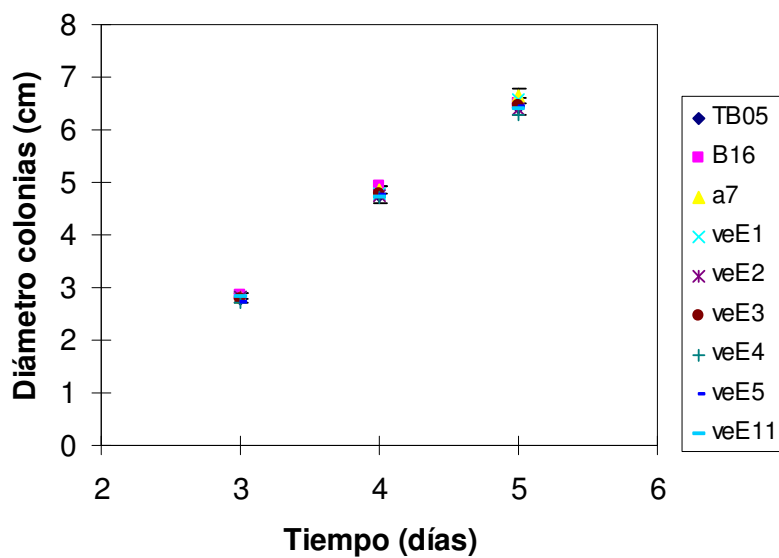
### 4.6.1. Análisis de la capacidad de crecimiento saprofitico

La capacidad de crecimiento saprofitico de las cepas  $\Delta Bcfhg1$  a7 y B16 se analizó estimando el diámetro lineal de la colonia derivada del crecimiento de 500 conidios depositados en una gota de 5  $\mu$ l de volumen en el centro de una placa de Petri a los 3, 4 y 5 días desde el inicio de la inoculación. Como controles se utilizaron siete cepas diferentes de *B. cinerea*. Seis de ellas son cepas regenerantes (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) derivadas de protoplastos individuales que han sido sometidos a los mismos procedimientos y tratamientos experimentales que las cepas mutantes transformantes  $\Delta Bcfhg1$ . La séptima cepa es una segunda copia de la cepa B05.10 utilizada en la transformación y cedida por el Profesor Paul Tudzynski y que identificamos como TB05. Todas estas cepas control, tienen el mismo fondo genético, aunque la última no ha sido sometida a los tratamientos característicos del procedimiento de transformación. En este estudio se utilizó un medio más rico, MEA, y otro más pobre, B5. Para cada cepa y condición se sembraron 4 placas. Los resultados se pueden ver en las figuras 51 y 52. El análisis estadístico mediante el modelo lineal general, no mostraba diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el crecimiento saprofitico entre los mutantes y los controles en los dos medios de cultivo utilizados.



**Figura 51.** Diámetro medio de las colonias cultivadas en medio MEA.

En el margen derecho se indica en la leyenda las cepas analizadas.



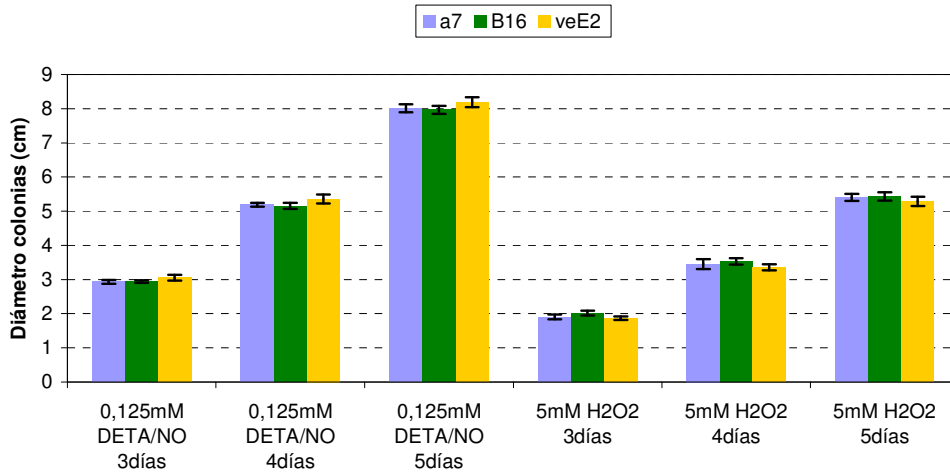
**Figura 52.** Diámetro medio de las colonias cultivadas en medio B5.

En el margen derecho se indica en la leyenda las cepas analizadas.

#### 4.6.2. Sensibilidad a estrés nitrosativo y a estrés oxidativo

La sensibilidad a estrés nitrosativo y oxidativo de los mutantes carentes de actividad de degradación de NO (B16 y a7) y del control (veE2) se analizó en medio MEA al que se añadió, después de ser esterilizado, bien DETA/NO o SNP para determinar una situación de estrés nitrosativo, bien H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para determinar una situación de estrés oxidativo. Posteriormente se midió el diámetro lineal de la colonia del hongo inoculado sobre las placas de medio de cultivo como se describe en la sección anterior. Se utilizó menadiona, un agente que genera el anión superóxido, para proporcionar estrés oxidativo, pero resultó tóxica para el hongo a concentraciones de 500 µM y 250 µM. Concentraciones de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también resultaron tóxicas para el hongo impidiendo la germinación de esporas.

En un primer experimento se comparó la sensibilidad a 0,125 mM de DETA/NO y 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 53). El análisis estadístico utilizado para procesar los datos generados fue el modelo lineal general y se utilizó el análisis Post-hoc tipo Tukey. El tratamiento con 0,125 mM de DETA/NO determina un comportamiento similar en las dos cepas mutantes, a7 y B16, las cuales muestran una reducción significativa en su crecimiento respecto al control (un 3,9 % a los 3 días (tabla 5), 3,4 % a los 4 días (tabla 6), 2,2 % a los 5 días (tabla 7)). De hecho, ambas cepas son agrupadas mediante el análisis post-hoc tipo Tukey. La sensibilidad de los mutantes disminuye claramente en el tiempo. La recta de regresión del crecimiento en el tiempo diferencia claramente a los mutantes con el control en presencia de DETA/NO según se aprecia en la figura 54. En el caso del tratamiento con 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se observan diferencias significativas entre el control y los mutantes. Sin embargo, los mutantes presentan una tendencia común a mostrar un crecimiento mayor (tablas 8, 9 y 10).



**Figura 53.** Crecimiento radial de los mutantes  $\Delta Bcflg1$  (B16 y a7) y del control veE2 en el medio de cultivo MEA suplementado con 0,125 DETA/NO ó 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los datos representados corresponden a las medias aritméticas del diámetro de las colonias fungicas en los tiempos y condiciones indicados. Las barras de error representan la desviación estandar.

**Tabla 5.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA con 0,125 mM DETA/NO. Diámetro medio en cm.

cepa	N	Subconjunto	
		1	2
a7	8	2,9250	
B16	8	2,9375	
veE2	8		3,0500
Significación		,926	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 6.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA con 0,125 mM DETA/NO. Diámetro medio en cm.

cepa	N	Subconjunto	
		1	2
B16	8	5,1500	
a7	8	5,1875	
veE2	8		5,3500
Significación		,787	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 7.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA con 0,125 mM DETA/NO. Diámetro medio en cm.

cepa	N	Subconjunto	
		1	2
B16	8	7,9625	
a7	8	8,0125	
veE2	8		8,1875
Significación		,682	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 8.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

cepa	N	Subconjunto	
		1	2
veE2	8	1,8625	
a7	8	1,9000	
B16	8		2,0125
Significación		,488	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 9.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

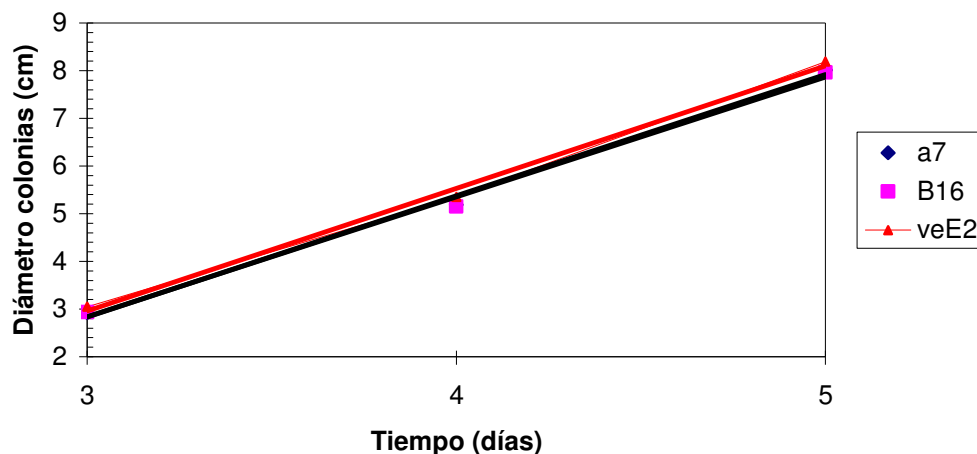
cepa	N	Subconjunto	
		1	2
veE2	8	3,3500	
a7	8	3,4500	3,4500
B16	8		3,5250
Significación		,119	,286

DHS de Tukey

**Tabla 10.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

cepa	N	Subconjunto
		1
veE2	8	5,2875
a7	8	5,4000
B16	8	5,4250
Significación		,104

DHS de Tukey



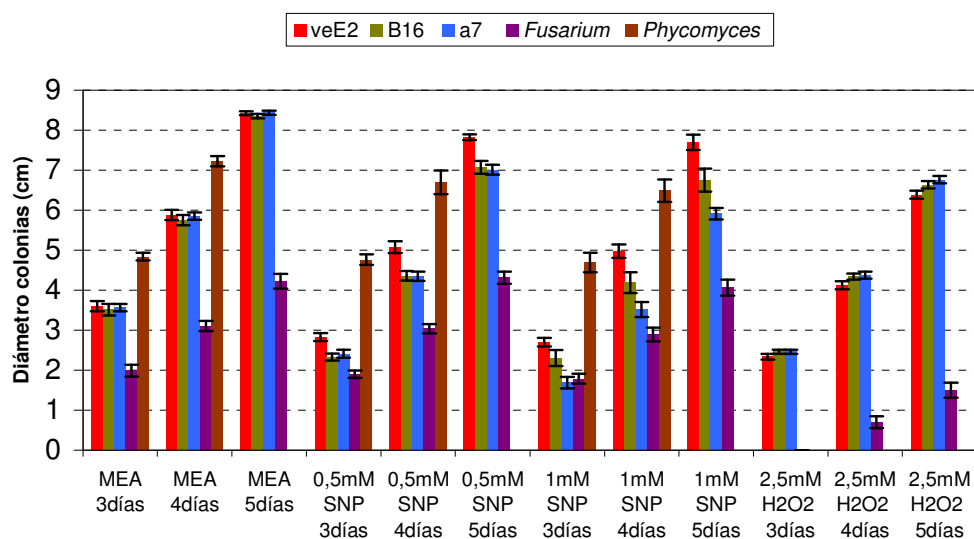
**Figura 54.** Crecimiento radial de  $\Delta Bc fhg1$  (a7 y B16) y control (veE2) en el medio de cultivo MEA suplementado con 0,125 mM DETA/NO.

A la vista de los resultados del experimento anterior, se diseñó un segundo experimento donde se optimizaron las condiciones de exposición a estrés nitrosativo y oxidativo. Respecto al estrés nitrosativo, se decidió incrementar las cantidades de NO aportadas usando el donador SNP a concentraciones de 0,5 y 1 mM debido a que presenta una buena liberación de NO y se hace más conveniente su uso a concentraciones elevadas y en grandes cantidades de medio. Debido a que en el experimento anterior 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultó tóxico y 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece reducir drásticamente el crecimiento afectando profundamente al metabolismo del hongo, se decidió optar por una concentración menor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,5 mM.

Para tener una mejor idea de la sensibilidad de *B. cinerea* respecto a otros hongos bajo estrés nitrosativo y oxidativo, se compararon los mutantes de *B. cinerea* de la flavohemoglobina (a7 y B16) y el control (veE2), con *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Sp1) y *P. blakesleeanus* (C141B). El diseño experimental utilizado fue idéntico al descrito en el experimento anterior. Las medias aritméticas con sus respectivas desviaciones estándar de los diámetros de colonias a los 3, 4 y 5 días de incubación se muestran en la figura 55. Posteriormente se realizó el análisis post-hot de Tukey por medio del modelo lineal general para agrupar las cepas en función de las diferencias de crecimiento.

El medio control (MEA), no mostraba diferencias entre las cepas mutantes y la cepa control a los 3 días (tabla 11) y a los 4 días (tabla 12) de incubación. Sin embargo, a los 5 días de incubación la cepa B16 crecía significativamente menos que la cepa mutante a7 y que la cepa control (tabla 13). No obstante la diferencia fue de sólo un 0,8 %, por lo que se puede considerar un crecimiento similar en los dos mutantes y en el control.

Cuando las cepas fueron sometidas a estrés nitrosativo mediante SNP, los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  mostraban una reducción estadísticamente significativa en el crecimiento respecto al control (veE2). Por el contrario, este análisis muestra un incremento estadísticamente significativo en el crecimiento de los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  respecto al control cuando se somete las muestras a estrés oxidativo proporcionado por 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 55.** Crecimiento radial de  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7), control veE2, *F. oxysporum* y *P. blakesleeanus* en el medio de cultivo MEA y MEA suplementado con 0,5 mM SNP, 1 mM SNP o 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los datos representados corresponden a las medias aritméticas del diámetro de las colonias fúngicas en los tiempos y condiciones indicados. Las barras de error representan la desviación estándar.

Los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  se agrupaban significativamente en un grupo respecto al control en medio MEA suplementado con 0,5 mM de SNP, reduciendo su crecimiento en un 16,1 % a los 3 días de incubación (tabla 14), en un 14,1 % a los 4 días de incubación (tabla 15) y en un 10 % a los 5 días de incubación (tabla 16).

Cuando el medio MEA era suplementado con 1 mM SNP surgían diferencias entre los dos mutantes, aunque los dos presentaban una mayor sensibilidad al NO respecto al control (veE2). A los 3 días de incubación a7 y B16 reducían su crecimiento respecto al control en un 37,5 % y 14,8 % (tabla 17), a los 4 días en un 29,4 % y 15,8 % (tabla 18) y a los 5 días en un 23,2 % y 12,3 % (tabla 19) respectivamente. El mutante a7 presentaba una sensibilidad al NO mayor estadísticamente significativa respecto al mutante B16 cuando era expuesto a altas concentraciones de NO (1 mM SNP). Sin embargo, el crecimiento de B16 no era afectado al aumentar la concentración de NO desde 0,5 mM SNP a 1 mM SNP. Las diferencias encontradas entre los dos mutantes pueden ser debidas a diferencias

fisiológicas entre ambos mutantes que se hacen apreciables al incrementar el estrés nitrosativo. Cabe destacar que en ambos mutantes el crecimiento se reduce con el estrés nitrosativo respecto al control. El crecimiento del control en las dos condiciones de crecimiento con NO era similar y desde luego inferior que en ausencia de NO (Fig. 55).

Al someter los mutantes a estrés oxidativo proporcionado por 2,5 mM de peróxido de hidrógeno, éstos se agrupaban en un grupo con un incremento de crecimiento del 5,3 % a los 3 días de incubación (tabla 20) y 5,6 % a los 4 días (tabla 21) respecto al control (veE2). A los 5 días de incubación el crecimiento aumentaba en un 3,9 % para B16 y 5,9 % para a7 (tabla 22).

Al comparar la sensibilidad al estrés nitrosativo y oxidativo de *B. cinerea* respecto al de *F. oxysporum* y *P. blakesleeanus* (Fig. 55) se observan diferencias en el crecimiento respecto a los tratamientos. *Botrytis* muestra una mayor resistencia a 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que *Fusarium*, que reduce considerablemente su crecimiento y que *Phycomyces*, que es incapaz de germinar. Respecto al estrés nitrosativo, los tres hongos reducen su crecimiento, aunque *Fusarium* se muestra más resistente al NO que *B. cinerea* y que *Phycomyces* al reducir su crecimiento de forma más moderada cuando es expuesto tanto a 0,5 como a 1 mM de SNP.

**Tabla 11.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto
	1	1
B16	8	3,5125
a7	8	3,5625
veE2	8	3,6000
Significación		0,358

DHS de Tukey

**Tabla 12.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto
	1	1
B16	8	5,7500
a7	8	5,8500
veE2	8	5,8750
Significación		0,112

DHS de Tukey



**Tabla 13.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
B16	8	8,3500	
veE2	8		8,4250
a7	8		8,4375
Significación		1,000	0,875

DHS de Tukey

**Tabla 14.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA 0,5 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
B16	8	2,3250	
a7	8	2,4125	
veE2	8		2,8250
Significación		0,194	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 15.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA 0,5 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
a7	8	4,3500	
B16	8	4,3625	
veE2	8		5,0750
Significación		0,980	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 16.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA 0,5 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
a7	8	7,0125	
B16	8	7,0750	
veE2	8		7,8250
Significación		,576	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 17.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA 1 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto		
	1	2	3	1
a7	8	1,6875		
B16	8		2,3000	
veE2	8			2,7000
Significación		1,000	1,000	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 18.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA 1 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto		
	1	2	3	1
a7	8	3,5125		
B16	8		4,1875	
veE2	8			4,9750
Significación		1,000	1,000	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 19.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA 1 mM SNP. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto		
	1	2	3	1
a7	8	5,9125		
B16	8		6,7500	
veE2	8			7,7000
Significación		1,000	1,000	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 20.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 3 días en placas de MEA 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
veE2	8	2,3375	
B16	8		2,4625
a7	8		2,4625
Significación		1,000	1,000

DHS de Tukey

**Tabla 21.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 4 días en placas de MEA 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto	
	1	2	1
veE2	8	4,1250	
B16	8		4,3375
a7	8		4,3750
Significación		1,000	0,685

DHS de Tukey

**Tabla 22.** Análisis post-hoc del crecimiento de esporas incubadas durante 5 días en placas de MEA 2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diámetro medio en cm.

Cepa	N	Subconjunto		
	1	2	3	1
veE2	8	6,3875		
B16	8		6,6375	
a7	8			6,7625
Significación		1,000	1,000	1,000

DHS de Tukey

### 4.6.3. Análisis de la agresividad sobre la planta huésped

Las cepas mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (a7 y B16) no muestran diferencias en su capacidad de crecimiento saprofítico en relación con las cepas utilizadas como control, como demuestran los resultados descritos en la sección 4.6.1. Siendo así, si las cepas mutantes manifestaran alguna diferencia con las cepas control en relación con su capacidad para infectar a la planta huésped, estas diferencias podrían ser adscritas a una alteración en características fisiológicas implicadas directamente en patogenicidad. El gen alterado en los mutantes correspondientes podría ser considerado, con todo sentido, un factor de patogenicidad. Para analizar la agresividad de las cepas mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (a7 y B16) y de las cepas control (TB05, veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11), se realizaron una serie de ensayos de infección sobre hojas de tomate, tabaco, *Arabidopsis* y vid. El sistema de inoculación en condiciones controladas que manejamos en el laboratorio utiliza hojas de tomate y permite generar resultados altamente reproducibles. Además, la información que se obtiene sobre tomate resulta orientativa sobre el comportamiento general de *B. cinerea* sobre otros huéspedes para los que el sistema de inoculación no produce resultados tan claros.

Sobre tomate se valoró en primer lugar la capacidad de penetración del patógeno en la célula huésped estimando el porcentaje de lesiones dispersivas producidas a las 72 h.p.i., entendiendo por lesión dispersiva aquella que presenta un diámetro de lesión en el momento de la evaluación superior al de la gotita de inoculación. En segundo lugar se analizó la capacidad de maceración y de colonización del tejido infectado estimando el diámetro medio de lesión dispersiva a las 72 h.p.i.

Todas las gotitas de inoculación depositadas sobre hojas de tomate, tanto de las cepas control como de las cepas mutantes, generaron lesiones dispersivas a las 72 h.p.i. Por tanto, las cepas mutantes mostraron la misma eficiencia de penetración, 100%, que la cepa silvestre control.

Se valoró entonces el diámetro de todas las lesiones dispersivas producidas a las 72 h.p.i., no observándose diferencias significativas en el diámetro de las lesiones dispersivas entre los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  y las cepas control. Así se deduce de los datos recogidos y representados en la figura 56, correspondientes a un experimento

de inoculación particular. Se realizaron cuatro repeticiones idénticas del experimento de inoculación con resultados muy similares, aunque para la descripción estadística presentamos únicamente los resultados obtenidos en uno, ya que debido a la gran variabilidad que tiene este tipo de experimentos no es posible comparar cuantitativamente datos de diferentes experimentos. Por cada experimento, se realizaron, al menos, tres repeticiones de cada muestra en diferentes folíolos, cada una con 5 repeticiones de la inoculación. El análisis post-hoc mostraba que todas las cepas se agrupaban en un único grupo cuando no se incluía la cepa control veE11, la cual fue descartada por representar el control más extremo (tabla 23). La figura 57 presenta imágenes representativas derivadas de uno de los experimentos de inoculación sobre tomate que hacen posible la comparación de la capacidad de infección de las cepas mutantes y de las cepas control, no apreciándose diferencias en la infección entre las cepas comparadas.

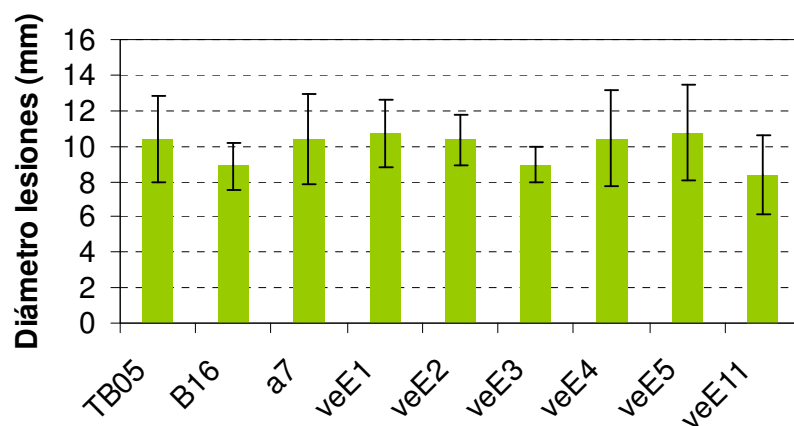
Se llevó a cabo el mismo tipo de valoración de la patogenicidad de las distintas cepas analizadas sobre hojas de tabaco para comprobar si el fenotipo observado era el mismo en un segundo huésped. Aunque sobre tabaco es más difícil obtener resultados absolutamente reproducibles con nuestro sistema de inoculación y generar un número elevado de datos, a pesar de que las lesiones dispersivas no son tan claras como en tomate la agresividad de las cepas mutantes a7 y B16 parece ser muy similar a la de las cepas control veE1 y veE2, tal y como puede comprobarse en la figura 58. Este experimento nos demuestra que la ausencia de fenotipo (no alteración de la patogenicidad en las cepas mutantes) no es debido a un efecto producido por el huésped.

También se realizaron experimentos sobre hojas de *Arabidopsis* (Fig. 59) con resultados similares a los producidos sobre tomate y tabaco. Sin embargo, debido a las particularidades de *Arabidopsis*, tales como la limitación que impone el menor tamaño y superficie de las hojas o la variabilidad en el estado fisiológico de las hojas, las infecciones no son tan evidentes y resulta mucho más difícil su análisis y cuantificación. No obstante, visualmente no fue posible observar diferencias evidentes entre las cepas mutantes y las cepas control en cuanto a su patogenicidad.

*Arabidopsis* presenta una ventaja muy importante cuando se considera su utilización como herramienta de trabajo y es que se dispone de una genética muy

desarrollada en este sistema y de una numerosísima colección de mutantes. En el caso que nos ocupa nos pareció particularmente interesante valorar la capacidad de infección de las cepas  $\Delta Bcfhg1$  y de las cepas control sobre un mutante *Atnos1* (*Atnoa1* (Crawford *et al.*, 2006)), cuya producción de NO está reducida en un 80 % (Zeidler *et al.*, 2004). Tampoco en este caso fue posible detectar visualmente diferencias en la capacidad de infectar al huésped entre los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  y las cepas control (Fig. 60).

Finalmente, decidimos llevar a cabo una primera serie de experimentos de inoculación sobre hojas de vid. En este caso utilizamos hojas de la variedad Tempranillo y hojas de la variedad Verdejo facilitadas por los responsables del programa de selección clonal de la vid del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Estos experimentos de inoculación se llevaron a cabo al final de la campaña del año 2007. Desafortunadamente, los materiales cedidos en esta ocasión mostraron serios problemas de persistencia de los agentes utilizados en tratamientos fitosanitarios llevados a cabo en el centro y que fueron puestos en nuestro conocimiento una vez realizadas las inoculaciones. Los resultados obtenidos fueron tremendamente irregulares y erráticos, no permitiendo sacar conclusión alguna, razón por la cual no se discuten en esta memoria de Tesis Doctoral. Es intención de nuestro grupo de trabajo llevar a cabo una nueva serie de inoculaciones durante la campaña 2008.



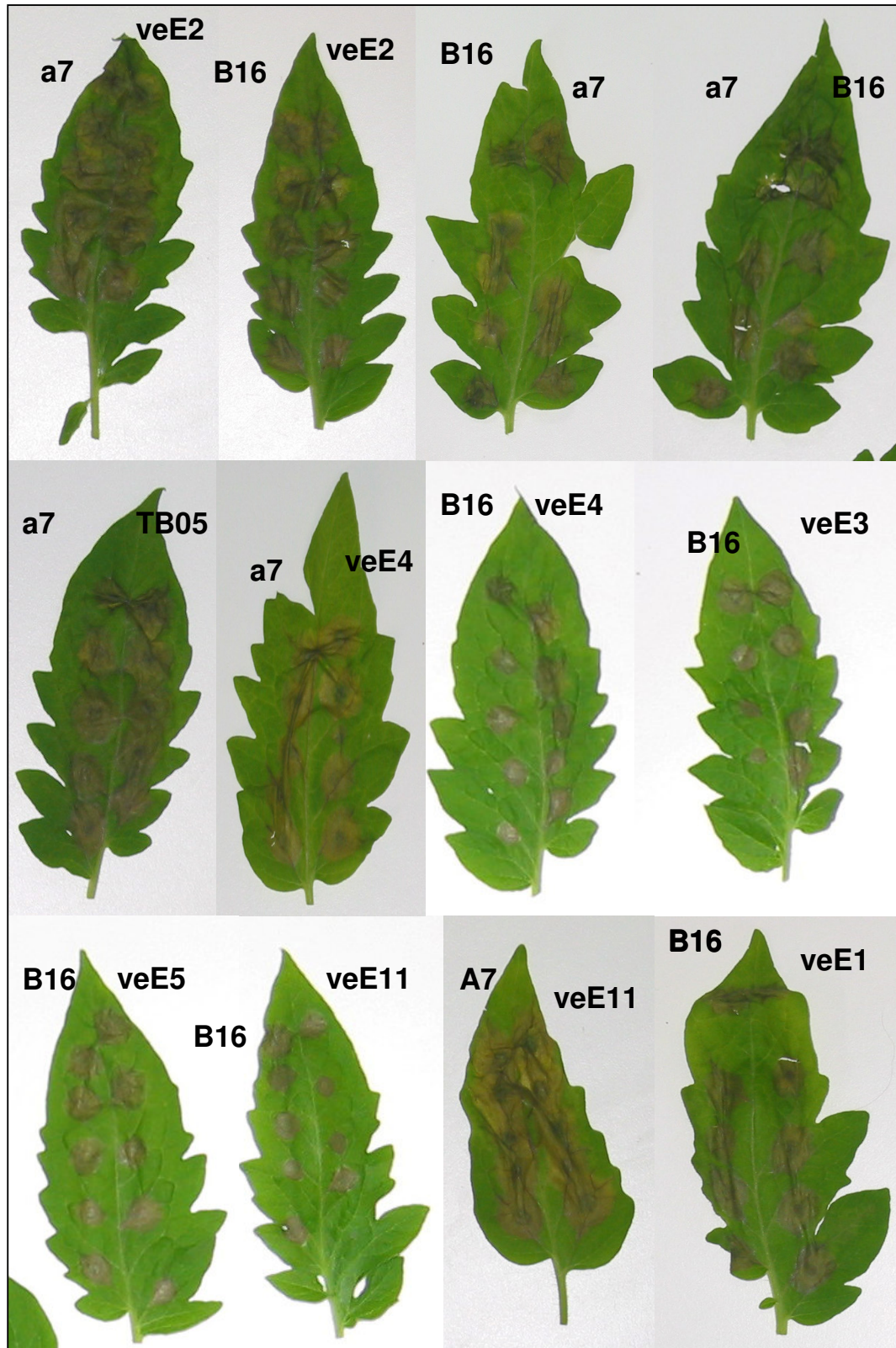
**Figura 56.** Diámetro de la lesión producida por *B. cinerea* en hojas de tomate.

Para cada muestra se expresa la media y la desviación estándar del diámetro de las lesiones producidas.

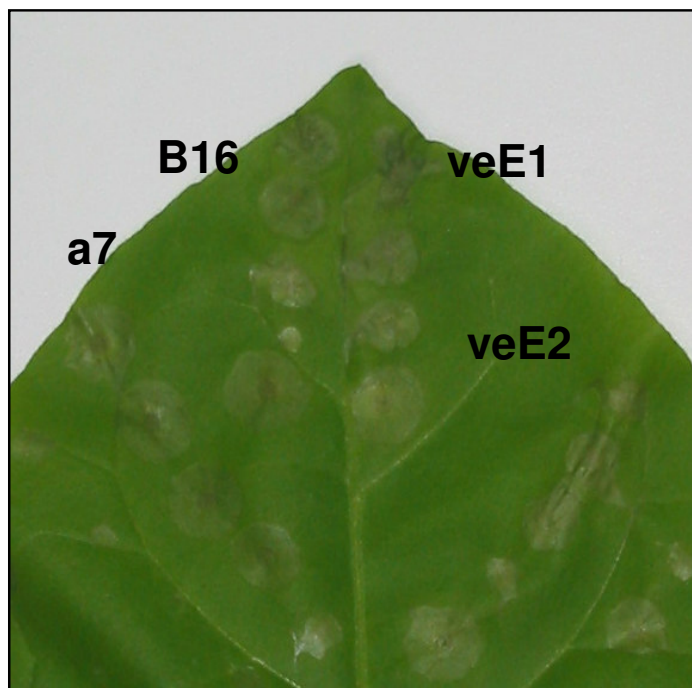
**Tabla 23.** Análisis post-hoc del diámetro de la lesión producida por *B. cinerea* en hojas de tomate. Diámetro lesiones en mm.

Cepa	N	Subconjunto
	1	1
B16	60	8,8667
veE3	15	8,9333
veE2	15	10,3333
TB05	25	10,4000
veE4	15	10,4000
a7	60	10,4000
veE1	15	10,7333
veE5	15	10,7333
Significación		0,115

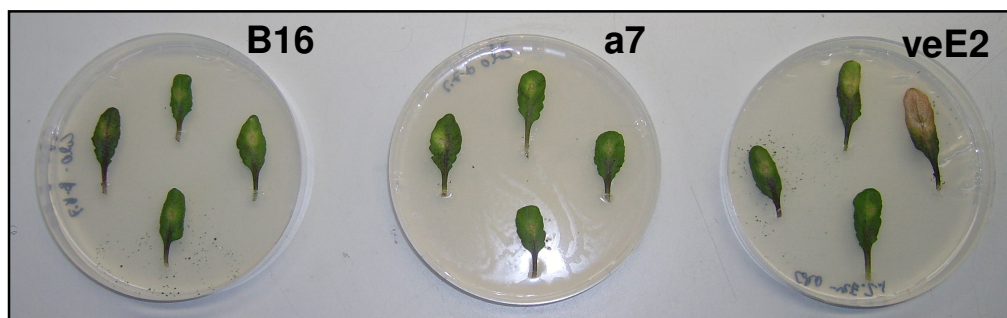
DHS de Tukey



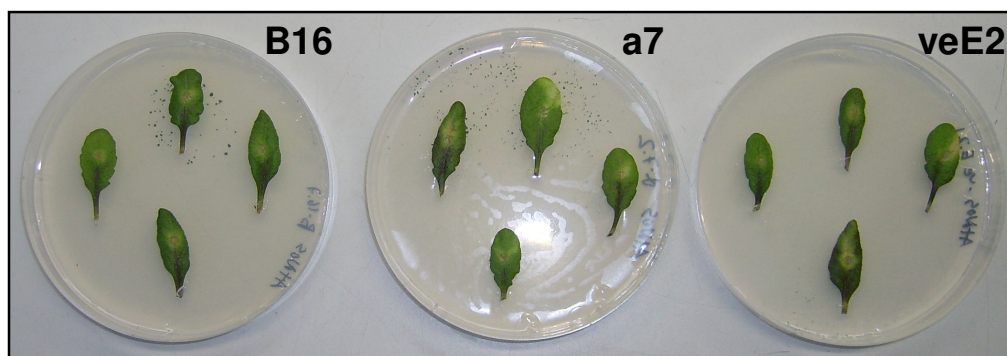
**Figura 57.** Ensayo de infección sobre hojas de tomate a los 3 días post-inoculación.



**Figura 58.** Ensayo de infección sobre hoja de tabaco a los 3 días post-inoculación.



**Figura 59.** Ensayo de infección sobre hojas de *Arabidopsis thaliana* col-0 (tipo silvestre) a los 6 días post-inoculación.



**Figura 60.** Ensayo de infección sobre hojas de *Arabidopsis thaliana*  $\Delta$ Atnos1 a los 6 días post-inoculación.



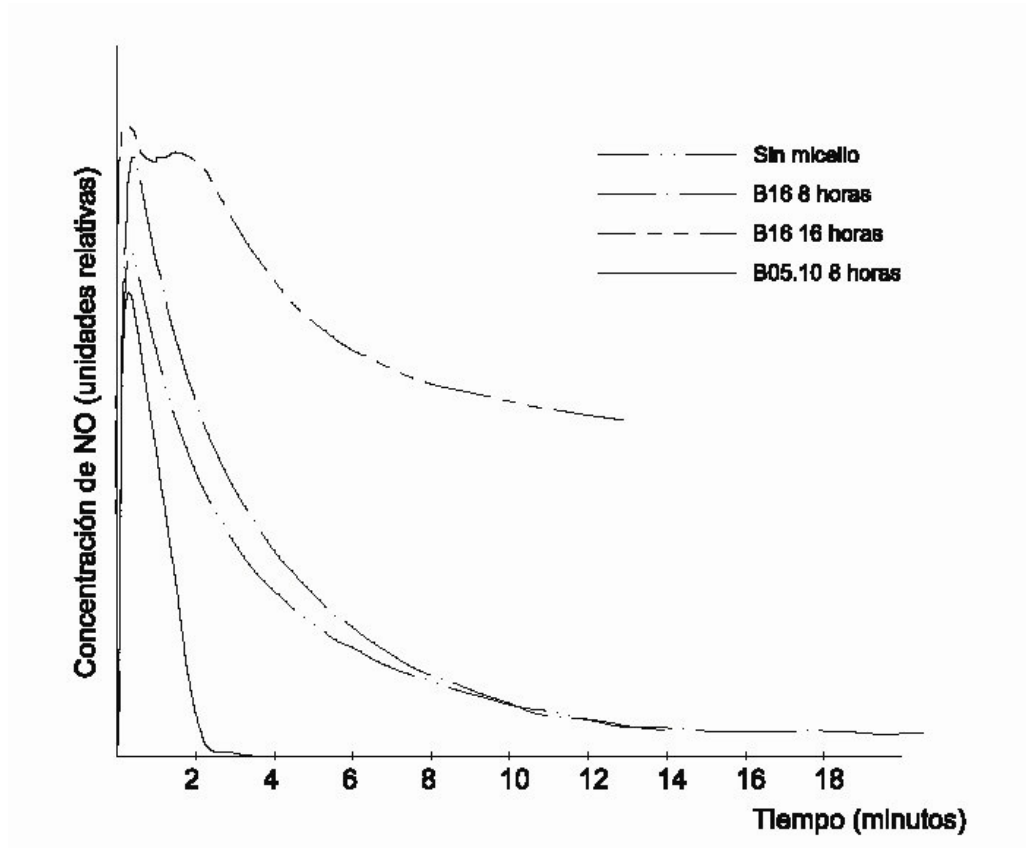
## 5. PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA*

### 5.1 DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA* CON EL ELECTRODO DE NO

La caracterización bioquímica de los mutantes  $\Delta Bcflg1$  descrita en la sección 4.5. y basada en el estudio de la cinética de detoxificación de NO exógeno por parte de cultivos de esporas de *B. cinerea* en cultivo líquido permitieron demostrar que las dos cepas analizadas alteradas en el gen codificador de la enzima flavohemoglobina de *B. cinerea* son incapaces de detoxificar NO. Estos experimentos se llevaron a cabo rutinariamente utilizando cultivos de *B. cinerea* incubados durante 8 horas en medio B5 y en agitación vigorosa. La cantidad de NO presente en el cultivo en cada momento desde su adición fue detectada y registrada con ayuda de un electrodo de NO. En este momento, 8 horas después de la inoculación, prácticamente todas las esporas ya han germinado dando lugar a tubos germinativos que están desarrollándose y ramificándose de forma muy activa.

Durante la caracterización de la cepa B16, y de manera excepcional, decidimos incluir en algunos de los experimentos la determinación de la capacidad de detoxificar NO de micelio maduro, cultivado durante 16 horas desde el momento de la inoculación del medio líquido. Los resultados obtenidos en un experimento de este tipo, siguiendo exactamente los mismos procedimientos experimentales utilizados en los experimentos anteriores, se presentan en la figura 61. Se comprueba que el comportamiento de la cepa silvestre, del control negativo (ausencia de micelio) y de la cepa B16 a las 8 horas de cultivo, son los observados en los experimentos previos. Sin embargo, el comportamiento de la cepa B16 cuando se utiliza micelio cultivado durante 16 horas resulta totalmente inesperado. En este caso, lejos de observarse una curva de acumulación (detección) de NO indicativa de detoxificación de NO similar a la producida en ausencia de micelio (no enzimática) y característica, como hemos comprobado en los experimentos previos, de las cepas mutantes  $\Delta Bcflg1$  cuando se utiliza micelio cultivado durante 8 horas (ver Fig. 61 en esta sección y Fig. 50 en la sección 4.5.), se observa una curva de detección de NO caracterizada por una pendiente menor que en ausencia de micelio. Estos resultados

experimentales sugieren que la exposición a NO exógeno (en las concentraciones de trabajo utilizadas en este estudio) de micelio cultivado durante 16 horas induce en el microorganismo la producción de NO, lo que supone que *B. cinerea* debe disponer de un sistema activo de producción de NO.

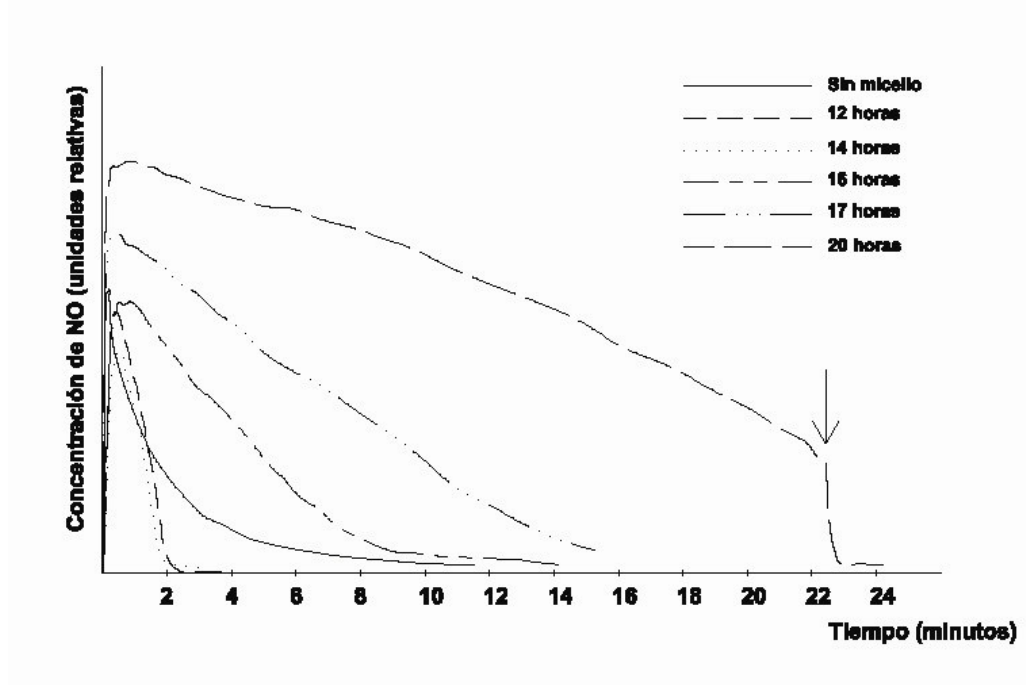


**Figura 61.** Inducción de la producción de NO mediante NO en el mutante  $\Delta Bc fhg1$  (B16).

Estos resultados han sido reproducidos de manera consistente en repeticiones posteriores llevadas a cabo tanto con la cepa B16 como con la cepa a7. Para comprobar si este fenómeno es característico únicamente de las cepas mutantes  $\Delta Bc fhg1$ , consecuencia quizás de la mutación introducida, o si se trata de un fenómeno general que también se produce en la cepa silvestre, se llevó a cabo un experimento similar utilizando micelio derivado de la cepa silvestre B05.10. En este caso decidimos evaluar la curva de detección de NO en medio de cultivo líquido B5 después de añadir 2  $\mu\text{M}$  de NO trabajando con micelios cultivados durante periodos de tiempo variables (12, 14, 16, 17 y 20 horas) antes de la exposición a NO. Los

resultados obtenidos se presentan en la Figura 62. Se comprueba que el micelio de la cepa silvestre cultivado durante 12 y durante 14 horas en este medio de cultivo antes de la exposición a NO exógeno presenta actividad de detoxificación de NO, generándose curvas de detección de NO en estas condiciones similares a las observadas en experimentos previos (Fig. 50). Con micelio cultivado durante 16 horas la situación cambia: ahora la pendiente de la curva de detección de NO es menor que la pendiente de la curva característica generada en ausencia de micelio. Por lo tanto, parece ser que la cepa silvestre muestra el mismo comportamiento que las cepas mutantes, siendo capaz de producir por sí misma NO de manera inducible por exposición a NO exógeno. Un efecto similar, aunque de mayor magnitud, se observó cuando se utilizaron micelios incubados durante periodos de tiempo más prologados (17 y 20 horas) antes de la exposición a NO exógeno. Es interesante destacar que, dentro de los límites temporales considerados en este análisis, parece ser que los micelios más maduros responden a la exposición a NO exógeno produciendo niveles superiores de NO, ya que las pendientes de las curvas correspondientes van siendo menores y se detectan mayores niveles de NO a tiempos más tardíos.

Para comprobar que la señal detectada en estos experimentos no es un artefacto derivado del mal funcionamiento del electrodo de NO se utilizó el escavenger de NO c-PTIO. Esta comprobación se llevó a cabo con la muestra de micelio cultivada durante 20 horas antes de realizar la exposición a NO añadiendo a los 2 ml de cultivo en los que se llevan a cabo las mediciones con el electrodo de NO 2  $\mu$ l de una solución 50 mM para determinar una concentración final del escavenger de 50  $\mu$ M. Como se comprueba en la Fig 62, la señal detectada es específica de NO, ya que ésta desaparece en cuanto se añade c-PTIO.



**Figura 62.** Inducción de la producción de NO mediante NO en la cepa B05.10.

La flecha indica el punto donde se administraron 2  $\mu$ l de 50 mM c-PTIO hasta una concentración final de 50  $\mu$ M.

## 5.2. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA* MEDIANTE TINCIÓN CON DAF-2DA.

En el apartado anterior hemos demostrado que la producción de NO está inducida por NO exógeno en determinados estados fisiológicos del hongo. Sin embargo, estas mediciones no nos aportan información sobre la producción basal de NO, su cambio a lo largo del tiempo o la localización de la producción de NO. Asimismo, los experimentos se realizaron en condiciones *in vitro*, aportándonos solamente una aproximación de lo que sucedería durante la infección de la planta por *B. cinerea*.

Para responder a los dos problemas planteados, se diseñó una estrategia de detección de NO en tejidos biológicos por medio de microscopía mediante tinciones con DAF-2DA. Este compuesto es capaz de reaccionar selectivamente con el NO para producir el compuesto fluorescente DAF-2T, el cual se puede detectar mediante un microscopía de fluorescencia o mediante microscopía confocal.

### 5.2.1. Cultivo *in vitro*

La localización de NO en micelio a lo largo de diferentes estados fisiológicos fue estudiada mediante tinción con DAF-2DA de cultivos de conidios de *B. cinerea*. Se utilizó un microscopio de fluorescencia con filtro de la GFP para la detección de la señal correspondiente a la reacción con NO. Todas las incubaciones se realizaron en medio B5 salvo a las 12 horas de incubación que se realizó en extracto de malta (ME).

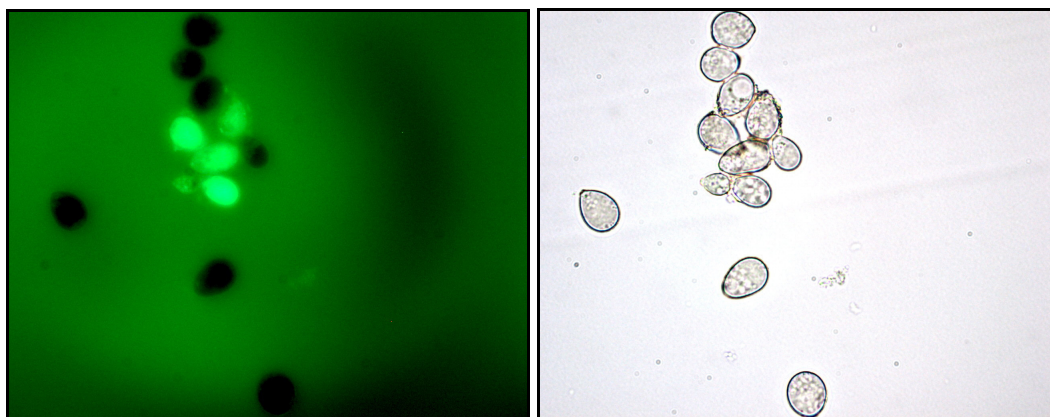
Se detecta una producción basal de NO a lo largo de todo su desarrollo biológico desde esporas recién germinadas (4 horas de incubación, Fig. 63) hasta las 20 horas de incubación (Fig. 70) pasando por las 8, 10 y 12 horas de incubación (Fig. 65, 67 y 68). Esta producción de NO cubre por completo las esporas recién germinadas y/o micelios, aunque sólo un porcentaje inferior al 50 % de las esporas germinadas y/o micelios presentan esta producción de NO.

Se realizaron los controles pertinentes para demostrar que la fluorescencia observada es debida a la reacción del NO con DAF-2DA y que, por lo tanto, se puede asumir que la presencia de fluorescencia supone la existencia de NO. El compuesto c-PTIO es capaz de secuestrar NO activamente hasta no dejar NO en el medio o agotar su capacidad de reacción con NO. De este modo, se elimina el NO del medio y, por tanto, se impide la reacción de NO con DAF-2DA y su consecuente fluorescencia. Los controles realizados incubando con c-PTIO antes de la tinción con DAF-2DA, no mostraron señal de fluorescencia y, por tanto, presencia de NO, demostrando que la fluorescencia obtenida se debe a NO (Fig. 64 y 66).

El análisis de la producción de NO en los diferentes estados de desarrollo del hongo se llevó a cabo en la cepa tipo silvestre B05.10. También se analizó la producción de NO en la cepa B16 (Fig. 69), observándose una producción de NO similar a la de la cepa tipo silvestre B05.10, a pesar que este mutante no es capaz de degradar enzimáticamente NO.

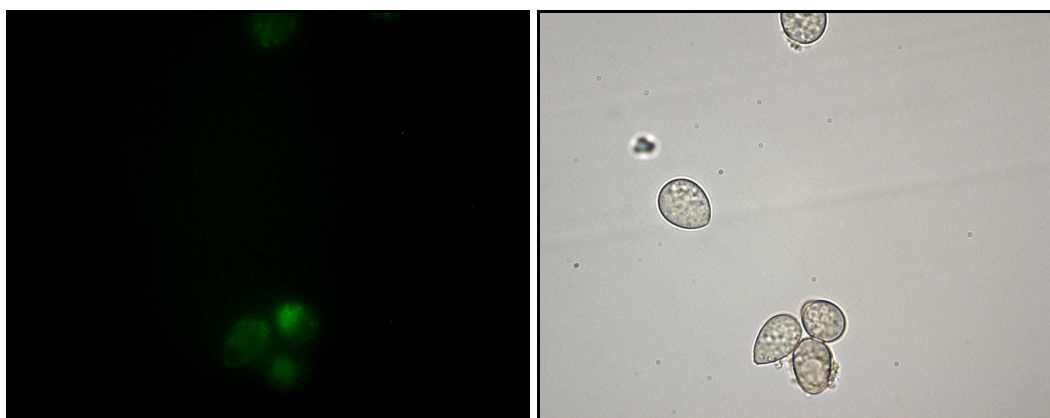
Alrededor de esporas germinadas y de micelio en desarrollo se observa una fluorescencia debida a la reacción de DAF-2DA con NO (Fig. 63, 65 y 70). Parece, por tanto, que el hongo está excretando NO a su medio cercano a parte del que, en algunos casos, produce internamente. Son de destacar las manchas negras que resaltan de las figuras 63 y 65 correspondientes a conidios recién germinados donde

no se presenta producción interna de NO. Curiosamente, la fluorescencia alrededor del hongo no es observada a las 10 y 12 horas de incubación (Fig. 67, 68 y 69).



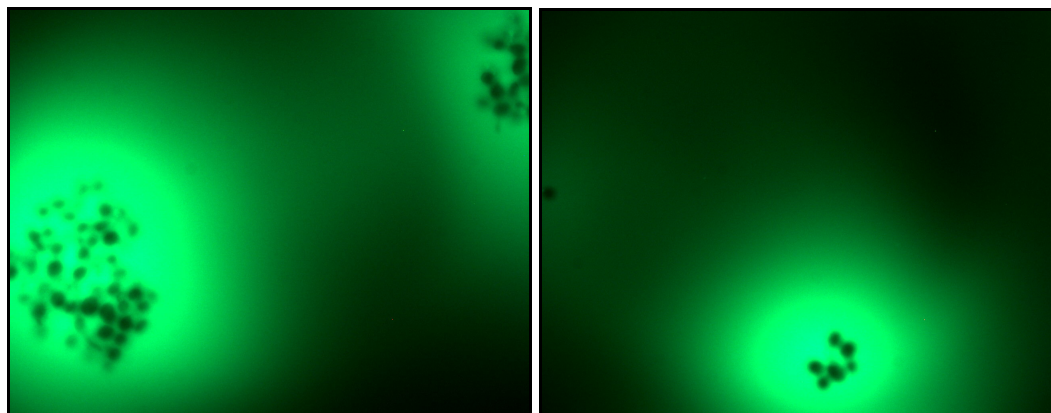
**Figura 63.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 4 horas en B5.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.

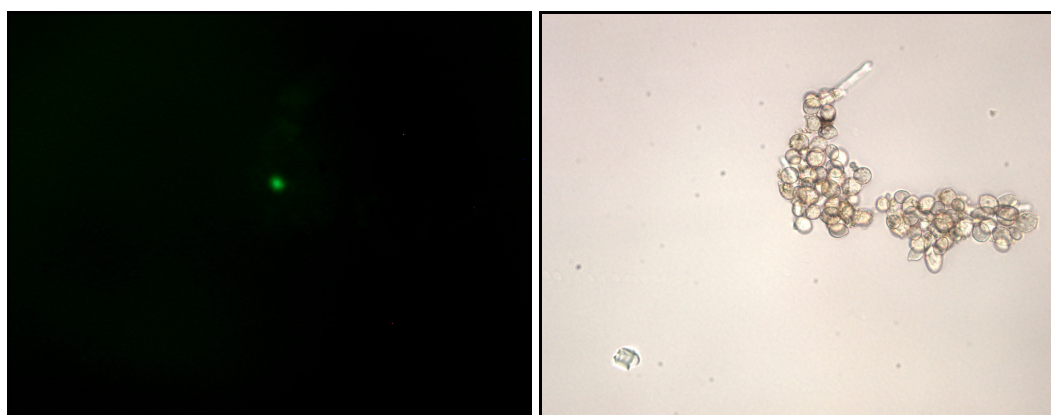


**Figura 64.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 4 horas en B5.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.

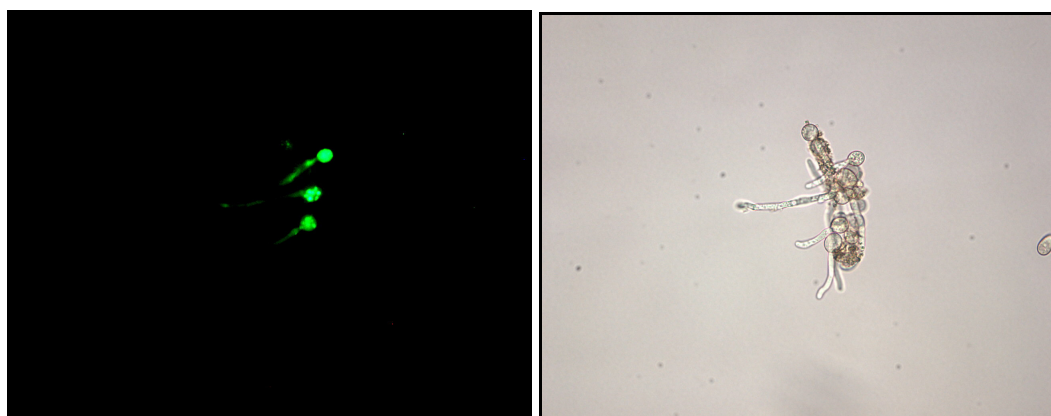


**Figura 65.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 8 horas en B5.



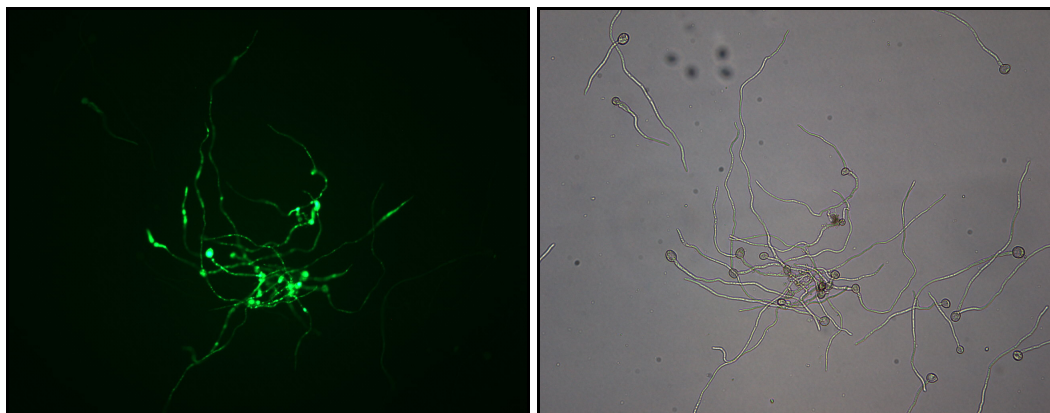
**Figura 66.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 8 horas en B5.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.



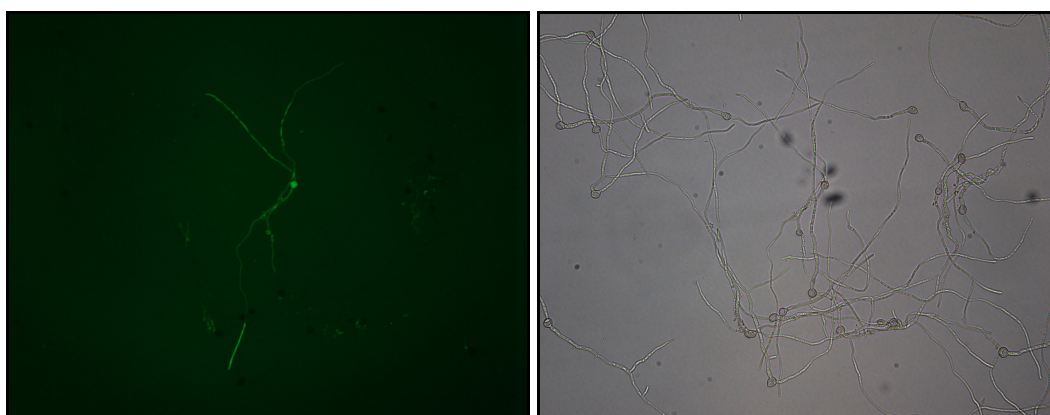
**Figura 67.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 10 horas en B5.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.



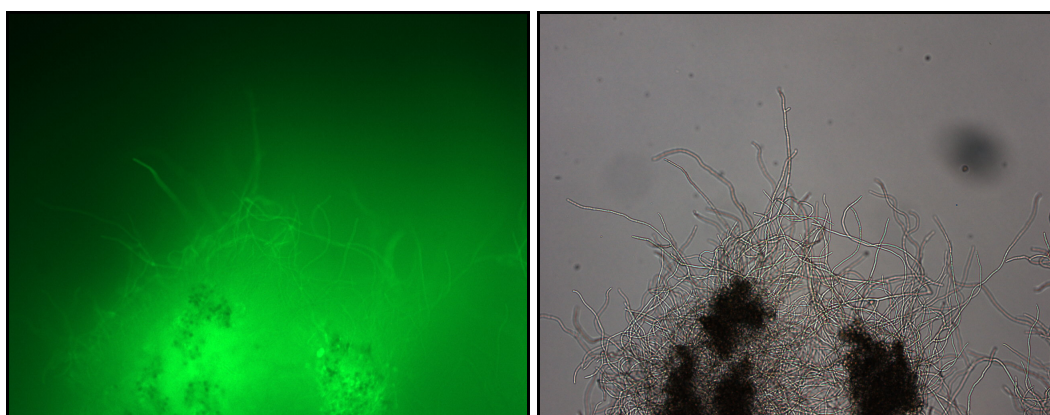
**Figura 68.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 12 horas en ME.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.



**Figura 69.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 12 horas en ME del mutante  $\Delta Bcfhg1$  (B16).

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.



**Figura 70.** Tinción DAF-2DA de esporas incubadas durante 20 horas en B5.

La Imagen de fluorescencia está situada a la izquierda y la correspondiente imagen en el espectro visible a la derecha.



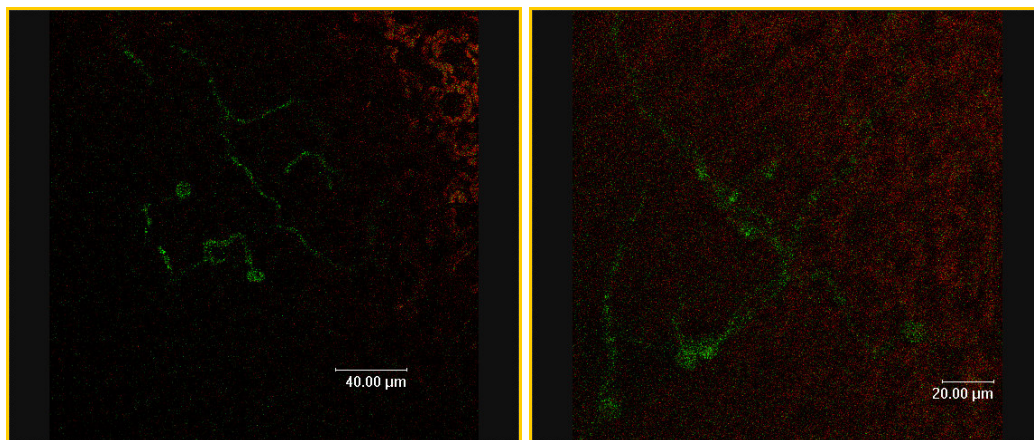
### **5.1.2. Infección *in planta***

El análisis de la producción de NO de *B. cinerea* en la planta huésped es importante para entender la producción de NO inducida con NO exógeno observada en el apartado 5.1. en un sistema real donde el hongo está expuesto al NO exógeno producido por la planta. Asimismo, ya que nuestro trabajo se centra en la interacción fitopatogénica del hongo, es imprescindible el estudio de la producción de NO durante la infección de *B. cinerea* en la planta.

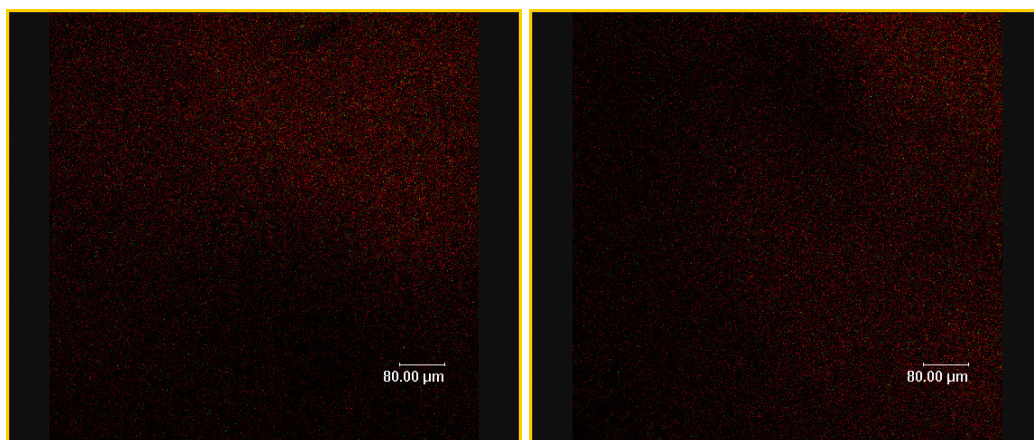
#### **5.1.2.1. INFECCIÓN EN TOMATE**

Durante la infección de *B. cinerea* cepa B05.10 en tomate a las 15, 24 y 48 h.p.i. se observa fluorescencia a lo largo de las hifas del hongo (Fig. 71, 73 y 75). Por tanto, el hongo está produciendo sistemáticamente NO durante la infección de la planta en una cantidad mucho mayor a la que produce la planta. Sin embargo, a las 72 horas de incubación la fluorescencia producida por la reacción de DAF-2DA con NO no fue detectada (Fig. 77). Se realizaron los controles pertinentes con c-PTIO a las 15, 24 y 48 h.p.i. (Fig. 72, 74 y 76) en los que no se observó fluorescencia debida a la reacción con DAF-2DA. A las 48 h.p.i se observó la mayor producción de NO, pudiéndose ver mas fotos a este tiempo en los apéndices.

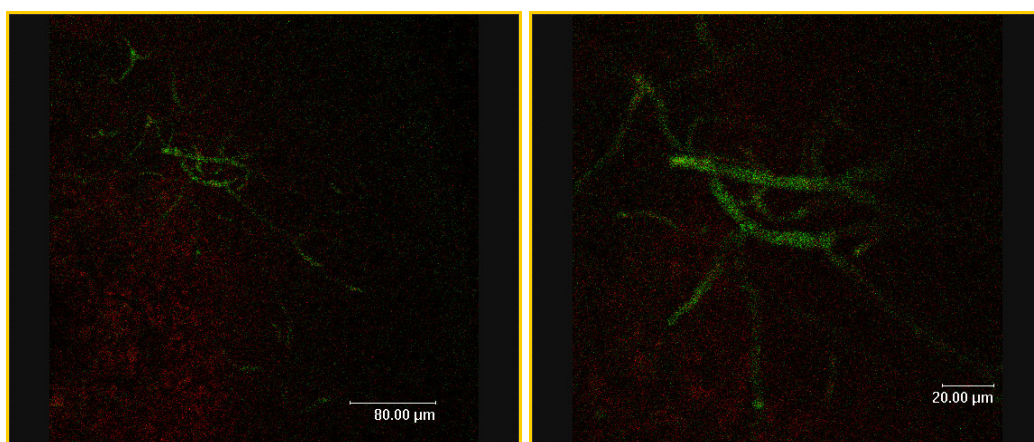
En todas las imágenes se ha eliminado el fondo producido por sustancias fluorescentes como la clorofila o los fenoles producidos durante la muerte celular vegetal enviando su señal al canal rojo de la imagen. De esta forma, podemos distinguir la señal real del DAF-2T de otras señales de compuestos de la planta que causan interferencias y falsos positivos.



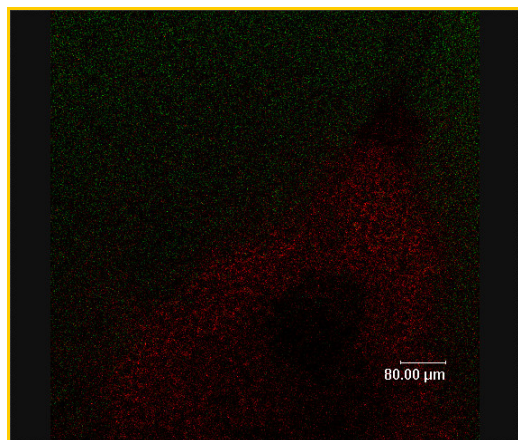
**Figura 71.** Tinción DAF-2DA a las 15 h.p.i. en hojas de tomate.



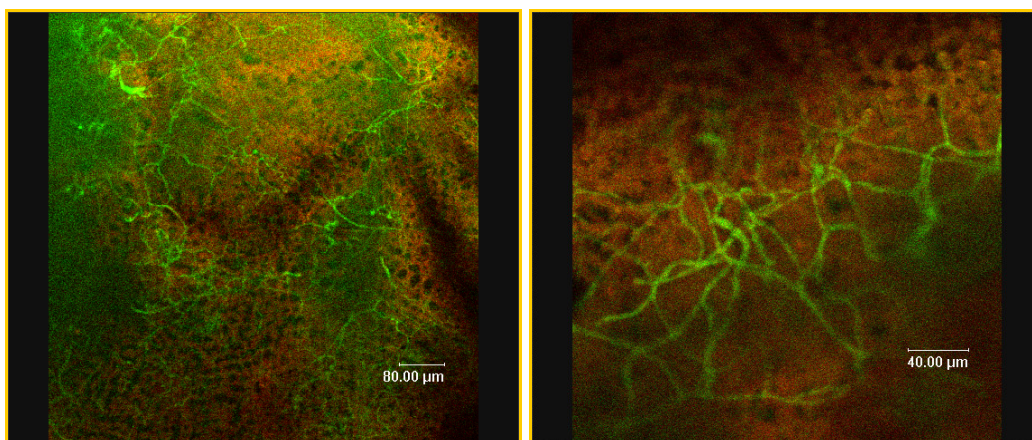
**Figura 72.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 15 h.p.i. en hojas de tomate.



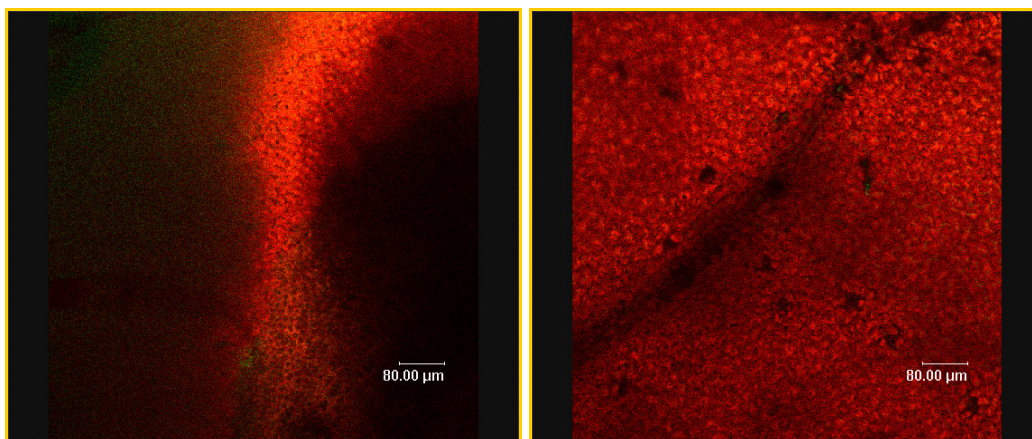
**Figura 73.** Tinción DAF-2DA a las 24 h.p.i. en hojas de tomate.



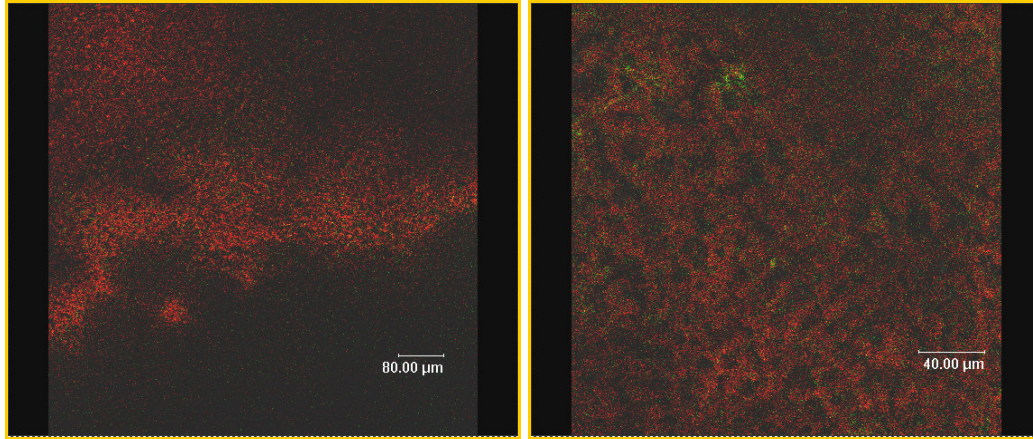
**Figura 74.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 24 h.p.i. en hojas de tomate.



**Figura 75.** Tinción DAF-2DA a las 48 h.p.i. en hojas de tomate.



**Figura 76.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 48 h.p.i. en hojas de tomate.



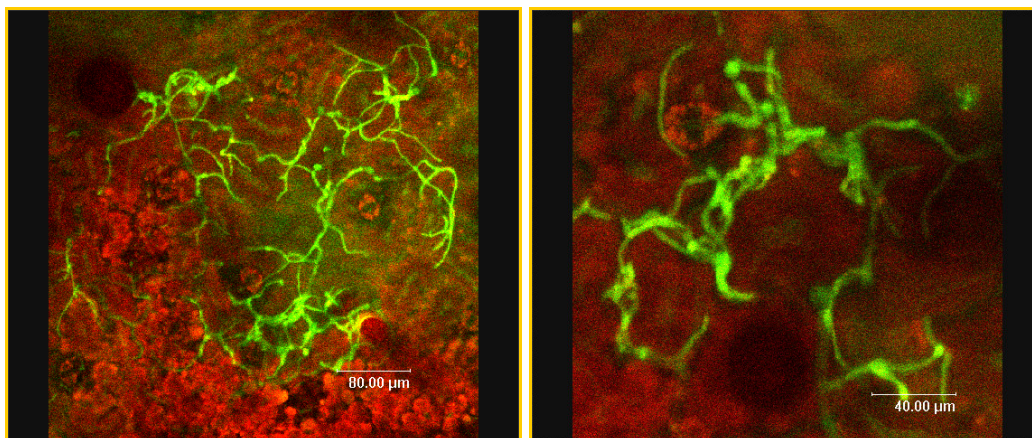
**Figura 77.** Tinción DAF-2DA a las 72 h.p.i. en hojas de tomate.

### 5.1.2.1. INFECCIÓN EN TABACO

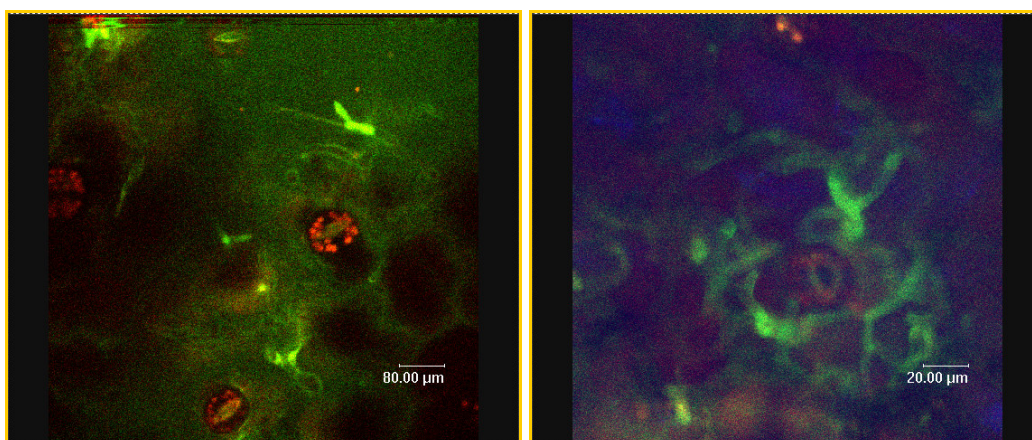
Para demostrar que la producción de NO observada en el apartado anterior no se debía a particularidades de la interacción de *B. cinerea* con tomate, se analizó el NO producido durante la infección en tabaco. Se utilizó la misma metodología que en tomate, la cual está descrita en el apartado de Materiales y Métodos y se observó el NO producido a lo largo del tiempo.

En tabaco se detecta producción de NO durante la infección de *B. cinerea* cepa B05.10. Visiblemente, el micelio a 20 h.p.i. produce grandes cantidades de NO, como se ve en la figura 78 y en los apéndices. A las 28, 48 y 75 h.p.i. la producción de NO por parte del hongo disminuye y se aprecia una producción de NO en células vegetales (Fig. 79, 81 y 83). Los patrones en los que se presenta la producción de NO son similares a los de tomate, aunque en tabaco el pico de producción de NO parece adelantarse un día y no se observa la reducción en la producción de NO a los 3 días. Este cambio en la cantidad de NO producida en cada tiempo de incubación parece que es debida al cambio que supone la diferencia de huésped.

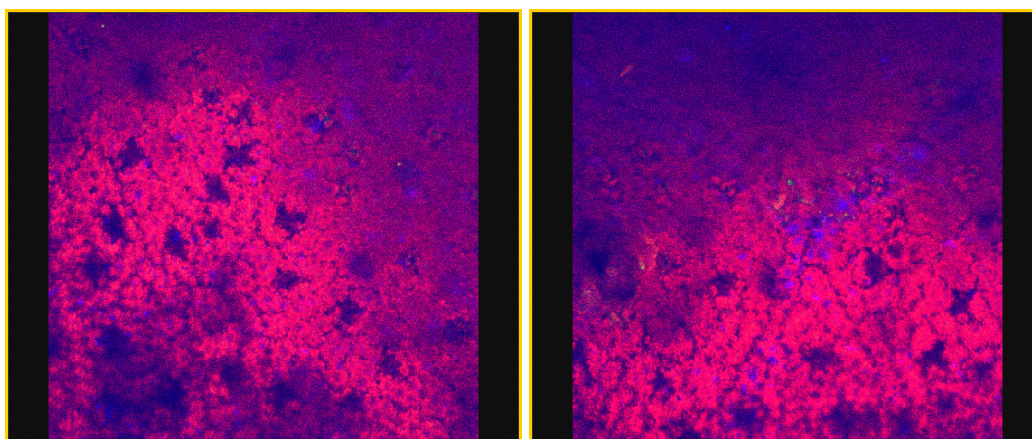
En este experimento, los controles con el secuestrador de c-PTIO en presencia de DAF-2DA, no mostraron fluorescencia en el mismo canal que emite el DAF-2T (Fig. 80, 82 y 84) y por tanto se confirman las observaciones realizadas.



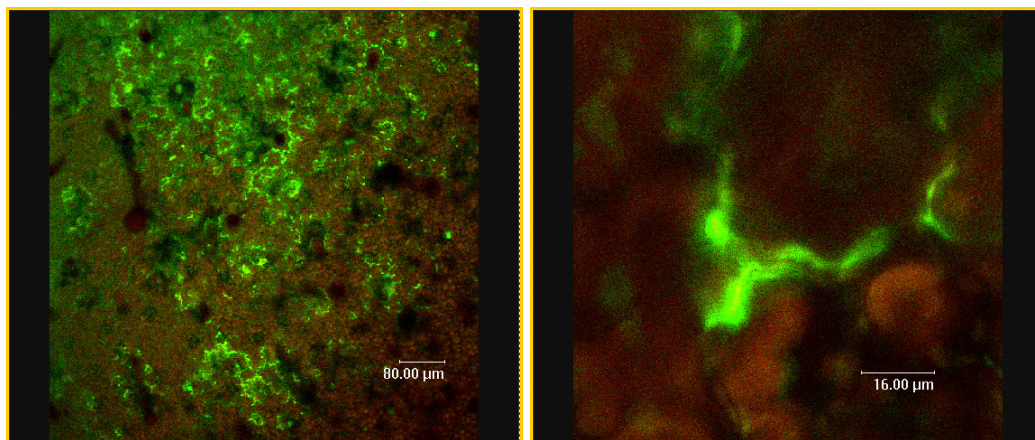
**Figura 78.** Tinción DAF-2DA a las 20 h.p.i. en hojas de tabaco.



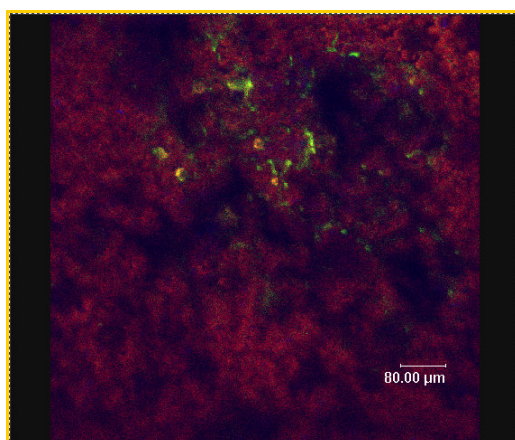
**Figura 79.** Tinción DAF-2DA a las 28 h.p.i. en hojas de tabaco.



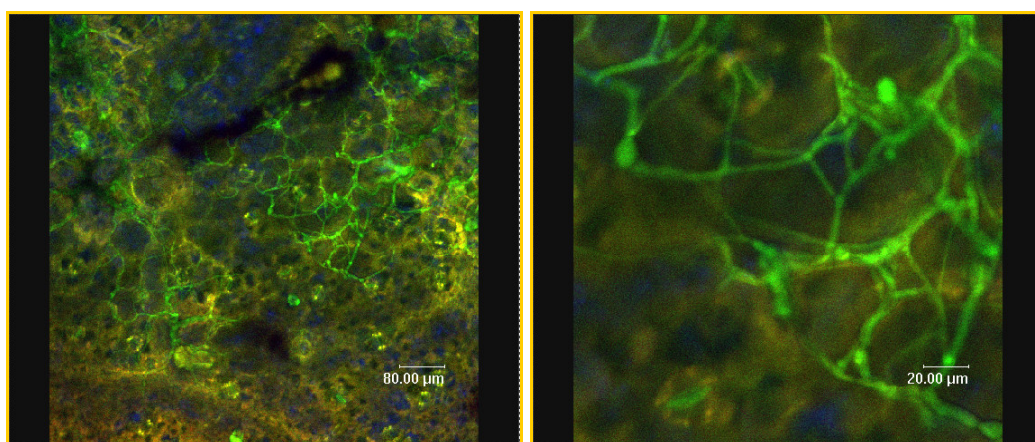
**Figura 80.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 28 h.p.i. en hojas de tabaco.



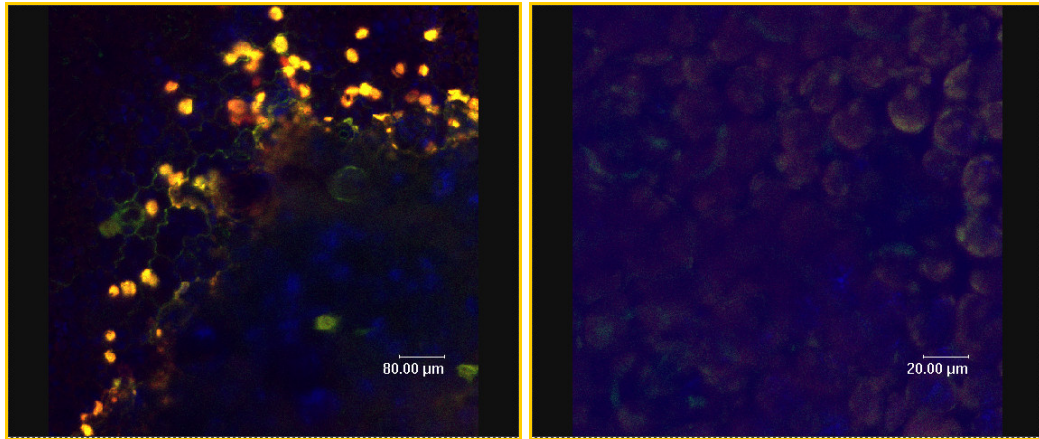
**Figura 81.** Tinción DAF-2DA a las 48 h.p.i. en hojas de tabaco.



**Figura 82.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 48 h.p.i. en hojas de tabaco.



**Figura 83.** Tinción DAF-2DA a las 75 h.p.i. en hojas de tabaco.



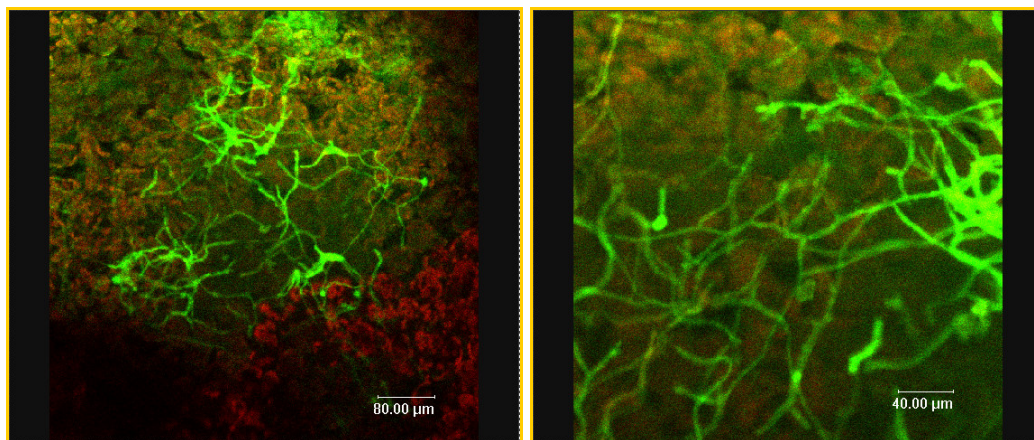
**Figura 84.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 75 h.p.i. en hojas de tabaco.

#### 5.1.2.1. INFECCIÓN EN *ARABIDOPSIS*

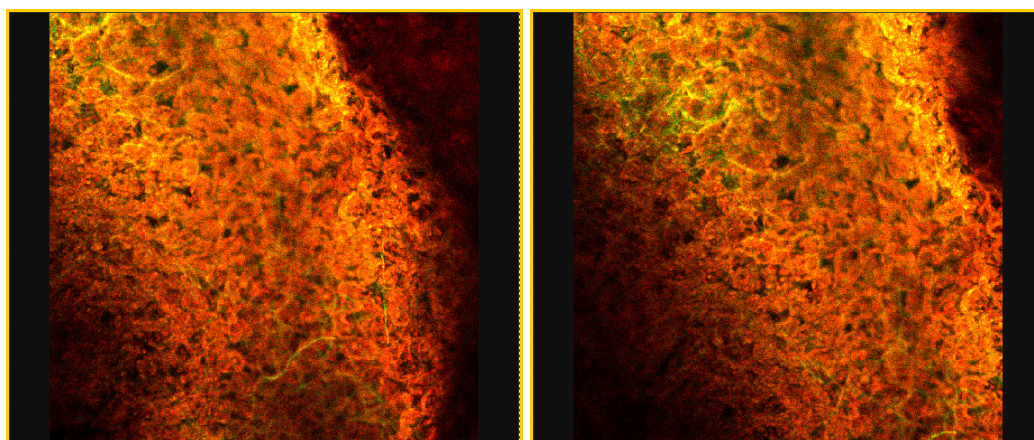
El efecto de la diferencia en la cantidad de NO producido en un determinado tiempo después de la inoculación entre los diferentes huéspedes se confirmó con las observaciones realizadas en *A. thaliana*. En este huésped la infección no es tan rápida como en los anteriores y por ello las mediciones de la producción de NO se realizaron a tiempos de incubación más largos.

La cepa Col-0 de *Arabidopsis* fue infectada con esporas de *B. cinerea* cepa B05.10. A las 72 h.p.i. se aprecia una gran producción de NO por el hongo y las células vegetales (Fig. 85 y Apéndices). En los huéspedes anteriores no se observa una producción tan importante de NO en tiempos tan tardíos como en *Arabidopsis*. Este fenómeno podría ser debido al retraso que sistemáticamente se observa en la infección de *Arabidopsis* respecto a los otros huéspedes que a su vez explicaría que en tabaco se presente el pico de producción de NO a tiempos menores de incubación que respecto a tomate.

Se realizaron controles con el secuestrador de NO c-PTIO para determinar si la fluorescencia observada se debía a la reacción con NO. Los controles no mostraron fluorescencia DAF-2DA debida a la reacción con otras sustancias químicas (Fig. 86), confirmando los experimentos realizados.



**Figura 85.** Tinción DAF-2DA a las 72 h.p.i. en hojas de *Arabidopsis*.



**Figura 86.** Control c-PTIO de la tinción DAF-2DA a las 72 h.p.i. en hojas de *Arabidopsis*.



## 6. VARIACIÓN EPIGENÉTICA EN *B. CINEREA*

El objetivo fundamental de este trabajo es valorar la función o funciones que pueda jugar la detoxificación de NO en la fisiología de *B. cinerea*, en particular en relación con la capacidad del patógeno para infectar a su planta huésped. El diseño experimental propuesto para llevar a cabo esta caracterización funcional es una aproximación genética basada en la obtención de mutantes deficientes en el gen codificador de la enzima que lleva a cabo dicha actividad enzimática, la enzima flavohemoglobina. Los mutantes obtenidos son comparados posteriormente con la cepa silvestre a partir de la cual han sido generados (en nuestro caso la cepa B05.10 conservada en la colección del Área de Genética de la Universidad de Salamanca, denominada EB05) en relación con las características fisiológicas que en cada momento se desea analizar. En principio, es posible asumir que las diferencias que puedan observarse en las cepas mutantes en relación con la cepa silvestre tendrán su origen en la mutación introducida. Esta aproximación supone que el proceso de obtención de mutantes no determina por sí mismo ninguna alteración en las cepas transformantes derivadas, en particular en las cepas mutantes generadas entre ellas. Un control garantizado respecto al cual se lleva a cabo la comparación es absolutamente esencial.

Durante la realización de nuestro trabajo, y teniendo en cuenta observaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio, reflexionamos sobre la idoneidad de la utilización como control de la cepa original de partida, ya que consideramos que los procedimientos experimentales que se aplican para producir protoplastos (utilización de extractos líticos para degradar la pared celular) y el procedimiento de transformación en sí mismo (que hace uso de PEG y de un tratamiento térmico) constituyen tratamientos ciertamente agresivos que determinan en el hongo una situación de estrés muy importante y frente a la cual el patógeno puede activar determinados mecanismos de defensa o de modificación de comportamiento. Por estas razones decidimos llevar a cabo, en todos los experimentos de transformación en los que se pretendía generar cepas mutantes,

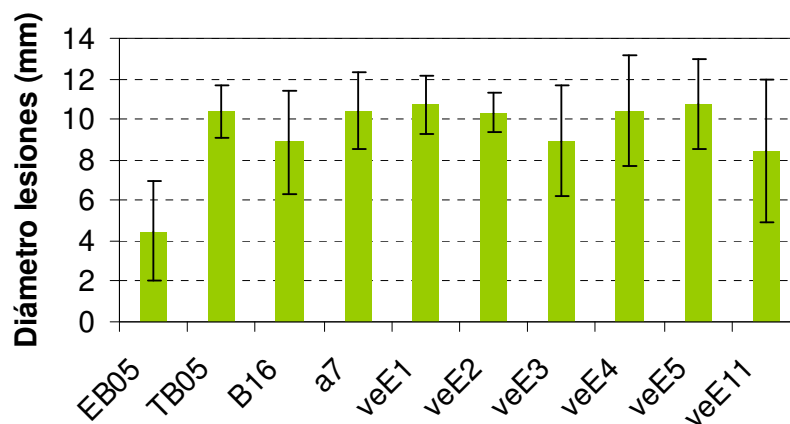
procedimientos de aislamiento de cepas del patógeno derivadas de protoplastos individuales que han sido sometidos exactamente a los mismos tratamientos a los que han sido sometidos los protoplastos a partir de los cuales se han regenerado las cepas mutantes con una única salvedad: no se ha añadido ADN transformante. Denominamos de manera genérica a estas cepas regenerantes, y consideramos que constituyen los controles ideales respecto a los cuales deben realizarse las comparaciones de las posibles alteraciones de las cepas mutantes. Si el procedimiento de transformación (obtención de protoplastos y tratamiento de choque térmico en presencia de PEG) no induce ninguna alteración en los protoplastos derivados, los regenerantes deben mostrar exactamente las mismas características que la cepa silvestre original.

Para obtener estas cepas regenerantes se aislaron protoplastos individuales regenerados a partir de las placas de medio SH en las que se sembraron las suspensiones de transformación, en este caso a partir de las placas correspondientes a las “transformaciones control” llevadas a cabo sin añadir ADN transformante y sobre las que no se vertió medio SH en cobertera con el agente selectivo (higromicina en una concentración de 70 µg/ml). Para el aislamiento, los protoplastos regenerados se transfirieron individualmente con ayuda de una aguja enmangada a placas de medio MEA transcurridas 24 horas desde la siembra de las suspensiones de transformación. Se purificaron un total de doce cepas regenerantes de las cuales seis han sido utilizadas en este trabajo en los experimentos que se describen a continuación.

Estas cepas regenerantes fueron comparadas inicialmente con la cepa EB05 en relación con tres características fisiológicas: (1) capacidad de infectar a la planta huésped; (2) capacidad de crecimiento saprofítico en medios sintéticos; y (3) producción de esclerocios en medios de cultivo sintéticos. Puesto que nuestro interés se centraba en la evaluación de las cepas mutantes  $\Delta Bc/fhg1$  y éstas fueron obtenidas y purificadas en el curso de los mismos experimentos de transformación, las dos cepas mutantes generadas, a7 y B16 fueron incluidas en este análisis comparativo. Finalmente, y puesto que sospechábamos desde un principio que la cepa EB05 mostraba un comportamiento extraño en nuestros experimentos de transformación, decidimos solicitar una nueva copia de dicha cepa procedente del laboratorio donde originalmente fue obtenida (Departamento de Botánica, Univiversidad de Münster,

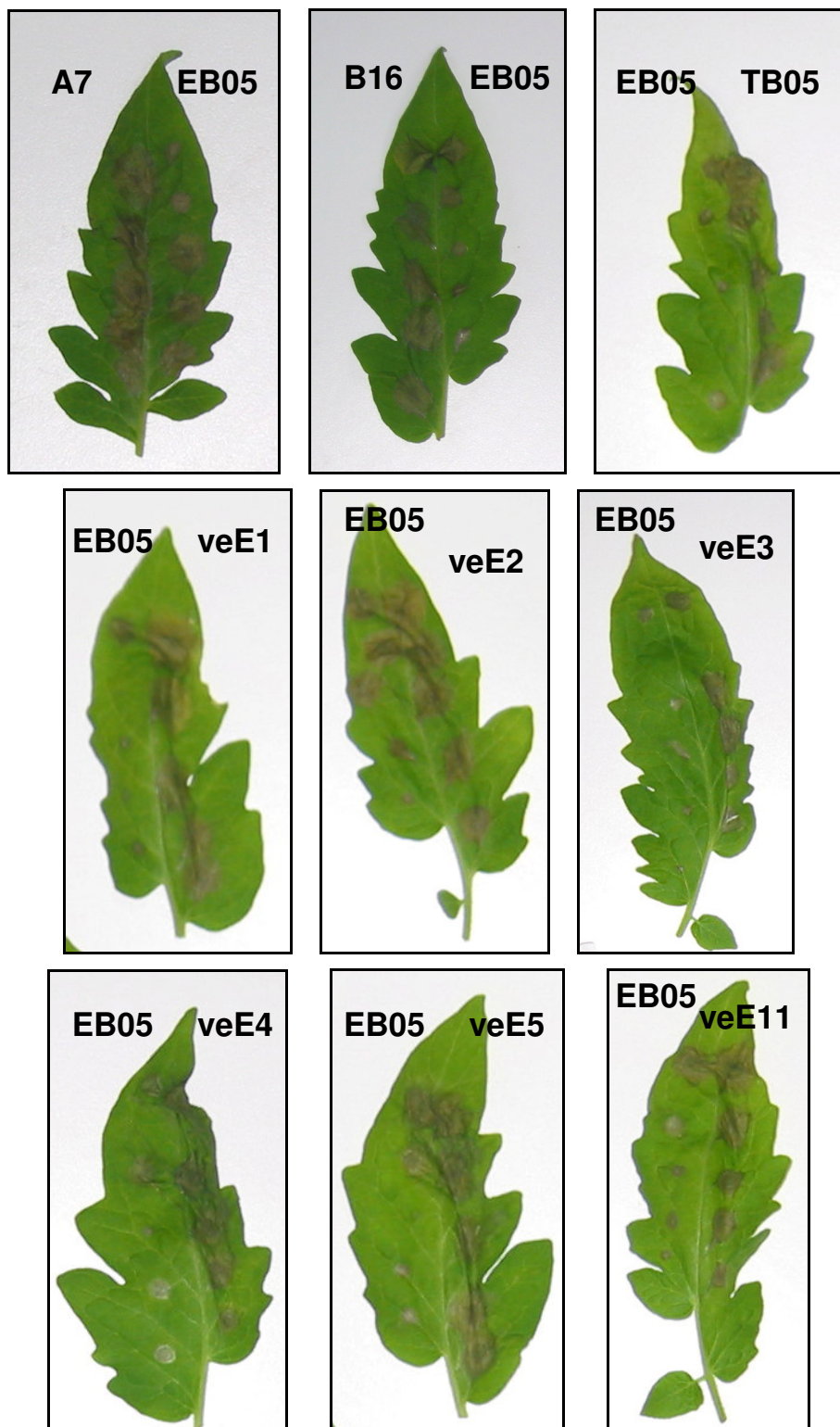
Alemania, Prof. Paul Tudzynski. (Buttner *et al.*, 1994)), laboratorio que nos cedió la misma estirpe (EB05) hace siete años. Esta nueva copia fue identificada como TB05.

Cuando los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7) fueron comparados con el tipo silvestre B05.10 (EB05) a partir del que se obtuvieron los mutantes, éstos parecían tener una mayor patogenicidad sobre hojas de plantas de tomate (Fig. 87 y 88). Sin embargo, cuando se utilizaron controles obtenidos a partir de regenerantes de la misma cepa original (EB05) y sometidos al mismo proceso de producción de protoplastos y transformación pero sin añadir ADN (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11), se obtenía el mismo fenotipo del mutante  $\Delta Bcfhg1$  (Fig. 87 y 88). Es de resaltar que todos los regenerantes obtenidos presentaban una mayor patogenicidad que el tipo silvestre original, EB05.



**Figura 87.** Variación epigenética del diámetro de la lesión producida en hojas de tomate por *B. cinerea* EB05.

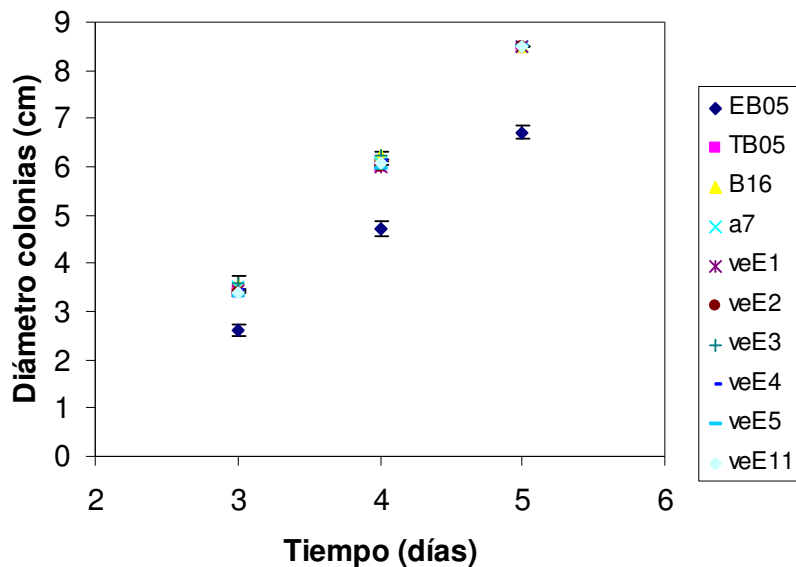
EB05 es la cepa original de donde los controles (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) fueron obtenidos; B16 y a7 ( $\Delta Bcfhg1$ ) son mutantes obtenidos de EB05; TB05 es el tipo silvestre B05.10 de diferente origen y manejo.



**Figura 88.** Variación epigenética en la infección sobre hojas de tomate de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* EB05.

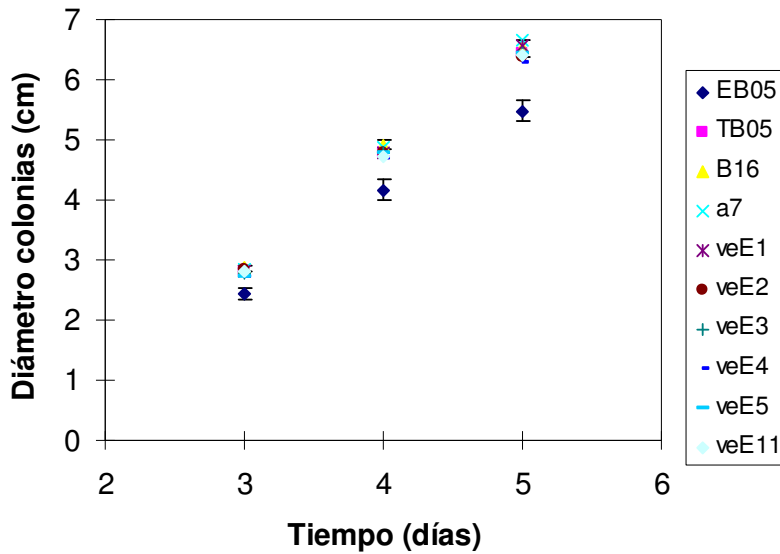
Los controles veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11 y los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7) fueron obtenidos de EB05; TB05 es el tipo silvestre B05.10 de diferente origen y manejo.

El crecimiento en medio sintético MEA y B5 de los regenerantes EB05 fue estadísticamente igual al de los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  como ya se ha descrito en el apartado 4.6. Sin embargo, cuando los comparamos con la cepa original, EB05, ésta mostró un menor crecimiento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) que los regenerantes EB05 y los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (Fig. 89 y 90). El descenso en el crecimiento saprofítico de EB05 respecto a sus regenerantes y mutantes se correlaciona con el descenso de virulencia en EB05. Por esta razón, la menor capacidad de crecimiento saprofítico de EB05 tiene un efecto directo en el descenso de virulencia en el huésped.



**Figura 89.** Variación epigenética del crecimiento saprofítico en medio MEA de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen EB05.

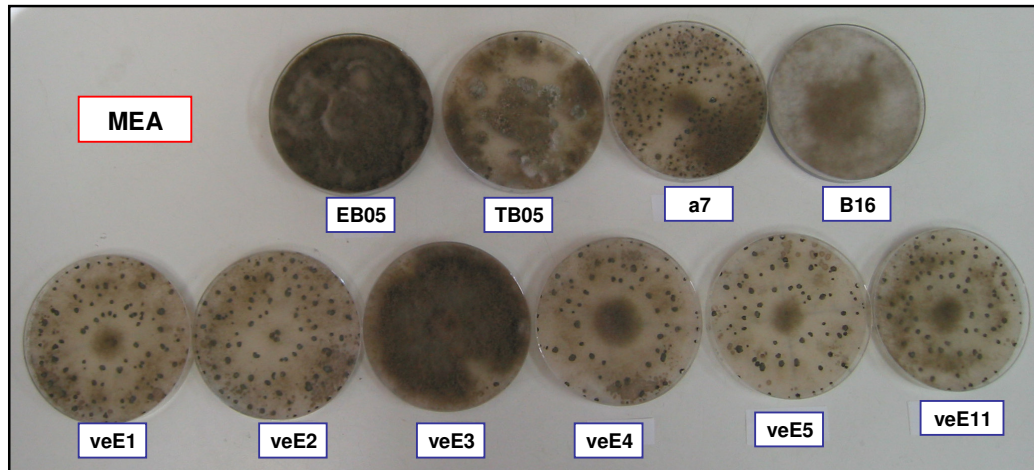
EB05 es la cepa original de donde los controles (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) fueron obtenidos; B16 y a7 ( $\Delta Bcfhg1$ ) son mutantes obtenidos de EB05; TB05 es el tipo silvestre B05.10 de diferente origen y manejo.



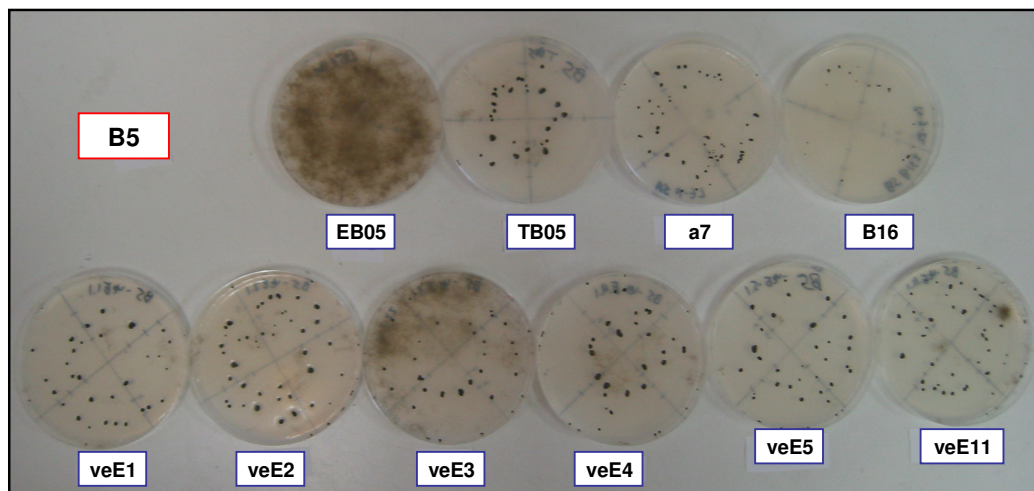
**Figura 90.** Variación epigenética del crecimiento saprofítico en medio B5 de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen EB05.

EB05 es la cepa original de donde los controles (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) fueron obtenidos; B16 y a7 ( $\Delta Bcfhg1$ ) son mutantes obtenidos de EB05; TB05 es el tipo silvestre B05.10 de diferente origen y manejo.

La producción de esclerocios en medios de cultivo sintéticos es otro fenotipo que distingue a EB05 de los regenerantes y mutantes. Los regenerantes (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) y mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7) presentan un mayor número de esclerocios que EB05 tanto en el medio de cultivo MEA (Fig. 91) como en el medio de cultivo B5 (Fig. 92). Asimismo, se puede observar que EB05 presenta una mayor producción de conidios que los regenerantes y los mutantes. Las diferencias entre EB05 y los regenerantes EB05 y mutantes  $\Delta Bcfhg1$  se hacen más evidentes en el medio B5 que en MEA y, por tanto, un medio de cultivo pobre en nutrientes potencia el fenotipo observado.



**Figura 91.** Variación epigenética de la producción de esclerocios en MEA de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* EB05, mutantes  $\Delta Bcfhg1$  y TB05.

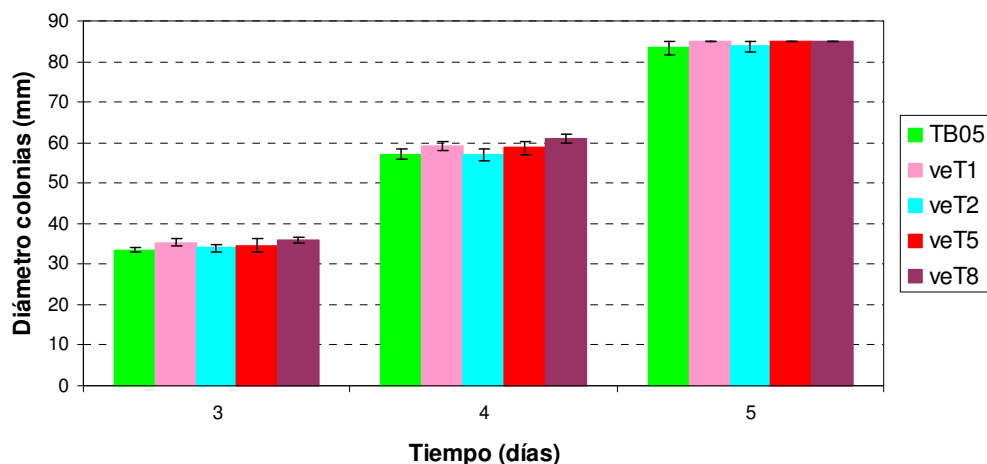


**Figura 92.** Variación epigenética de la producción de esclerocios en B5 de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* EB05, mutantes  $\Delta Bcfhg1$  y TB05.

El fenotipo de la cepa TB05 respecto a su capacidad de infectar la planta huésped, capacidad de crecimiento saprofito y producción de esclerocios es similar a los controles de la transformación de EB05 (veE1, veE2, veE3, veE4, veE5 y veE11) y mutantes  $\Delta Bcfhg1$  obtenidos a partir de EB05 (B16 y a7). Asimismo, EB05 tiene una menor vilurencia en planta y crecimiento saprofito, una menor producción de esclerocios y una mayor producción de conidios que TB05 (Fig. 87 a 92).

Para comprobar si el fenotipo de TB05 sufría variaciones epigenéticas, se procedió a someter a esta cepa a los procesos de transformación fúngica. La transformación de TB05 se realizó de igual manera que la descrita para EB05 sin incluir ADN en la transformación para obtener regenerantes e incluyendo un control con ADN el cual incorporaba la construcción de resistencia a higromicina. El crecimiento del control en presencia de higromicina nos permitía afirmar que la transformación y procesos de estrés a los que se sometió al hongo fueron los mismos que en los experimentos anteriores, ya que dan lugar a la incorporación de ADN recombinante en el genoma del hongo. Se recuperaron los regenerantes veT1, veT2, veT5 y veT8, los cuales fueron purificados mediante réplicas y cultivos monospóricos. Su fenotipo fue analizado frente a la cepa original TB05.

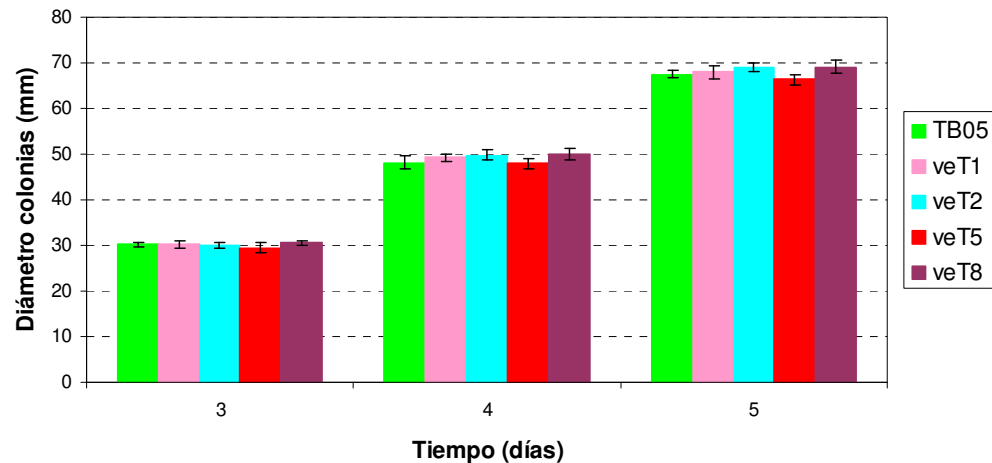
El análisis de virulencia *in planta* no se realizó para los regenerantes TB05 ya que, como se ha visto en el experimento anterior con los regenerantes EB05, ésta presenta correlación con el crecimiento saprofitico en medio sintético. El análisis del crecimiento saprofitico de los regenerantes TB05 no mostró diferencias respecto a la cepa madre TB05 tanto en MEA (Fig. 93) como en B5 (Fig. 94). De este modo, parece que no existen diferencias epigenéticas respecto al crecimiento saprofitico.



**Figura 93.** Variación epigenética del crecimiento saprofitico en MEA de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen TB05.

TB05 es la cepa de donde los controles (veT1, veT2, veT5 y veT8) fueron obtenidos.



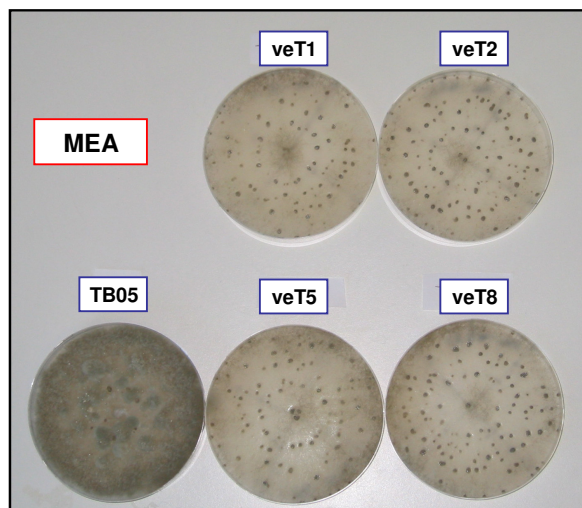


**Figura 94.** Variación epigenética del crecimiento saprofítico en medio B5 de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen TB05.

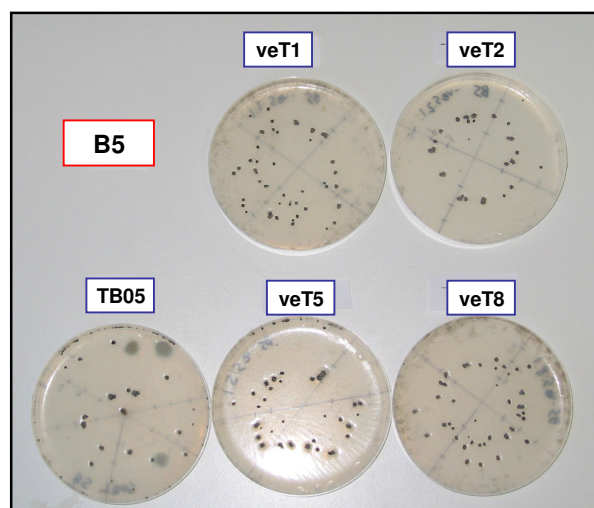
TB05 es la cepa de donde los controles (veT1, veT2, veT5 y veT8) fueron obtenidos.

Sin embargo, aunque los regenerantes de TB05 y TB05 presentan semejanzas en su crecimiento saprofítico, al analizar su fenotipo respecto a la producción de esclerocios y conidios, las diferencias epigenéticas observadas con EB05 empiezan a surgir. Los regenerantes de TB05 tienen una producción de esclerocios mayor que TB05 tanto en medio MEA (Fig. 95) como en medio B5 (Fig. 96). Asimismo, aunque no se presenta producción de conidios en B5 cuando ésta se observa en el medio MEA (Fig. 95), TB05 presenta una abundante conidiación mientras que en los regenerantes es muy escasa.

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos similares con la cepa T4, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con EB05. Parece que el fenómeno epigenético observado durante el estrés al que se somete al hongo durante la transformación está ampliamente conservado en *B. cinerea* y consiste en una reducción de la virulencia, crecimiento saprofítico y producción de conidios y un incremento en la producción de esclerocios.



**Figura 95.** Variación epigenética de la producción de esclerocios en MEA de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen TB05.



**Figura 96.** Variación epigenética de la producción de esclerocios en B5 de los controles de la transformación de la cepa de *B. cinerea* B05.10 origen TB05.

## 7. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *BCFHG1*

Teniendo en cuenta los datos derivados del análisis de los patrones de expresión de *Bcfhg1* descritos en la sección 2, y asumiendo un posible papel en la infección de este gen, se decidió expresar el gen *Bcfhg1* constitutivamente modificando su patrón de expresión natural. Para ello, se utilizó el promotor del gen *trpC* de *A. nidulans* obtenido del vector pSilent1 desconociendo en principio, el funcionamiento de este promotor en *B. cinerea*. Así, se introdujo la secuencia de la región codificante de *Bcfhg1* en el polilinker del vector, obteniéndose la construcción de transformación pSilent-Bcfhg1. De esta forma, tanto la expresión de *Bcfhg1* como la síntesis del gen que proporciona resistencia a higromicina, quedan bajo el control de la secuencia promotora del gen *trpC* de *A. nidulans*.

La transformación con pSilent-Bcfhg1 se repitió varias veces sin obtener ningún transformante. Se optó por incluir en paralelo un control positivo con el vector pLOB1, el cual lleva el gen de resistencia a la higromicina bajo el control del promotor OliC. Después de varias transformaciones se observó que mientras en la transformación con pLOB1 se obtenían transformantes, la transformación paralela con pSilent y pSilent-Bcfhg1 no tenía éxito. Por lo tanto, el promotor del gen *trpC* de *A. nidulans* no produce expresión en *B. cinerea*.

## 8. SILENCIAMIENTO EN *B. CINEREA*

### 8.1. ARGININOSUCCINATO SINTASA

El casete de resistencia a la higromicina usado para la generación de mutantes carentes del gen *Bcfhg1* proviene del vector pLOB1 (número de acceso Genbank AJ439603 (Kars *et al.*, 2005a)) el cual se compone del promotor OliC de *A. nidulans* de 847 pares de nucleótidos, la secuencia codificadora del gen de resistencia a higromicina de 1.017 pares de nucleótidos, el extremo 3' de la región codificadora de la argininosuccinato sintasa (*Bcass1*) de 436 pares de nucleótidos y el terminador de la *Bcass1* de 288 pares de nucleótidos. La región terminal de la secuencia codificante del gen *Bcass1* junto con su terminador fue purificada como un fragmento *EcoRV* – *EcoRV* de 724 pares de nucleótidos. Cuando el plásmido pLOB1 fue construido no se disponía de la secuencia completa del genoma de *B. cinerea* en función de la cual se ha construido el mapa de restricción de la región que incluye los genes *BctubA* y *Bcass1* (Fig. 97). Sólo se disponía entonces de la secuencia del gen *BctubA* y de un mapa de restricción que, por error, ubica incorrectamente el fragmento *EcoRV* – *EcoRV* indicado anteriormente a continuación del codón de terminación del gen *BctubA* y en lugar del fragmento *EcoRV* – *EcoRV* de 2.018 pares de nucleótidos que realmente ocupa esa posición. Se pretendía fusionar la región codificante del gen que determina resistencia a higromicina al terminador del gen *BctubA* pero, en su lugar, se fusionó al extremo 3' de la región codificante del gen *Bcass1* y su terminador. Es interesante destacar que, desde el punto de vista funcional, el fragmento clonado permite la expresión del gen de resistencia a higromicina en *B. cinerea* (Brito *et al.*, 2006)

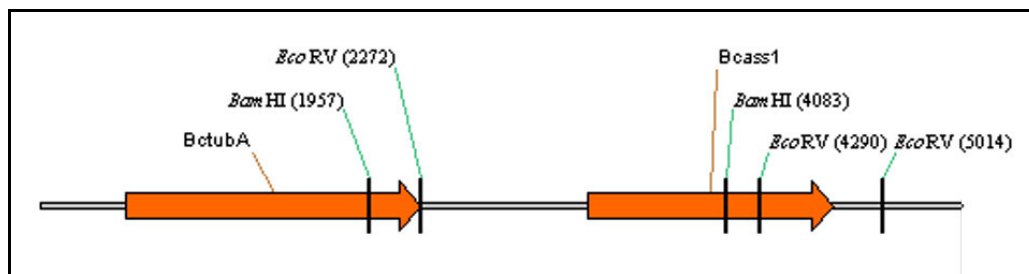


Figura 97. Mapa de restricción del gen *BctubA* y *Bcass1*.

La inclusión de un fragmento de la secuencia codificante de *Bcass1* en fase con el gen que proporciona resistencia a la higromicina podría producir silenciamiento de *Bcass1* en los mutantes generados (Nakayashiki *et al.*, 2005). El silenciamiento de este gen podría causar la modificación del fenotipo del hongo ya que la argininosuccinato sintasa es una enzima esencial en la producción de arginina siguiendo el ciclo de la urea (Fig. 98).

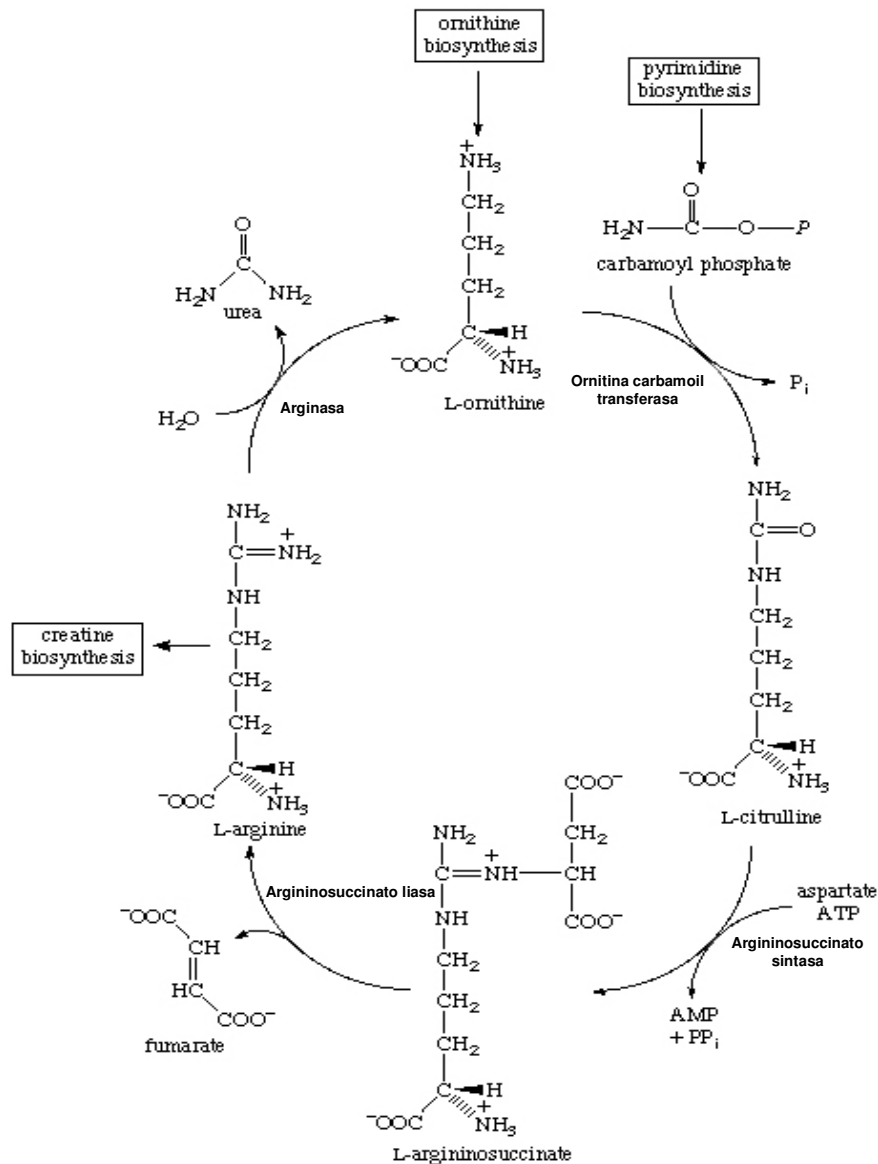
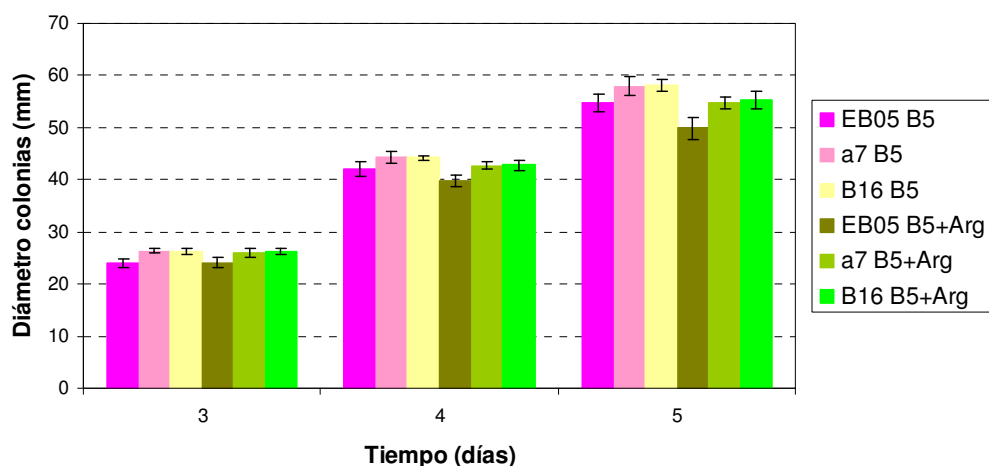
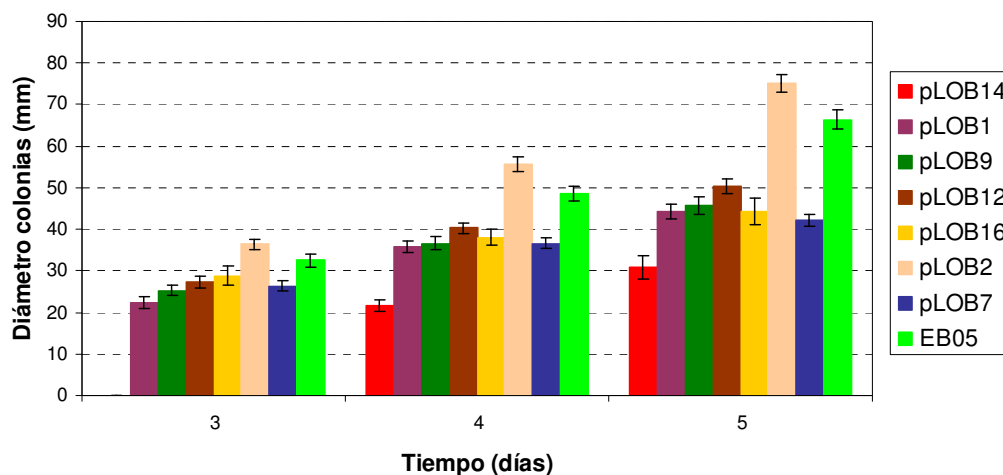


Figura 98. Ciclo de la urea.

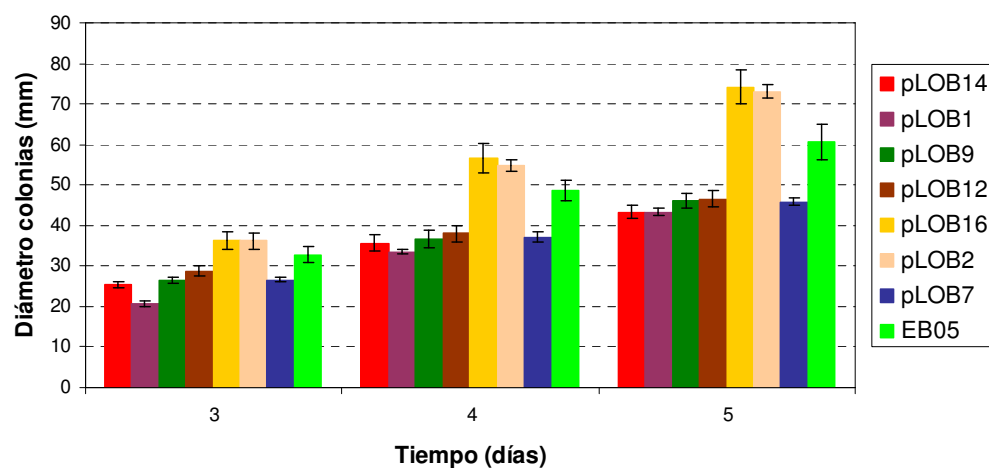
Los mutantes de *Bcfhg1* (a7 y B16) no mostraban ningún problema al crecer en un medio sin arginina (Fig. 99). Sin embargo, para ver si existe efecto de silenciamiento y su posible uso como herramienta genética, se transformó la cepa B05.10 (EB05) con el vector pLOB1. Los transformantes pLOB14 y pLOB 16 mostraron una reducción de su crecimiento en medio sin fuente de arginina respecto a su comportamiento en un medio en presencia de arginina, tal y como se observa en las figuras 100 y 101. Dos de los 7 transformantes analizados (pLOB16 y pLOB2), presentaban un crecimiento mayor que el tipo silvestre (EB05) en medio con arginina (B5+Arg) tal y como sucede en los casos de variación epigenética durante la transformación descritos en la sección 6 del capítulo de resultados. Los otros 5 transformantes presentaban un menor crecimiento posiblemente debido a alteraciones consecuencia de la integración de copias del plásmido transformante en regiones dadas del genoma.



**Figura 99.** Crecimiento saprofítico en B5 y B5+Arginina de los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  (B16 y a7) y tipo silvestre (EB05).

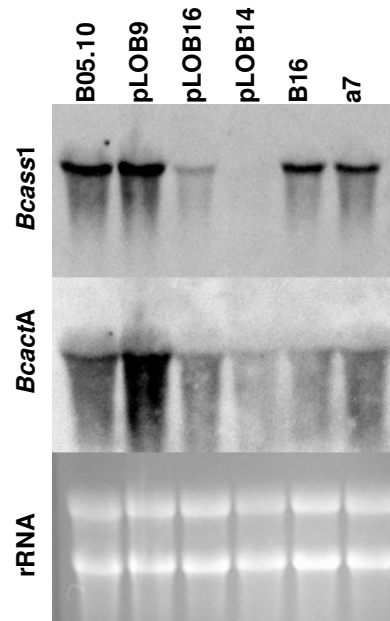


**Figura 100.** Crecimiento saprofítico en B5 de los transformantes producidos con el vector pLOB1.



**Figura 101.** Crecimiento saprofítico en B5+Arginina de los transformantes producidos con el vector pLOB1.

El análisis tipo Northern confirmaba que el fenotipo de pLOB14 y pLOB16 se debía a una reducción de la transcripción de *Bcass1* (Fig. 102). Interesantemente, la reducción en la expresión del gen *Bcass1* se correlacionaba con la reducción en el crecimiento en medio sin arginina.



**Figura 102.** Análisis Northern de transformantes obtenidos con el plásmido pLOB1 y de la cepa control, cultivados durante 12h a 22 °C en PDB.

Los nombres indicados en la parte superior de la imagen indican las cepas analizadas. Los nombres situados a la izquierda reflejan los genes a los que se refiere cada línea.

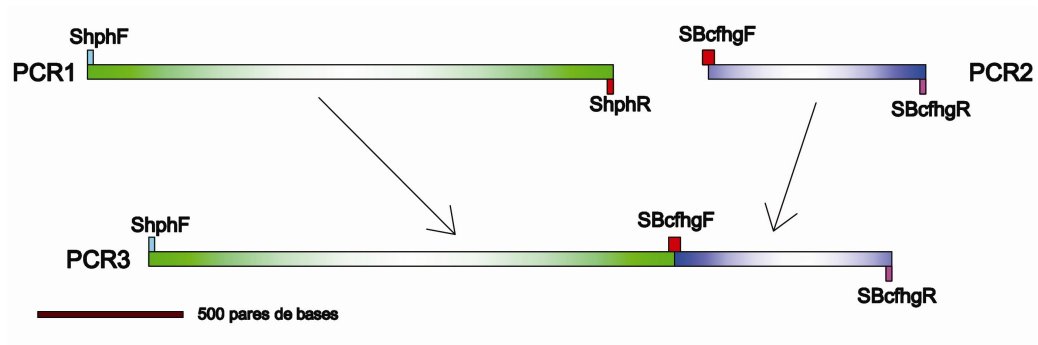
## 8.2. FLAVOHEMOGLOBINA

El silenciamiento observado en el gen *Bcass1* nos abre la posibilidad de utilizar un sistema similar en otros genes como una herramienta genética eficaz ya que la construcción de transformación es simple y nos permite reducir la expresión a diferentes niveles. El estudio del silenciamiento con un sistema similar al utilizado en *Bcass1* se investigó en el gen *Bcfhg1*. Una de las grandes ventajas del estudio de *Bcfhg1* es que la actividad de la enzima se puede medir con un sistema sencillo y preciso mediante el análisis de la degradación de NO. Asimismo, el silenciamiento del gen *Bcfhg1* nos permite profundizar en el estudio del metabolismo del NO.

La construcción de transformación para producir el silenciamiento de *Bcfhg1* se realizó mediante PCR (Kars *et al.*, 2005a). En primer lugar se amplificó el promotor del gen *OliC* de *A. nidulans* seguido del gen de resistencia a la higromicina del vector pLOB1 con los primers ShphF y ShphR produciendo un fragmento de 1.811 pares de nucleótidos. Después se amplificaron los últimos 390 pares de de



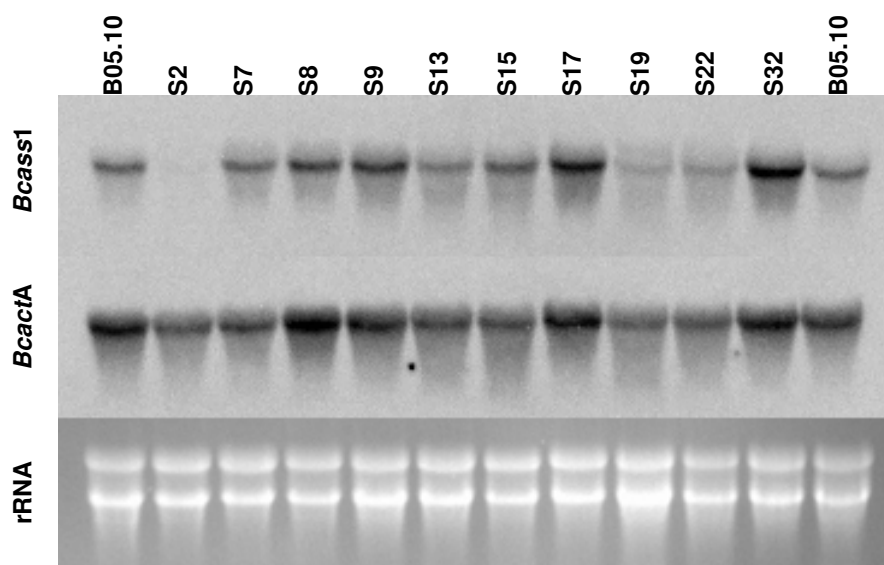
nucleótidos del extremo 3' de la región codificante de *Bcfhg1* seguidos del terminador del gen con los primers SBcfhgF y SBcfhgR amplificándose un fragmento de 749 pares de nucleótidos. Los dos fragmentos se fusionaron en una segunda reacción de PCR usando como molde 50 ng de cada producto de PCR y los primers ShphF y SBcfhgR (Fig. 103).



**Figura 103.** Esquema a escala de la construcción del vector de transformación de silenciamiento del gen *Bcfhg1* mediante PCR.

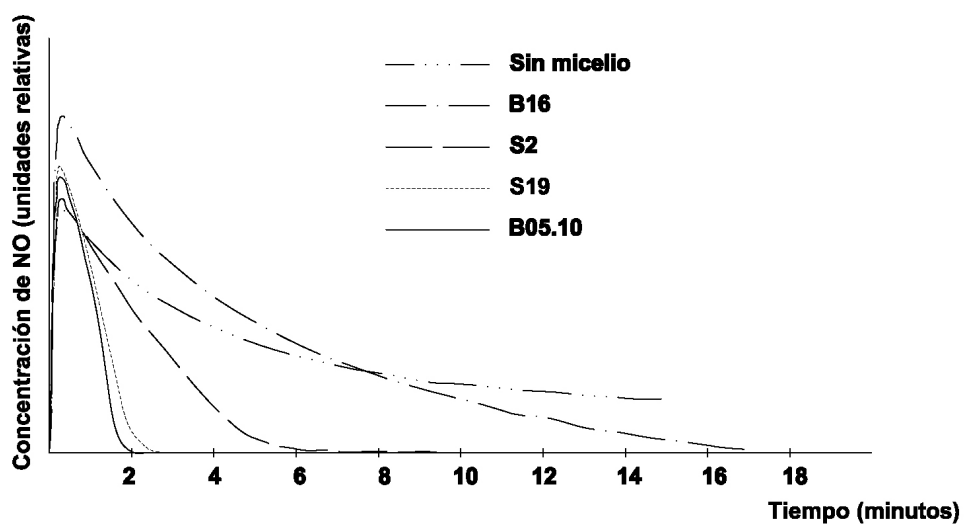
Posteriormente, se transformó la cepa B05.10 (TB05) con 4  $\mu$ g de producto de PCR aislándose 10 transformantes que fueron purificados en forma de cultivo monospóricico. El análisis por Northern de la expresión de *Bcfhg1* mostraba que de los 10 transformantes 3 estaban silenciados a diferentes niveles: S2, S19 y S22 (Fig. 104). El transformante S2 mostraba el mayor nivel de silenciamiento hasta casi desaparecer la expresión.

El fenotipo de los transformantes silenciados fue analizado midiendo su capacidad de degradación de NO. Las muestras fueron recogidas a las 8 horas de incubación de cultivos de 100 ml de B5. Como control positivo se utilizó el tipo silvestre (B05.10) y como control negativo se utilizó un mutante obtenido por reemplazamiento génico (B16). Los transformantes S19 y S22 presentaban una pendiente de degradación de NO similar al tipo silvestre a pesar de la menor expresión de *Bcfhg1* (Fig. 105). Este fenómeno, junto a la linealidad de la pendiente de degradación del tipo silvestre, muestra la eficiencia de la enzima flavohemoglobina de *B. cinerea* en la degradación de NO. De hecho, el silenciamiento del gen hasta niveles casi no detectables, como es el caso del transformante S2, muestra degradación enzimática de NO, aunque ésta es menor que la del tipo silvestre pero sin llegar a los extremos del mutante  $\Delta Bcfhg1$  (Fig. 105).



**Figura 104.** Análisis Northern de transformantes obtenidos con la construcción de silenciamiento *Bcfhg1* y de la cepa control.

Las muestras fueron cultivadas durante 6h a 22 °C en B5 + 10mM Sucrosa + 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los nombres indicados en la parte superior de la imagen indican las cepas analizadas. Los nombres situados a la izquierda reflejan los genes a los que se refiere cada panel.



**Figura 105.** Cinética de degradación de  $2\mu\text{M}$  NO en transformantes silenciados para *Bcfhg1*.

B16 es el mutante  $\Delta Bcfhg1$ , S2 y S19 son los transformantes silenciados para *Bcfhg1* y B05.10 es el tipo silvestre.

## **DISCUSIÓN**



## 1. FLAVOHEMOGLOBINA DE *BOTRYTIS CINEREA*

*B. cinerea* posee un único gen codificador de enzimas de tipo flavohemoglobina (*Bcfhg1*). Ésta contiene los dominios hemoglobina y de unión de FADH y NADH propios de este tipo de proteínas, necesarios para la degradación de NO (Hernandez-Urzua *et al.*, 2003).

BcFHG1 es homóloga a las flavohemoglobinas de otros hongos y bacterias. Las relaciones filogenéticas deducidas del análisis comparativo de la secuencia de BcFHG1 con otras proteínas de tipo flavohemoglobina muestran una buena correlación con la reconstrucción del árbol filogenético de los hongos (James *et al.*, 2006). De este modo, la flavohemoglobina de *S. sclerotiotum*, la especie más próxima filogenéticamente a *B. cinerea*, es la que muestra una mayor homología en su secuencia de aminoácidos con BcFHG1. Las ramas en las que se ubican las demás flavohemoglobinas de hongos filamentosos se separan en el árbol construido siguiendo el patrón evolutivo de este grupo de organismos.

En el árbol que hemos construido se puede apreciar que muchos hongos, tales como *Fusarium*, *Neurospora*, *Podospora* o *Aspergillus*, presentan varias copias de genes codificadores de flavohemoglobina. Apreciamos que los diferentes homólogos del gen dentro de la misma especie no se agrupan en la misma rama. Por otra parte, en algunas especies se observa que una copia concreta presenta mayor homología con copias de otras especies de hongos que con las demás copias de la misma especie. Así, las flavohemoglobinas de *Aspergillus* se agrupan en dos ramas y las de *Fusarium* en cuatro ramas, compartiendo este último dos ramas con las respectivas de *Aspergillus*. Este fenómeno probablemente es debido a duplicaciones del gen en ancestros comunes muy tempranos. En el caso de los hongos que sólo presentan una copia del gen o que carecen de copias del gen en determinadas ramas, la ausencia de éstas quizás se deba a fenómenos de pérdida de los genes duplicados. Por tanto, en el caso de las flavohemoglobinas de hongos observamos que se han producido fenómenos tanto de duplicación como de pérdida de copias duplicadas.

La situación observada en el caso de las levaduras es interesante. El árbol filogenético de los hongos (James *et al.*, 2006) ubica a las levaduras dentro de los ascomicetos. Sin embargo, considerando el árbol filogenético de las flavohemoglobinas, las proteínas de las levaduras se agrupan entre sí, separándose de las de hongos y procariotas. Debido al origen ancestral de las flavohemoglobinas, anterior a la divergencia de eucariotas y procariotas, y siempre que no hayan existido transferencias horizontales de genes (Zhu y Riggs, 1992), esta divergencia de las levaduras con los hongos filamentosos puede deberse a al menos dos fenómenos de duplicación de genes y posterior pérdida de alguna copia de los mismos antes de la aparición evolutiva de los hongos. Los trabajos llevados a cabo por otros autores (Liu *et al.*, 2000) han mostrado una cierta proximidad de la flavohemoglobina de *S. cerevisiae* a la de los *Bacillus*.

La presencia de múltiples copias del gen de la flavohemoglobina en algunos hongos probablemente pueda deberse a que éstas les confieren ventajas evolutivas específicas en su desarrollo. En el caso de *F. oxysporum*, especie en la que encontramos 3 copias del gen, la flavohemoglobina puede actuar como agente detoxificador del NO producido durante los procesos de denitrificación que el hongo es capaz de realizar (Fujii y Takaya, 2008). Otros hongos no tienen la capacidad de denitrificación. Sin embargo, pueden desarrollarse en ambientes en los que se encuentran con grandes cantidades de NO producidas por bacterias denitrificantes, como puede ser el caso de *Aspergillus*. Otra posible función que pueden desempeñar las flavohemoglobinas en el caso de especies de microorganismos patógenos y que puede favorecer la presencia de múltiples copias de genes de flavohemoglobinas, es la de prevenir la activación de la respuesta de hipersensibilidad (HR) en la planta huésped (Boccarda *et al.*, 2005). Por otra parte, es posible considerar que en algunos casos determinadas copias pueden carecer de función y/o expresión. En *C. albicans*, de las tres flavohemoglobinas que posee sólo una se induce con NO y es responsable de la degradación de NO (Ullmann *et al.*, 2004), aunque su efecto en patogenicidad no sólo se debe a la actividad de degradación de NO de la enzima codificada por el gen inducido (Hromatka *et al.*, 2005).

## 2. EXPRESIÓN DE *BCFHG1*

La flavohemoglobina de *B. cinerea* se expresa durante todos los estados de desarrollo del hongo, tanto *in vitro* como *in planta*. Sin embargo, esta expresión es mayor durante el desarrollo del tubo germinativo entre las 4 y 6 horas de incubación *in vitro* y a las 8 hpi *in planta*. Esta respuesta en estados tempranos de desarrollo de *B. cinerea* puede ayudar a contrarrestar el efecto del choque nitrosativo en las primeras etapas de la infección de plantas, choque nitrosativo que produce la resistencia de *P. peltatum* a *B. cinerea* (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007). Cierta similitud con los patrones de expresión de *Bcfhg1* se observan en *S. cerevisiae*, sistema en el que el cambio diauxico entre la fase exponencial y la estacionaria implica una reducción de la expresión de la flavohemoglobina (Crawford *et al.*, 1995). Sin embargo, la reducción de la expresión en *B. cinerea* se da en momentos de desarrollo tempranos comparados con los de la levadura, lo que implica que el motivo de la reducción de los niveles de expresión es diferente.

La expresión de *Bcfhg1* se incrementa con la presencia de NO en el medio, al igual que sucede con la flavohemoglobina de *B. subtilis* (Moore *et al.*, 2004), *E. coli* (Gardner *et al.*, 1998), *C. albicans* (Hromatka *et al.*, 2005) y *S. cerevisiae* (Zhu *et al.*, 2006). La disminución progresiva de los niveles de expresión de *Bcfhg1* durante exposiciones largas de micelio joven a NO puede deberse a un fenómeno de adaptación. No obstante, teniendo en cuenta que al exponer micelio maduro a NO apenas se produce una respuesta de inducción de la expresión de *Bcfhg1*, tanto este fenómeno como el anterior pueden probablemente explicarse como consecuencia de una insensibilización del micelio maduro a NO que llega a ser prácticamente total en micelio cultivado durante 12 horas. En *S. cerevisiae*, algunos autores no detectan inducción del gen de la flavohemoglobina por NO (Liu *et al.*, 2000) y otros detectan niveles de inducción importantes (10×) (Sarver y DeRisi, 2005). Estas diferencias pueden tener su origen en la utilización de diferentes condiciones experimentales y de células en diferentes estados fisiológicos en cada trabajo. Todo esto indica que la expresión de la flavohemoglobina es dependiente del estado fisiológico y que en

cada estado la proteína pueda realizar funciones fisiológicas diferentes o, incluso, que ésta pueda no ser necesaria.

La mayor expresión de *Bcfhg1* al inicio de la germinación pudiera deberse a que el micelio está expuesto a una mayor concentración de NO subproducto de la obtención de amonio para la síntesis de proteínas en una fase que demanda una síntesis muy alta de compuestos celulares. El amonio se obtiene a partir de nitrato mediante la nitrato reductasa, la cual puede producir NO a partir del nitrito que la nitrato reductasa es incapaz de transformar en amonio. Sin embargo, la casi ausencia de respuesta a NO exógeno en micelio maduro, también metabólicamente muy activo, en comparación con micelio joven, hace pensar que la expresión de *Bcfhg1* está controlada para producir un incremento en la degradación de NO en micelio recién germinado y una reducción de la degradación de NO en micelio maduro. Asimismo, la uniformidad de la expresión de *Bcfhg1* respecto a la concentración de NO respalda que la diferencia de expresión en micelios de diferente madurez no se debe a una diferente concentración de NO y que la respuesta a NO es una respuesta cualitativa, al menos respecto a la expresión de *Bcfhg1*.

La respuesta al NO es muy rápida. La expresión de *Bcfhg1* se empieza a incrementar antes de los 5 minutos de exposición a NO, deduciéndose que el sistema de percepción de NO y de inducción de la expresión de *Bcfhg1* no puede ser muy complicado. Como se ha argumentado en la sección de introducción, la S-nitrosilación es el sistema más poderoso que posee el NO para influir en el sistema de señalización (Romero-Puertas *et al.*, 2008) y probablemente debido a la respuesta obtenida pudiera ser el responsable del incremento de la expresión de *Bcfhg1*. Sin embargo, en micelio maduro la expresión de *Bcfhg1* se ve reducida y casi no resulta afectada por el NO, ni por su concentración ni por el tiempo de exposición, lo que nos lleva a pensar que debe existir un sistema de represión de la expresión de *Bcfhg1* independiente de la S-nitrosilación.

Durante la infección *in planta*, *Bcfhg1* se expresa abundantemente en el inicio de ésta y posteriormente su expresión se ve reducida. Aunque se expresa en todos los estados de la infección, el incremento de ésta al principio indica la importancia de la proteína codificada en las fases iniciales del proceso de infección. En trabajos previos utilizando el mismo sistema de inoculación se ha comprobado que los



primeros síntomas macroscópicos de la infección se manifiestan aproximadamente a las 20 hpi con la aparición de pequeñas lesiones necróticas. A las 16 hpi mediante observación microscópica ya es posible apreciar células individuales muertas (Benito *et al.*, 1998). Por lo tanto, la producción de NO por parte de la planta debe haberse iniciado ya en momentos anteriores. A las 16 hpi la mayor parte de las esporas inoculadas ya han germinado y alcanzado un estado de desarrollo similar al de las esporas cultivadas durante 8 h *in vitro*. En nuestro trabajo el nivel de expresión *in planta* a las 8 hpi es comparable con el nivel de expresión *in vitro* a las 5 h. El nivel de expresión a las 8 hpi, superior al observado en las fases posteriores de la infección, debe ser consecuencia de la inducción de la expresión que se observa durante la germinación en ausencia de NO. A esta inducción debe sumarse, además, la inducción determinada por la exposición al NO producido por la planta. A pesar de que debe haber producción de NO entre las 12 y las 16 hpi, la expresión del gen *Bcfhg1 in planta* decae a estos tiempos, al igual que sucede en cultivos *in vitro* no expuestos a NO.

El NO tiene enormes implicaciones en señalización y en patogenicidad (Delledonne, 2005). Es posible considerar que el micelio joven es sensible al NO en términos de inducibilidad del gen *Bcfhg1* para poder generar enzima flavohemoglobina que le permita detoxificar el NO que el propio patógeno pudiera producir y el NO que generan las células vegetales que experimentan muerte celular (Delledonne *et al.*, 1998). En fases posteriores, en el micelio maduro se reduce la expresión e incluso no responde a la inducción por NO. Esto facilita el aumento de la concentración de NO y el incremento de la HR (Boccaro *et al.*, 2005), lo que facilita el desarrollo del hongo necrotrofo (Govrin y Levine, 2000). Podríamos considerar entonces que el NO y la modulación de sus niveles por parte del hongo tendrían carácter instrumental para el éxito de la infección del hongo.

### **3. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE BCFHG1**

La actividad enzimática de degradación de NO de la proteína BcFHG1 se comprobó mediante el estudio del fenotipo de un mutante carente de la enzima flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2000) en el que se había expresado el gen *Bcfhg1*. Los resultados obtenidos mostraron que, tanto en cultivos celulares como en extractos de proteínas, BcFHG1 realiza la misma función de degradación de NO que la flavohemoglobina de *S. cerevisiae*, proporcionando evidencias bioquímicas y genéticas de que la función bioquímica de la flavohemoglobina de *B. cinerea* es la detoxificación de NO. La complementación de la mutación *yhb1* de *S. cerevisiae* con la flavohemoglobina de *B. cinerea* muestra que, a pesar de estar distantes en el árbol filogenético de las flavohemoglobinas (Fig 31), ciertamente ambas enzimas realizan la misma función y poseen características bioquímicas muy similares.

Los microorganismos están expuestos de forma natural al NO y precisan de un sistema capaz de detoxificar NO. Hay autores que indican que las flavohemoglobinas evolucionaron para detoxificar el NO que abundaba en la tierra primitiva en la que predominaban condiciones anaeróbicas (Zhu y Riggs, 1992). Sin embargo, la moderna flavohemoglobina ha evolucionado para poder metabolizar el NO proveniente de fuentes ambientales (Lawrence y Crutzen, 1999), de procesos metabólicos endógenos tales como la denitrificación (Takaya *et al.*, 1997), de huéspedes que producen NO por motivos de defensa (Delledonne *et al.*, 1998), del control de la cadena respiratoria (Szibor *et al.*, 2001) o de mecanismos de señalización (Courtois *et al.*, 2008).

## 4. FUNCIÓN DE BCFHG1

Los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  mostraron ausencia total de actividad enzimática para la degradación de NO, una reducción de crecimiento en presencia de NO y un ligero incremento del crecimiento en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero ninguna alteración fenotípica de su capacidad de crecimiento *in planta*.

BcFHG1 es la única enzima responsable de la degradación enzimática de NO en *B. cinerea*, ya que el mutante correspondiente presenta una curva de degradación de NO exógeno similar a la que presenta el medio de cultivo sin micelio. Esta función de las flavohemoglobinas ha sido ya descrita en *E. coli* (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998) y en *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2000).

La reducción del crecimiento del mutante  $\Delta Bcfhg1$  en presencia de NO está descrita para mutantes de flavohemoglobina en otros hongos. En *C. neoformans*, los mutantes de la flavohemoglobina manifiestan una reducción en su crecimiento en presencia de NO (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Este fenómeno es producido al no degradarse el NO exógeno y acumularse en las células, produciendo la inhibición de la citocromo C oxidasa y de este modo de la cadena respiratoria (Boveris *et al.*, 2000; Szibor *et al.*, 2001). Asimismo, la inhibición de la cadena respiratoria incrementa los niveles de superóxido y éste reacciona con el NO formando peroxinitrito, el cual es altamente tóxico para células animales, aunque no tanto para células vegetales (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Por lo tanto, la inhibición de la cadena respiratoria determina que estén disponibles menos cantidades de ATP y NADPH, y de este modo se produce una reducción del crecimiento saprofítico.

El ligero incremento en el crecimiento saprofítico observado en medio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  podría ser debido a la reacción con una mayor cantidad de NO interno que pudiera darse al reducirse la degradación de NO (Malolepsza y Rozalska, 2005). En el mutante puede concentrarse una mayor cantidad de NO el cual reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o sus derivados para formar peroxinitrito (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto tóxico del peroxinitrito en la célula podría determinar que la diferencia en el crecimiento saprofítico del mutante y el tipo silvestre no sea elevada.

El efecto más inesperado en el fenotipo del mutante es la ausencia de diferencias con el tipo silvestre en relación con su capacidad para infectar la planta huésped. Como se ha mencionado en la sección de Introducción, las flavohemoglobinas tienen un claro efecto en virulencia en patógenos, efecto que está ampliamente descrito en la bibliografía. En el hongo *C. neoformans*, la flavohemoglobina es esencial para una completa virulencia en ratones (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). La flavohemoglobina de *E. chrysanthemi* es esencial para el desarrollo de la infección *in planta* (Boccaro *et al.*, 2005; Favey *et al.*, 1995). Cepas silenciadas de *N. benthamiana* para el gen *Nbnoa1*, las cuales tienen una menor producción de NO inducido, mostraron una mayor susceptibilidad a *Colletotrichum lagenarium* (Kato *et al.*, 2008), al igual que sucede con líneas de *A. thaliana* deficientes en el gen *Atnoa1* (Zeidler *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros resultados indican que las interacciones en las que participa *B. cinerea* no siguen esta pauta. En *B. cinerea* se ha demostrado que donadores de NO promueven la infección y que secuestradores de NO la evitan (Malolepsza y Rozalska, 2005). De este modo, la eliminación de un potente secuestrador de NO como la flavohemoglobina podría incluso favorecer la infección. Por otro lado, *B. cinerea* necesita la HR para el desarrollo de la infección (Govrin y Levine, 2000) y a su vez el NO es esencial para la producción de la HR (Delledonne *et al.*, 2001). Nuestros datos demuestran que la eliminación de la degradación enzimática de NO no es esencial para la patogenicidad en *B. cinerea*. La reducción en la degradación de NO podría producir un incremento en la acumulación de NO y de este modo un incremento en la virulencia. Sin embargo, la virulencia no se ve alterada, lo cual permite sugerir que *B. cinerea* quizás posea un sistema para la regulación de los niveles de NO y de la HR que desencadena. No obstante, es posible considerar explicaciones alternativas. Debemos recordar que el NO tiene un efecto antimicrobiano, como demuestra, en el caso de *B. cinerea*, la mayor sensibilidad de las cepas  $\Delta Bcfhg1$  respecto a la cepa tipo silvestre al donador de NO SNP y que se traduce en una disminución de su capacidad de crecimiento en presencia de SNP. Esta reducción del crecimiento en las cepas  $\Delta Bcfhg1$  podría contrarrestar el efecto producido por una HR más intensa debida a la posible acumulación de mayores cantidades de NO durante la infección de las cepas  $\Delta Bcfhg1$ .

El diferente comportamiento de *B. cinerea* en la infección de plantas respecto a otros patógenos ha sido descrito para otros sistemas. Los genes *eds1* y *sgt1* de *N. benthamiana* son esenciales para producir la resistencia a patógenos biotrofos. Ambos genes se expresan en la planta durante la infección causada por *B. cinerea* y el silenciamiento de los mismos genera líneas resistentes a *B. cinerea* (El Oirdi y Bouarab, 2007). Estos autores también observaron que la expresión en *N. benthamiana* del gen antiapoptótico codificador de la proteína p35 del baculovirus producía una mayor resistencia a la infección por *B. cinerea* que la observada en el tipo silvestre. Asimismo, la expresión de genes antiapoptóticos en plantas de tabaco determinaron un incremento de la resistencia de éstas a *B. cinerea* (Dickman *et al.*, 2001). Observaciones similares han sido descritas en la interacción *B. cinerea* - *Arabidopsis* (van Baarlen *et al.*, 2007).

## 5. PRODUCCIÓN DE NO EN *BOTRYTIS CINEREA*

Nuestro trabajo demuestra que *B. cinerea* produce NO tanto durante su crecimiento saprofito como durante su interacción con la planta. La producción de NO por *B. cinerea* ha sido observada por diversos autores con anterioridad (Conrath *et al.*, 2004; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; van Baarlen *et al.*, 2004; van Baarlen *et al.*, 2007). En nuestros estudios se han utilizado dos tipos de metodologías para la detección de NO: la tinción con DAF-2DA y la detección con electrodo de NO.

La producción *in vitro* de NO se observa en todos los estados de desarrollo desde esporas iniciando la germinación hasta micelio maduro. Sin embargo, no se observa producción de NO en todas las células e hifas. Una situación similar ha sido descrita en *Colletotrichum coccodes* en estudios en los que también se han utilizado procedimientos de detección mediante tinción con DAF-2DA (Wang y Higgins, 2005). En el caso de *B. cinerea* detectamos dos tipos de señales con DAF-2DA, una localizada en el interior de esporas e hifas y otra en forma de nube alrededor de esporas e hifas. La primera señal no se detecta en todas las esporas e hifas, al igual que sucede en *C. coccodes* (Wang y Higgins, 2005). La segunda señal es detectada principalmente en esporas recién germinadas y en micelio maduro, pudiendo tener importantes implicaciones fisiológicas. El NO es una potente molécula gaseosa señalizadora en plantas (Delledonne *et al.*, 1998) que puede atravesar cutículas hidrofóbicas hasta llegar a las células vegetales y viceversa. La temprana producción de NO podría ser utilizada por *B. cinerea* como señal para superar el umbral que desencadena la HR en la planta. En fases posteriores se observa una aparente disminución en la producción de NO y, finalmente, en micelio maduro incubado *in vitro* durante 20 horas se aprecia una masiva producción de NO que podría acentuar *in planta* la muerte celular del huésped. Es interesante destacar que a pesar de no degradar NO, la producción de NO por parte del mutante  $\Delta Bc fhg1$  no se dispara, sugiriendo este fenómeno junto con la producción de NO inducida por NO un autocontrol de la producción de NO por parte del hongo.

También hemos detectado producción de NO *in planta*. Durante la infección en tomate se detecta NO en el micelio a las 15, 24 y 48 hpi con un máximo de producción a las 48 hpi y una ausencia de producción a las 72 hpi. En tabaco se detecta NO desde las 20 a las 75 hpi, con un máximo de producción a las 20 hpi. En *Arabidopsis* se observa una considerable producción de NO a las 72 hpi. Parece que la dinámica de producción de NO por parte del hongo varía dependiendo del huésped en el que realiza la infección. Asimismo, parece que está correlacionada la velocidad con la que el hongo infecta y coloniza los tejidos infectados de la planta con la aparición del máximo de producción de NO por parte del hongo. De este modo, en *Arabidopsis*, donde la infección se desarrolla más lentamente, se observa una gran producción de NO a las 72 horas, momento en el que en tomate casi no existe producción de NO. En tabaco la infección y el máximo de producción de NO en el hongo son más tempranos que en tomate y en *Arabidopsis*. *B. cinerea* parece ser capaz de autocontrolar su producción de NO para adaptarlo a las condiciones específicas de cada planta y, de este modo, optimizar las condiciones de infección. La producción de NO por el hongo aumentaría la cantidad total de NO en el área de infección y, así, facilitarían el desarrollo de la necrosis y la infección (Malolepsza y Rozalska, 2005). Cuando la infección está ampliamente extendida se aprecian menores niveles de NO en el hongo, probablemente porque el hongo colonizando activamente el tejido infectado no requiere producir grandes cantidades de NO para alterar el umbral de activación de la muerte celular programada de las células vegetales.

Se podría decir que se observan dos momentos de producción preferente de NO por parte de *B. cinerea*. En un primer momento de producción de NO en las primeras fases de desarrollo del hongo, se genera una nube de NO que puede alcanzar a las células vegetales y podría contribuir a activar la HR en la planta. En este estado inicial, además, la expresión de la flavohemoglobina podría ayudar a reciclar el NO y reconvertirlo en  $\text{NO}_3^-$ , muy útil para el hongo en condiciones de estrés nutricional. En un segundo momento, cuando el hongo ya ha penetrado en la planta, se produce NO que puede ayudar a desencadenar la muerte de células vegetales de una forma muy activa y, de este modo, facilitar la extensión de la

infección en la planta. Este fenómeno se potencia con la reducción de la expresión de *Bcfhg1*.

La producción de NO en esporas recién germinadas no fue detectada por medio de un electrodo de NO, probablemente, porque el NO generado alrededor de las esporas recién germinadas se diluye y degrada en el medio de cultivo hasta límites por debajo del umbral de detección. Sin embargo, a partir de las 16 horas de incubación *in vitro* nuestro trabajo demuestra que el hongo empieza a producir NO en respuesta a la exposición a NO exógeno aplicado en forma de gas disuelto en agua. Esta respuesta puede tener importantes implicaciones en señalización, ya que parece que el hongo responde al NO exógeno produciendo una mayor cantidad de NO precisamente en el mismo estado fisiológico en el que la expresión de la flavohemoglobina disminuye y no es inducida. La señal mediante NO que genera la planta en respuesta al patógeno (Hong *et al.*, 2008) es detectada no sólo por las células vegetales para las que ésta es emitida, sino también por *B. cinerea*, produciendo el hongo como respuesta más NO, el cual va a favorecer el desarrollo de la HR y, de este modo, la infección (Govrin y Levine, 2000). Probablemente la mayor parte de la producción de NO observada *in planta* se deba al NO inducido en este sistema de retroalimentación. Dos preguntas surgen en este contexto: cómo el NO puede estimular su propia producción de NO y cómo produce NO el hongo.

El NO puede estimular su propia producción por medio de la desactivación de proteínas implicadas en su metabolismo mediante la S-nitrosilación (Romero-Puertas *et al.*, 2008). Los mecanismos y las proteínas implicadas en la producción de NO por *B. cinerea* no han sido investigadas. Como se ha argumentado en la sección de Introducción, el genoma de *B. cinerea* no contiene homólogos de los genes codificadores de las enzimas óxido nítrico sintetasa (NOS) de microorganismos (Adak *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Pant *et al.*, 2002) a pesar de que otros hongos, como *A. niger*, sí la tienen. Hemos realizado experimentos con el inhibidor de la NOS, L-NAME, en cultivos de *B. cinerea*, experimentos que no han permitido detectar una actividad NOS clara, ya que la adición de L-NAME no impide la producción de NO, aunque sí la reduce. La nitrato reductasa es otra enzima capaz de producir NO en algas (Sakihama *et al.*, 2002) y plantas (Shi y Li, 2008). Experimentos de expresión de la nitrato reductasa de *B. cinerea* (*BcniaA*) realizados



en nuestro laboratorio mostraron un incremento de expresión del gen a partir de las 12 horas de incubación en medio líquido, haciendo de este gen un buen candidato a ser responsable de la producción de NO, al menos en los estadios tardíos de desarrollo del hongo. Sin embargo, experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio mediante tinción DAF-2DA en cultivo *in vitro* con un mutante *niaA* (Levis *et al.*, 1997) no mostraron inhibición de la producción de NO. Se hace necesaria, entonces, la investigación de la enzima o enzimas implicadas en la producción de NO por el hongo para tener una clara imagen del papel que juega el NO durante las interacciones en las que participa *B. cinerea*.

Diversos indicios nos indican un posible autocontrol en la producción de NO en *B. cinerea*. En el mutante  $\Delta Bcfhg1$  no se detecta un incremento de la producción de NO y en la infección *in planta* no se observa un incremento en la HR debido a una mayor concentración de NO, lo que nos indica que la producción de NO por el hongo debe contrarrestar el efecto detoxificador de NO de la flavohemoglobina. Este autocontrol también se observó en la infección del tipo silvestre de *B. cinerea* y de los mutantes  $\Delta Bcfhg1$  en líneas de *A. thaliana Atnoa1* con una menor producción de NO, ya que la virulencia no se incrementa en comparación con el tipo silvestre de *A. thaliana*.

El flujo de NO entre el hongo y la planta y su posible transformación dentro del micelio está resumida en la figura 106. *B. cinerea* es capaz de producir peróxido de hidrógeno a partir del anión superóxido ( $O_2^-$ ) que resulta de la actividad de la cadena respiratoria en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa (BcSOD1) (Rolke *et al.*, 2004). A su vez el peróxido de hidrógeno puede ser degradado a agua y oxígeno mediante la actividad de la enzima catalasa (Patykowski, 2006). Por otro lado, el NO reacciona con  $O_2^-$  produciendo peroxinitrito, pudiendo éste ser degradado por la acción de la enzima peroxiredoxina (Romero-Puertas *et al.*, 2007). El NO puede reaccionar con proteínas produciendo S-nitrosilación y la consecuente desactivación de las mismas (Mannick y Schonhoff, 2002). El NO producido por la planta actúa como inductor en el hongo de una mayor producción de NO, el cual va a ser excretado, actuando finalmente en los procesos de muerte celular y HR de la planta, lo cual favorece el desarrollo del hongo.

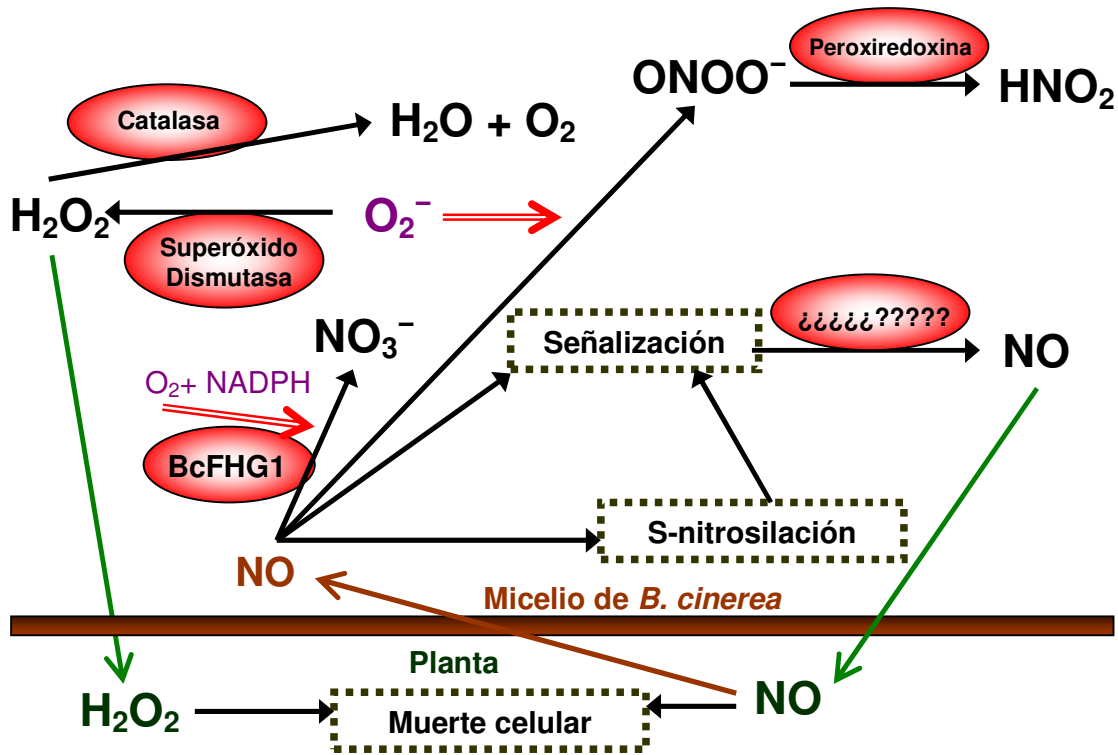


Figura 106. Esquema de flujo de NO en *B. cinerea*.

Las flechas verdes reflejan flujos de moléculas hacia fuera del micelio. Los flujos hacia el interior del micelio están representados por flechas marrones.

*B. cinerea* parece utilizar los mecanismos de defensa de la planta inducidos por el NO, tales como la HR, para el desarrollo de la infección y en su propio beneficio. La hipótesis de la explotación de los sistemas de defensa de la planta por parte del hongo ya ha sido discutida por otros autores (van Baarlen *et al.*, 2007). Incluso el estrés oxidativo experimentado por la planta puede ser utilizado para aumentar la adquisición de nutrientes en hongos patógenos (Oliver y Solomon, 2004). Se deduce, entonces, que la inhibición de la muerte celular en plantas favorece la resistencia a *B. cinerea* y se muestra como un potencial agente de control de patógenos que inducen muerte celular (Imani *et al.*, 2006).

## 6. VARIACIÓN EPIGENÉTICA EN *BOTRYTIS CINEREA*

La transformación de *B. cinerea* mediante la obtención de protoplastos produce alteraciones fenotípicas en las cepas regenerantes obtenidas. Este fenotipo se traduce en un incremento en el crecimiento saprofítico, en la reducción de la producción de conidios y en el aumento de la producción de esclerocios. En todas las transformaciones realizadas con nuestro tipo silvestre y en todos los regenerantes obtenidos se observó este fenotipo. La posibilidad de que el fenotipo se deba a un transposón, una contaminación por ADN u otro acontecimiento producido por la alteración de secuencias de nucleótidos durante la transformación es improbable debido a la uniformidad de los regenerantes obtenidos en diferentes experimentos de transformación.

El proceso de transformación parece producir un cambio en el fenotipo probablemente debido a alteraciones de tipo epigenético que determinan el silenciamiento o activación de genes mediante fenómenos de alteración de la cromatina tales como la metilación de ADN o la alteración de histonas (Choi y Kim, 2008). El cambio epigenético inducido es estable y altamente reproducible y podría ser una respuesta de adaptación al estrés ocasionado durante la transformación. Estas adaptaciones le permiten al hongo facilitar su supervivencia bajo condiciones de estrés. Por una parte, los esclerocios son estructuras de resistencia que permiten al hongo soportar condiciones adversas, en oposición a los conidios que son menos robustos pero permiten una más fácil y eficiente diseminación. Si nos fijamos en el ciclo de vida del hongo (Fig. 3), éste produce esclerocios al final del otoño en respuesta a condiciones de estrés para así soportar los rigores del invierno. Por otra parte, el crecimiento saprofítico más rápido puede permitir al hongo explorar más territorio y así tener acceso a una mayor cantidad de recursos.

El cambio epigenético durante la transformación de *B. cinerea* hace que sea imprescindible prestar una atención particular a los controles con los que se comparan los mutantes obtenidos haciendo uso de procedimientos de transformación. En el presente trabajo se han comparado los mutantes y transformantes obtenidos con

regenerantes obtenidos en un mismo experimento de transformación para evitar, así, falsos positivos derivados del fenotipo producido por la variación epigenética.

La misma cepa (B05.10) conservada en otro laboratorio no presentaba variaciones de crecimiento saprofítico en relación con sus regenerantes. Sin embargo, estos regenerantes tienen sistemáticamente un mayor desarrollo de esclerocios y una menor producción de conidios, lo que demuestra una variación epigenética similar a la mostrada con la cepa de nuestro laboratorio. Las diferencias entre la cepa de nuestro laboratorio y la del Profesor Paul Tudzynski probablemente se deban al proceso de conservación seguido. Como mencionábamos anteriormente, las variaciones epigenéticas se deben probablemente al estrés sufrido por el hongo y por ello, cualquier situación de estrés durante el almacenamiento de la cepa podría ocasionar variaciones epigenéticas. Todavía no hemos podido revertir la variación epigenética modificando las condiciones de cultivo, por ejemplo utilizando un medio de cultivo enriquecido con extractos vegetales.

En hongos filamentosos los cambios epigenéticos sin alteración de la composición de ADN constituyen un mecanismo que puede servir como sistema de defensa y/o desactivación de secuencias repetitivas y elementos móviles del genoma (Selker, 1997). Sin embargo, el sistema de silenciamiento que hemos descrito parece ir más allá, ya que permite al hongo cambiar fenotípicamente en respuesta a condiciones de estrés para poder, de esta forma, adaptarse a su medio ambiente.

## 7. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *BCFHG1*

El aumento de la expresión de *Bcfhg1* cuando ésta es reducida de forma natural en el hongo podría mostrar los efectos de la degradación de NO en estos estados fisiológicos. Con este objeto, hemos tratado de expresar el gen *Bcfhg1* de forma constitutiva bajo el control del promotor del gen triptófano C de *A. nidulans* (PtrpC), utilizando un marcador seleccionable también bajo el control del PtrpC. Desafortunadamente, la transformación con el gen *Bcfhg1* bajo el control de PtrpC no tuvo éxito, no obteniéndose transformante alguno. A diferencia de lo que sucede en otras especies de hongos filamentosos, el PtrpC no funciona en *B. cinerea*, no siendo recomendable su uso.

Debido a que parece que *B. cinerea* nivela la cantidad de NO producido mediante un sofisticado sistema, no se han considerado más experimentos sobre la sobreexpresión de la flavohemoglobina en este organismo. Sin embargo, la expresión de la flavohemoglobina de *E. coli* en *Arabidopsis* reduce el choque por NO inducido por patógenos *in planta* (Zeier *et al.*, 2004), lo que podría reducir la infección del hongo.

## 8. SILENCIAMIENTO EN *B. CINEREA*

El “quelling” en hongos resulta de la introducción de un transgen con la consecuente reducción de la expresión del gen mediante un sistema similar al ARN de interferencia de mamíferos o la cosupresión en plantas (Fulci y Macino, 2007). El tamaño mínimo del transgen con homología al gen objetivo para producir quelling en *N. crassa* es de 132 pares de nucleótidos (Cogoni *et al.*, 1996). Posteriormente el ARN transcrito a partir del transgen es procesado generando pequeños fragmentos de 25 nucleótidos (Catalanotto *et al.*, 2002). Otros tipos de silenciamiento estudiados en hongos filamentosos son el RIP (“Repeat-induced point mutation”) y MIP (“methylation induced premeiotically”) (Irelan y Selker, 1996). Fenómenos tipo RIP han sido observados en *N. crassa*, *A. niger* y *Penicillium chrysogenum* (Braumann *et al.*, 2008). El “quelling” se presenta como una herramienta genética que ha encontrado aplicación en hongos filamentosos como *Venturia inaequalis* (Fitzgerald *et al.*, 2004), *M. oryzae* (Kadotani *et al.*, 2003) o *N. crassa* (Cogoni *et al.*, 1996).

En *B. cinerea* no se han descrito fenómenos de silenciamiento. Sin embargo, en el presente trabajo lo hemos observado en dos genes diferentes. El silenciamiento del gen codificador de la enzima arginino succinato sintasa de *B. cinerea* produce la reducción en la expresión del gen a diferentes niveles, reducción que está relacionada con el grado de auxotrofía a arginina que muestran las cepas silenciadas.

El silenciamiento de la flavohemoglobina de *B. cinerea* produce una reducción de la degradación de NO con respecto a la observada en el mutante obtenido por reemplazamiento génico. Sin embargo, la reducción en la degradación de NO sólo es observada en los transformantes silenciados en mayor medida (menos de un 10 % de la expresión normal del gen), ya que los transformantes que están silenciados en una menor proporción (entre un 20 y un 50 % de reducción de la expresión) muestran una capacidad de degradación de NO similar a la del tipo silvestre. Este resultado nos demuestra una vez más la alta eficiencia de la enzima BcFHG1. La reducción parcial en la expresión de un gen dado podría ser interesante para investigar los efectos de una menor concentración de enzima sin eliminarla completamente y de este modo estudiar genes esenciales o multicopia.

El método usado en el silenciamiento se basa en la introducción en el extremo 3' de la región codificante del gen de selección, que en nuestro caso fue la resistencia a higromicina, de un fragmento de 300 a 400 nucleótidos de la región 3' de la región codificante del gen diana seguido de su terminador. En un primer paso se amplifica la región 3' de la secuencia codificante del gen diana con su terminador, que servirá, a su vez, como terminador del gen de resistencia a un antibiótico utilizado como marcador seleccionable. Por otro lado, se amplifica el promotor del gen OliC de *A. nidulans* junto con la secuencia codificadora del gen que proporciona resistencia a higromicina. Finalmente, mediante PCR se amplifican conjuntamente los dos fragmentos anteriores resultando en una construcción en la que tenemos un promotor y terminador que regulan conjuntamente la expresión tanto del marcador de resistencia como de la construcción de silenciamiento. Esta metodología simplifica considerablemente la preparación de las construcciones de transformación para producir silenciamiento, reduce el tamaño de la secuencia introducida en el hongo y se muestra potencialmente eficaz en el silenciamiento de cualquier gen.

Nuevos sistemas de silenciamiento mediante un doble promotor han sido utilizados en *M. oryzae* para la investigación de las rutas de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nguyen *et al.*, 2008) con una eficiencia ligeramente inferior a sistemas más convencionales mediante estructuras tipo “hairpin” (Nakayashiki *et al.*, 2005). A la vista de los resultados obtenidos en nuestro sistema de silenciamiento y observando resultados similares en términos de eficiencia a los del sistema dual de silenciamiento (un 30-40 % de los transformantes presentan una reducción de la expresión en más de un 50 %), nuestro sistema resulta enormemente interesante debido a la sencillez del diseño de la construcción y a la rapidez con la que ésta puede generarse.





## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

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

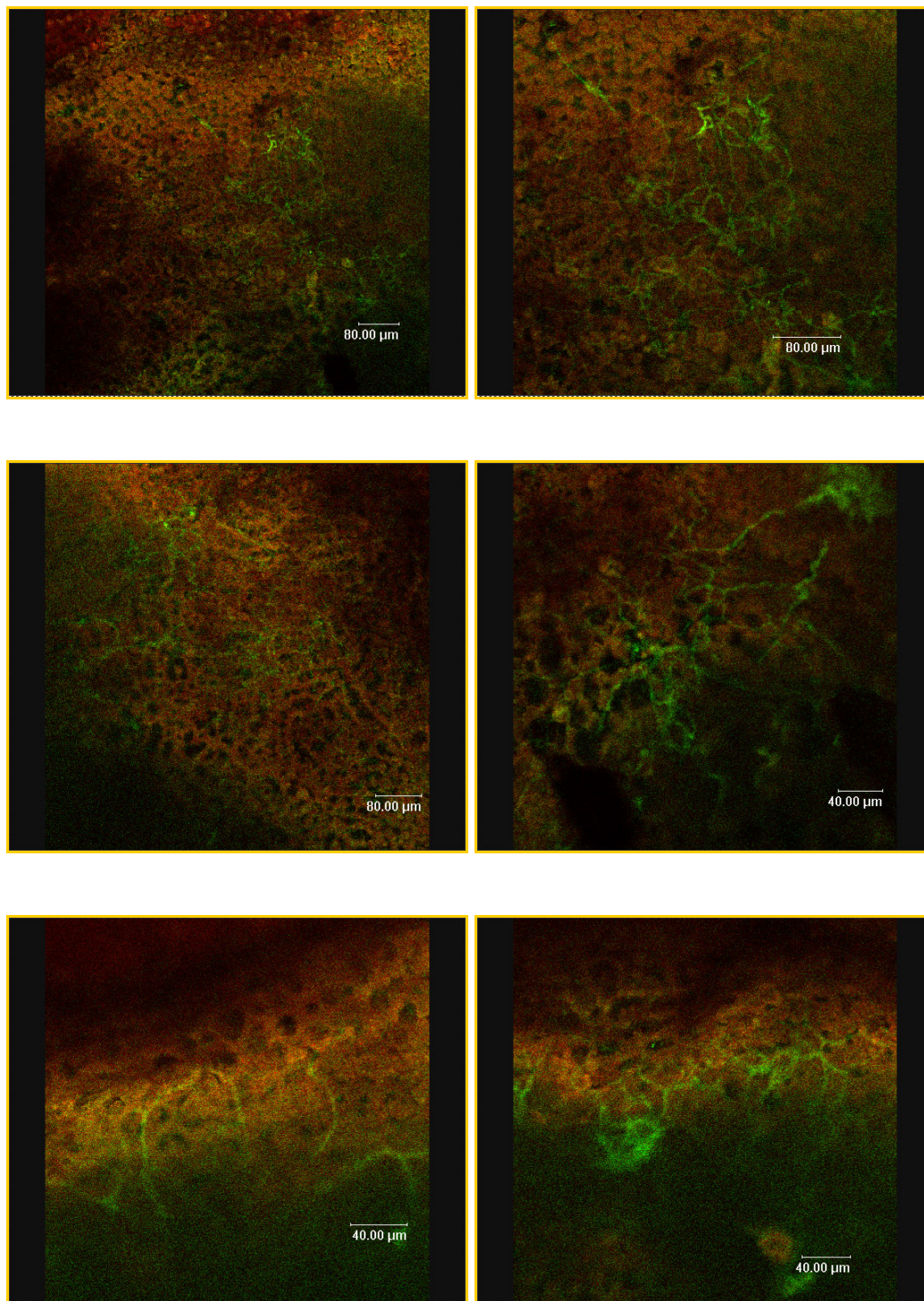
- 1- *B. cinerea* tiene un único gen codificador de enzimas tipo flavohemoglobina, el gen *Bcfhg1*.
- 2- *Bcfhg1* se expresa durante todos los estados de desarrollo del hongo, excepto en esporas en reposo, alcanzando un máximo de expresión durante la germinación de esporas y decayendo ésta posteriormente. La expresión de *Bcfhg1* aumenta 5 veces cuando se aplica NO exógeno a esporas recién germinadas. Sin embargo, el incremento en la expresión determinado por NO exógeno es muy reducido en micelio maduro. El nivel de expresión de *Bcfhg1 in planta* es máximo a las 8 hpi, reduciéndose en un 70-75% entre las 12 y las 120 hpi.
- 3- La expresión de la proteína BcFHG1 en una cepa mutante de *S. cerevisiae* deficiente en la actividad de la enzima flavohemoglobina proporciona evidencias bioquímicas y genéticas de que la proteína codificada por el gen *Bcfhg1* es una enzima flavohemoglobina que metaboliza NO.
- 4- Al menos una de las funciones de BcFHG1 es la detoxificación de NO en *B. cinerea* de una manera rápida y eficiente, presentando la enzima, además, una gran afinidad al NO.
- 5- BcFHG1 confiere protección a NO pero no es esencial para patogenicidad.
- 6- *B. cinerea* produce NO tanto durante el crecimiento saprofítico como durante la interacción con la planta, NO que podría contribuir al desarrollo de la infección. Esta producción de NO es, además, estimulada por NO exógeno.
- 7- La transformación de *B. cinerea* mediante protoplastos induce una variación epigenética que se refleja en los transformantes y regenerantes obtenidos. Este cambio epigenético es, probablemente, producido por el estrés ocasionado durante el proceso de transformación y puede servir como adaptación a las condiciones de estrés.
- 8- El promotor del gen del *trpC* de *A. niger* no es funcional en *B. cinerea*.

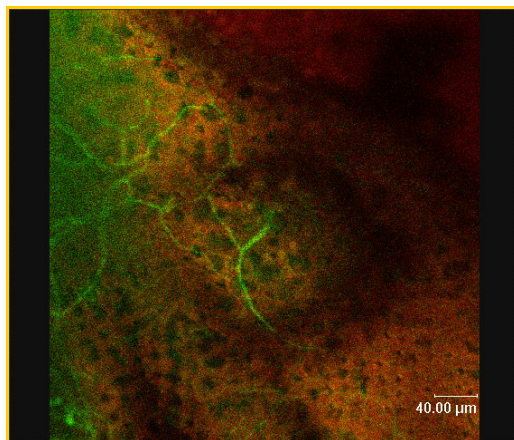
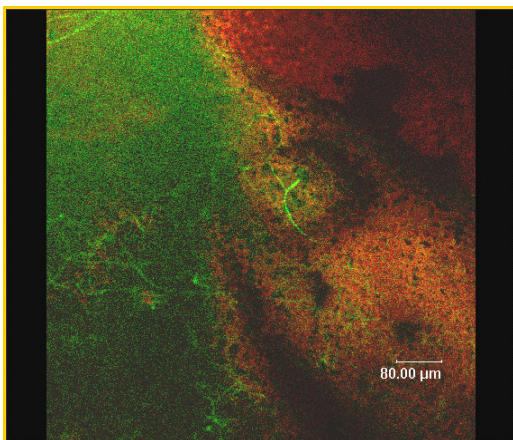
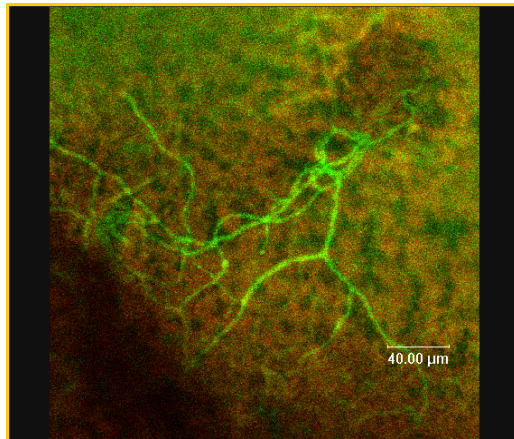
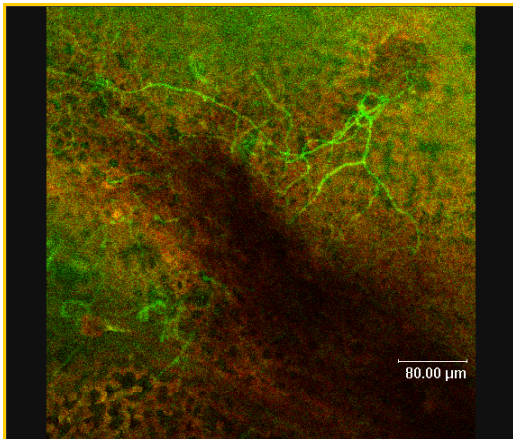
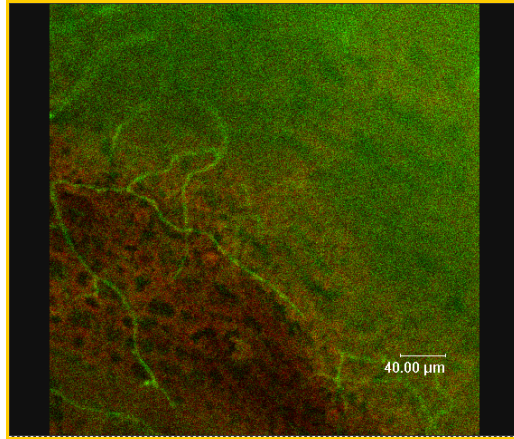
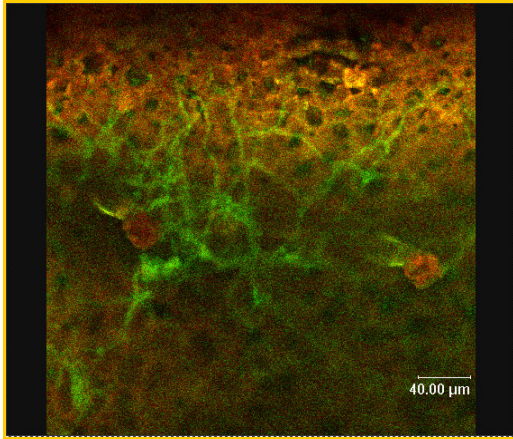
- 9- El silenciamiento de *Bcfhg1* produce una reducción de la expresión del gen y de la función de la enzima. Una nueva construcción de silenciamiento realizada mediante PCR y consistente en el promotor del gen *OliC*, el gen de resistencia, y la secuencia 3' del gen a silenciar seguido de su terminador, se muestra como un método rápido y eficaz para la realización de estudios de función génica en *B. cinerea*.
- 10- Las evidencias experimentales obtenidas sugieren que *B. cinerea* modula los niveles de NO durante su interacción con el huésped para explotar la HR de la planta y facilitar el progreso de la infección.

## **APÉNDICES**

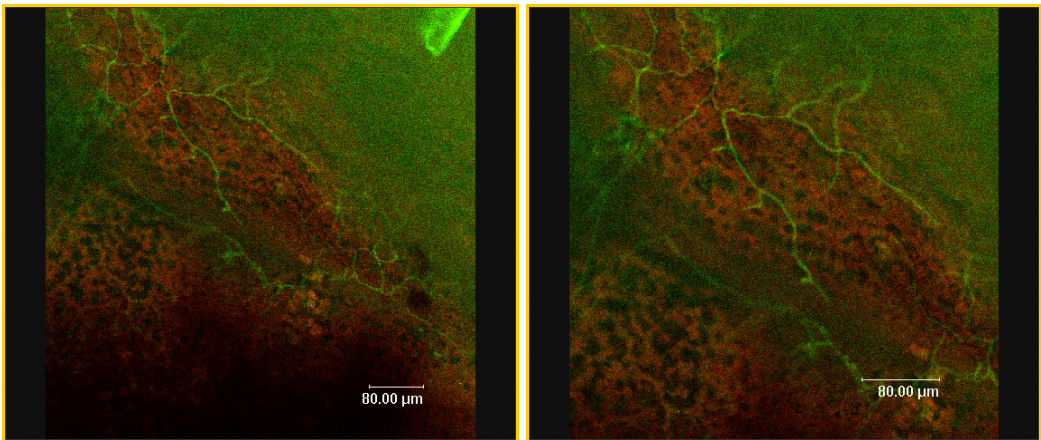
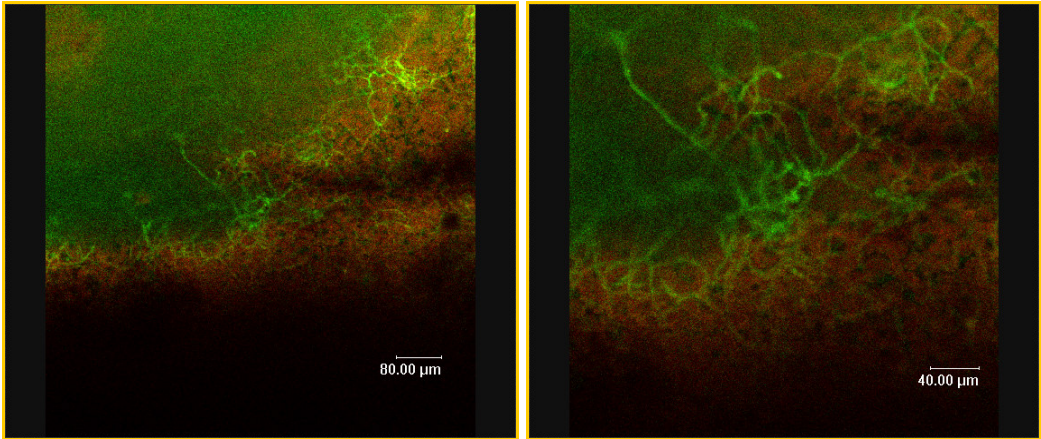
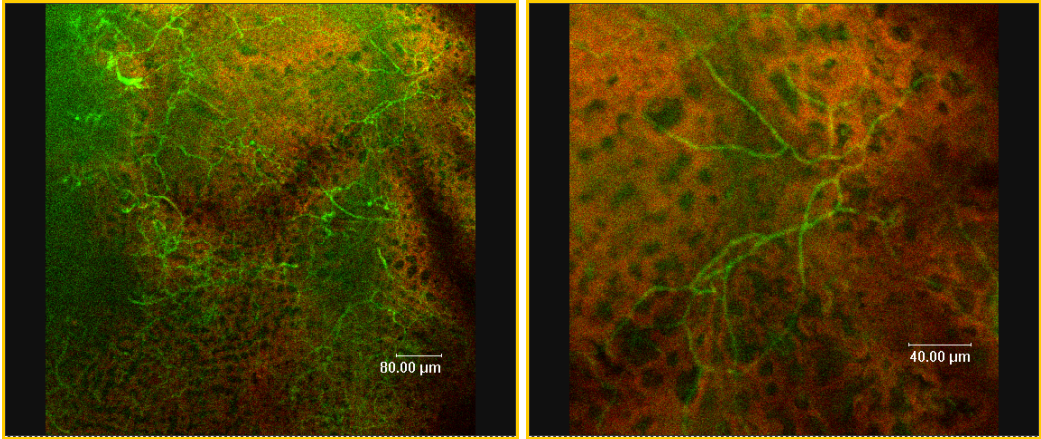


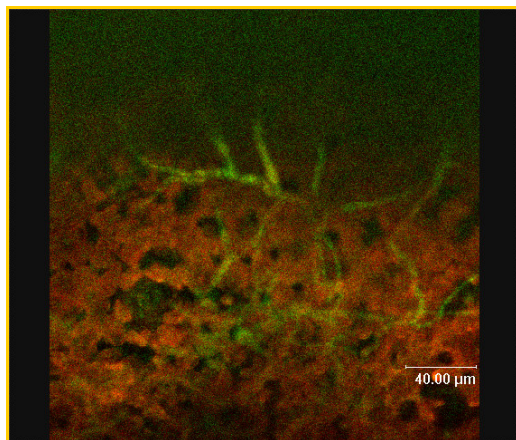
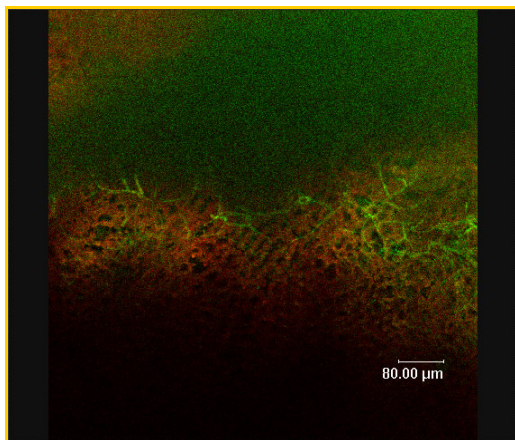
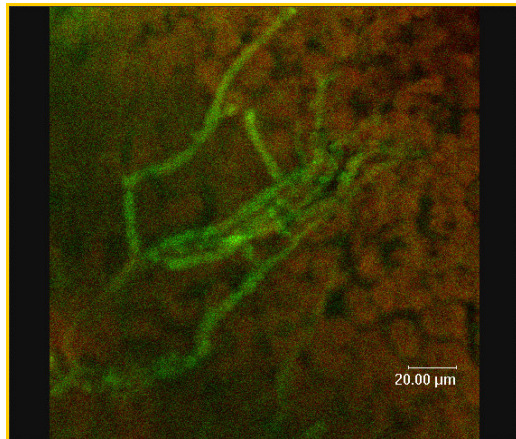
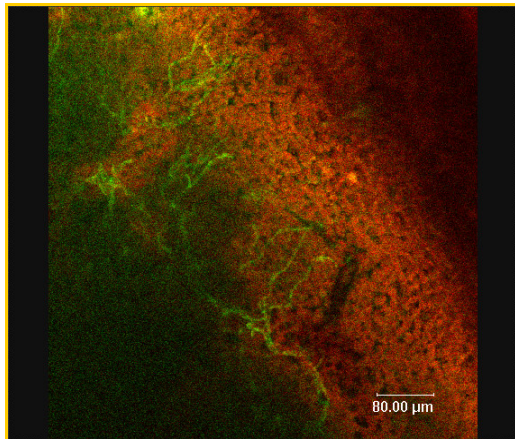
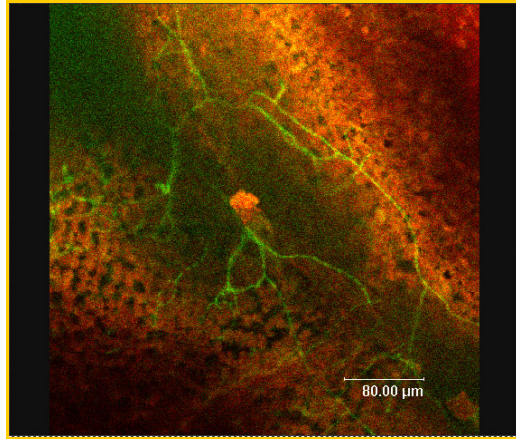
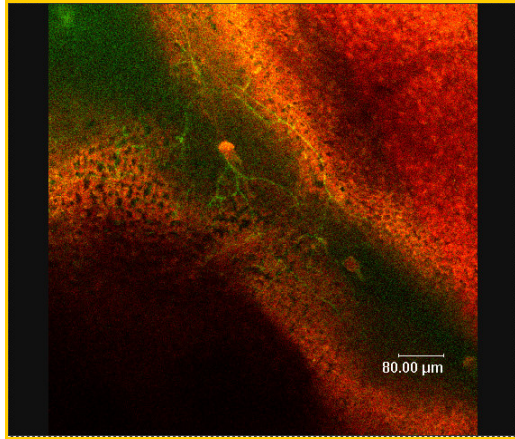
**DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA*  
MEDIANTE TINCIÓN CON DAF-2DA EN TOMATE A  
LAS 48 HPI**

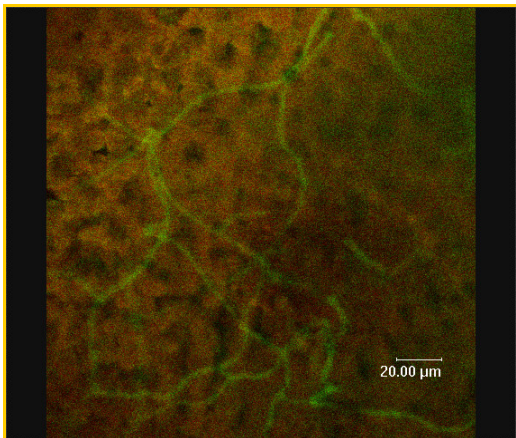
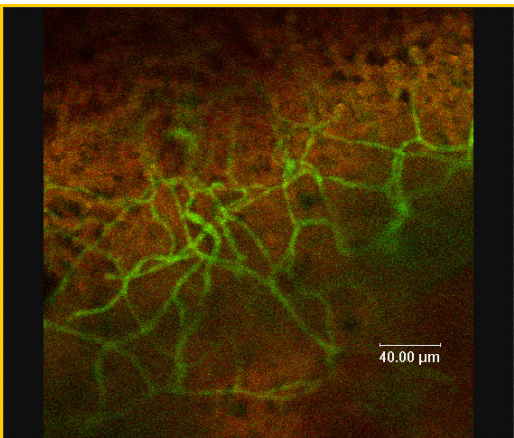
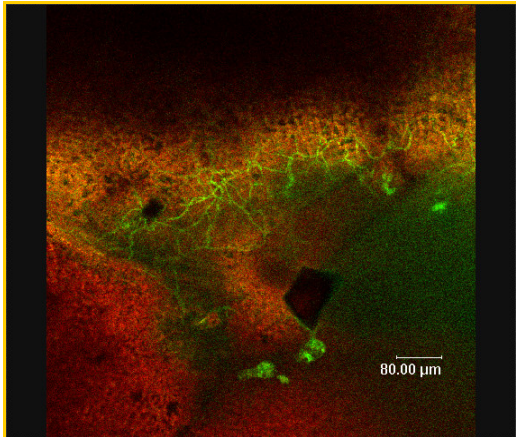
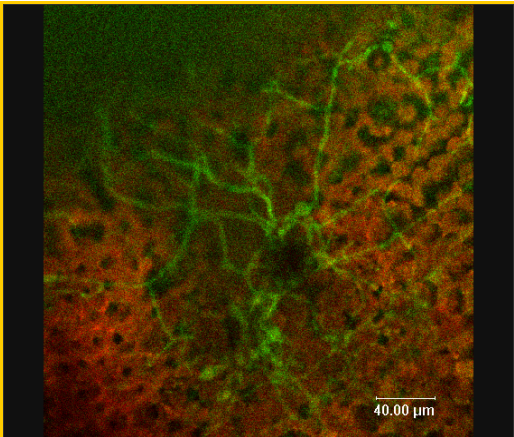
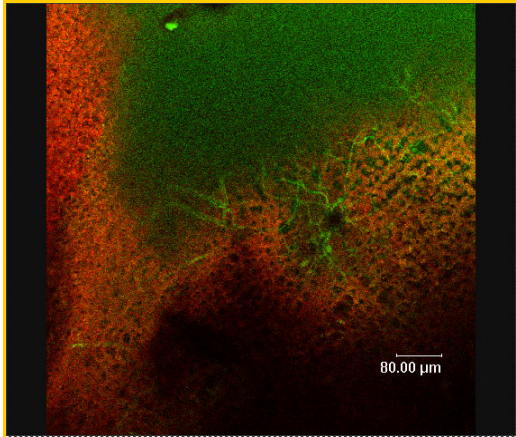
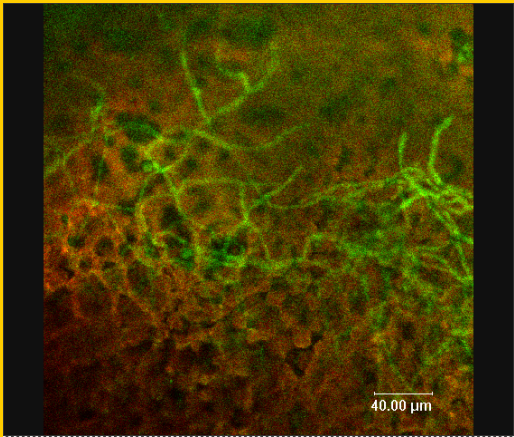


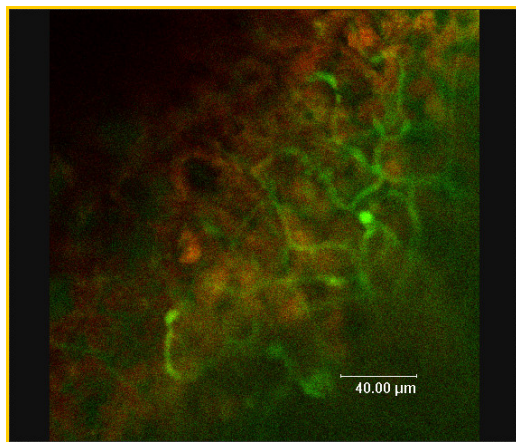
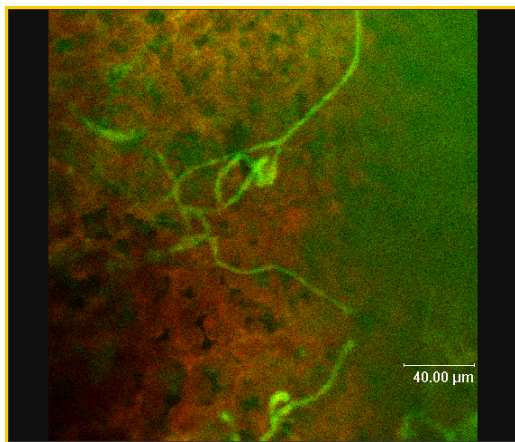
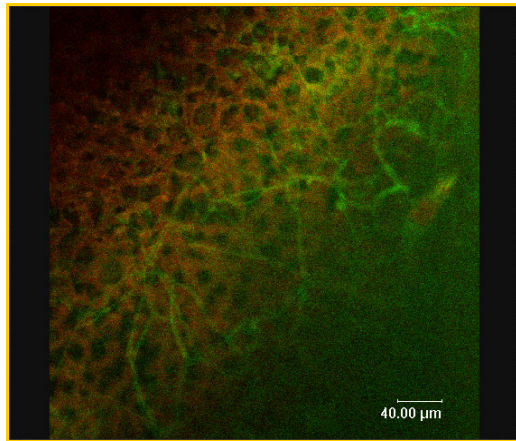
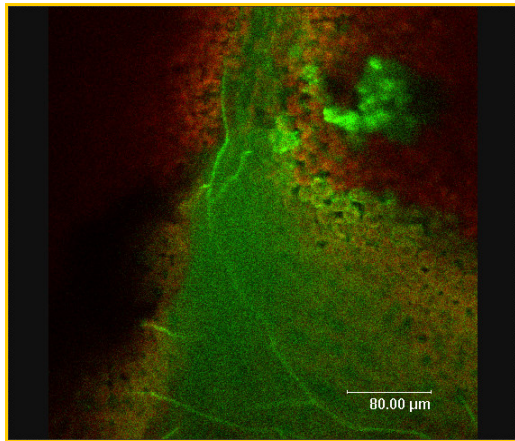
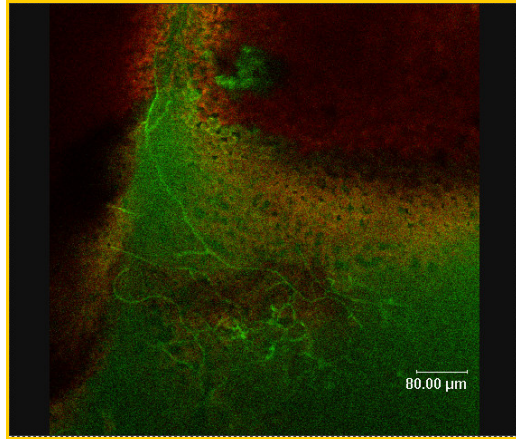
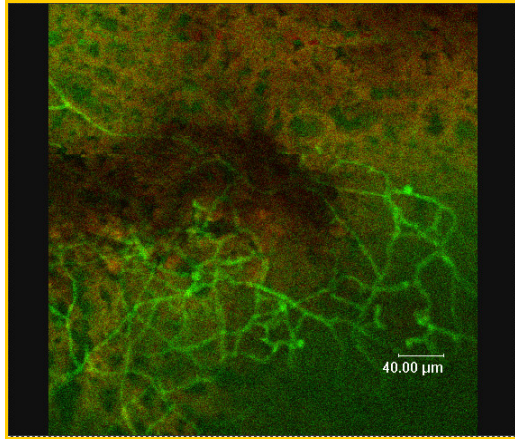




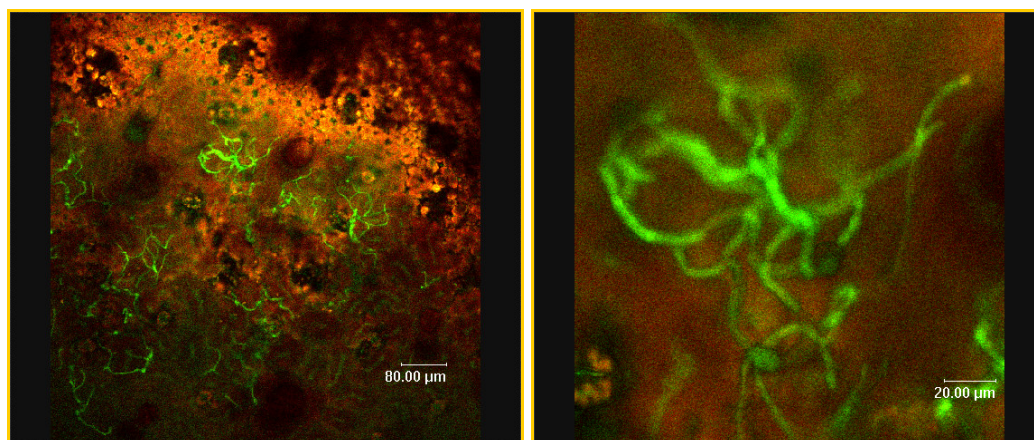
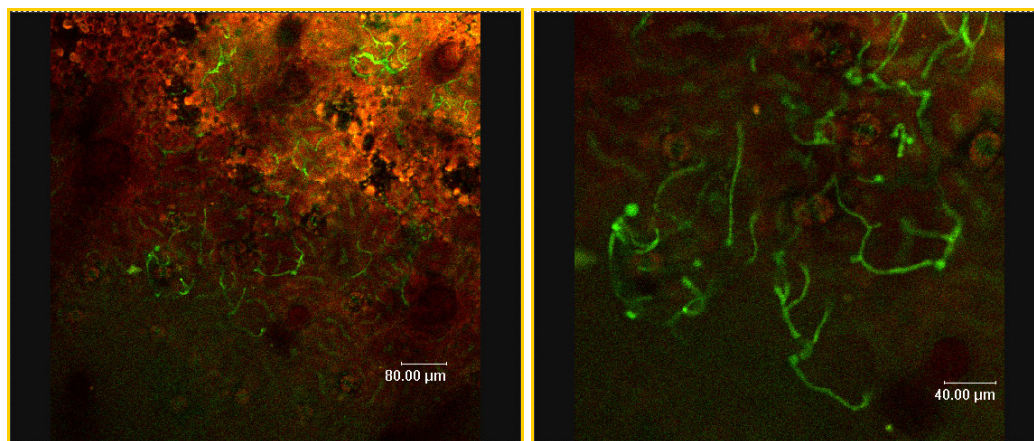


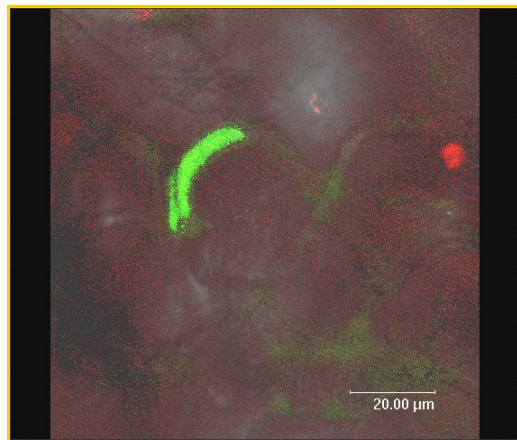
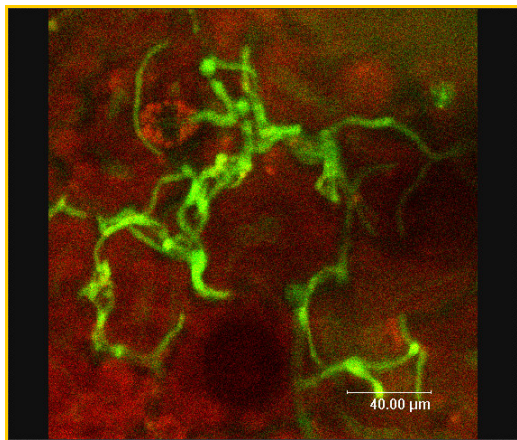
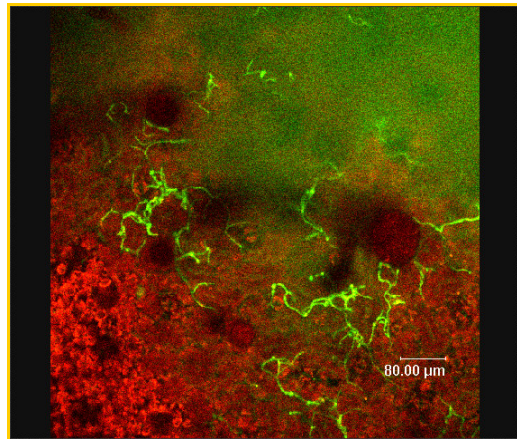
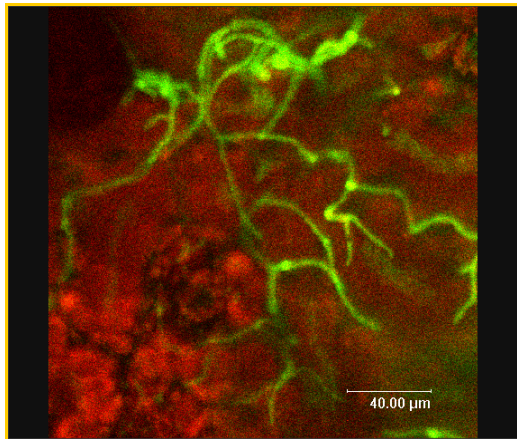
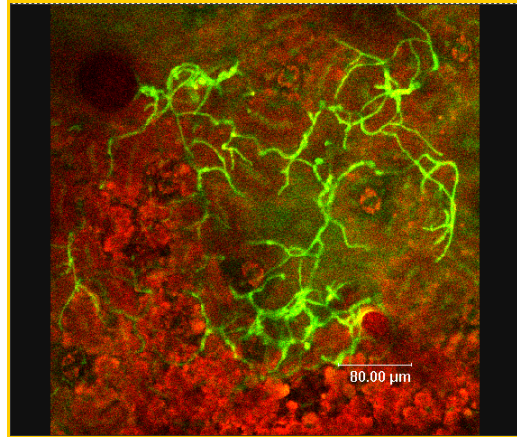
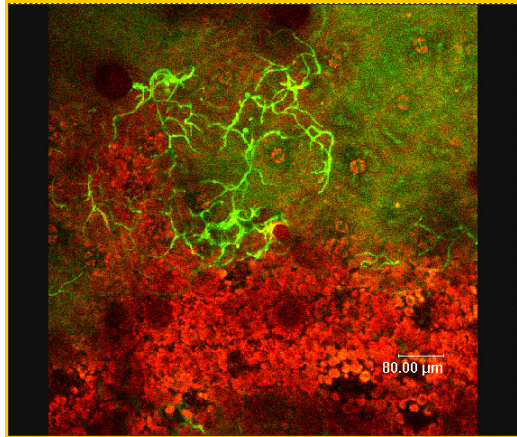




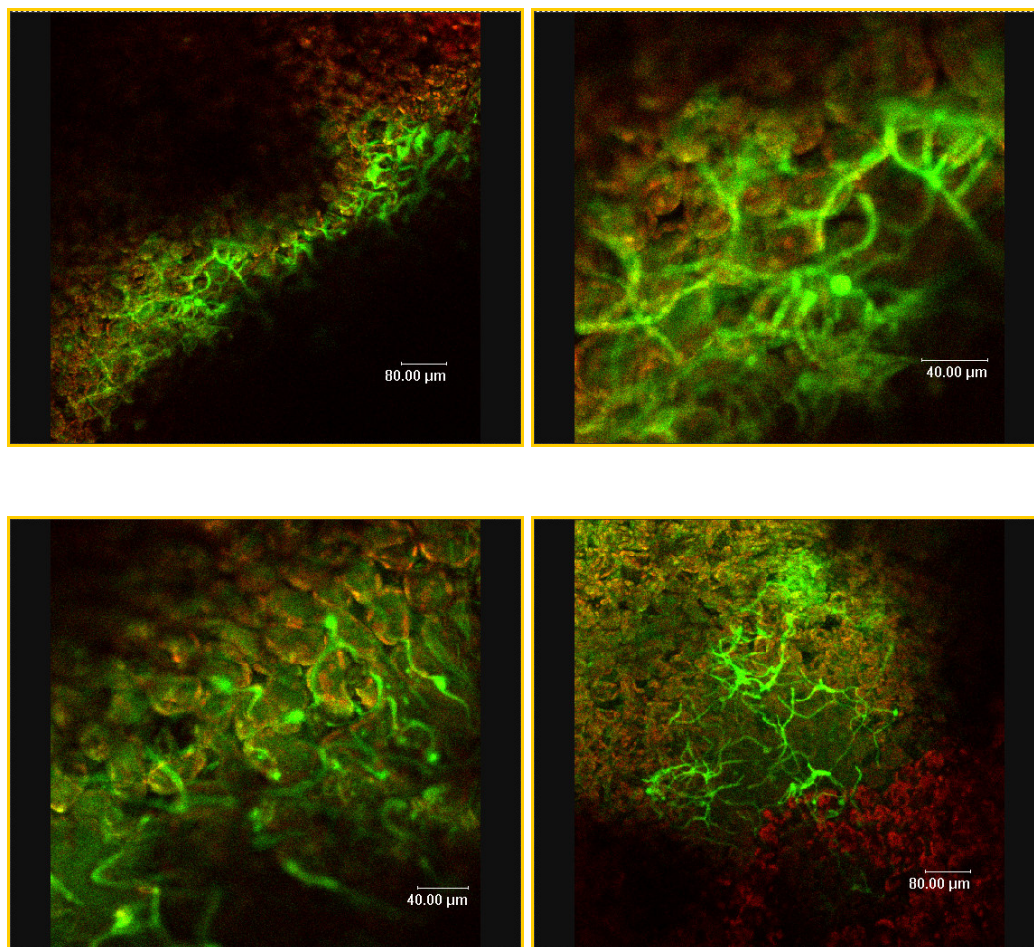


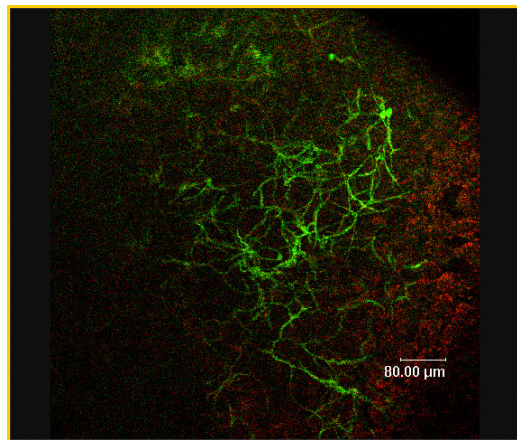
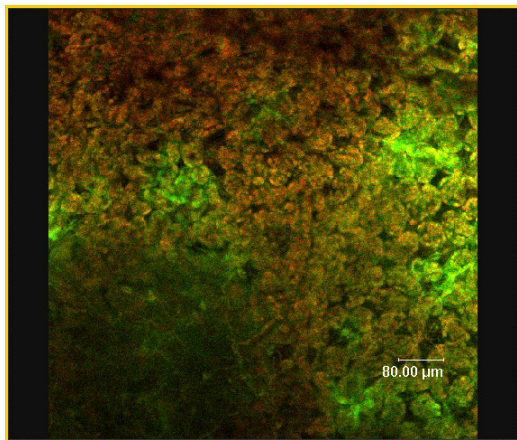
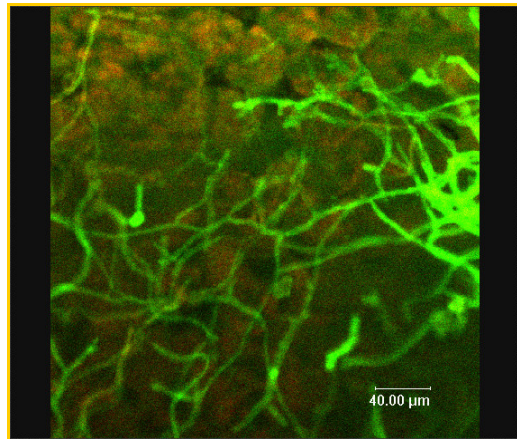
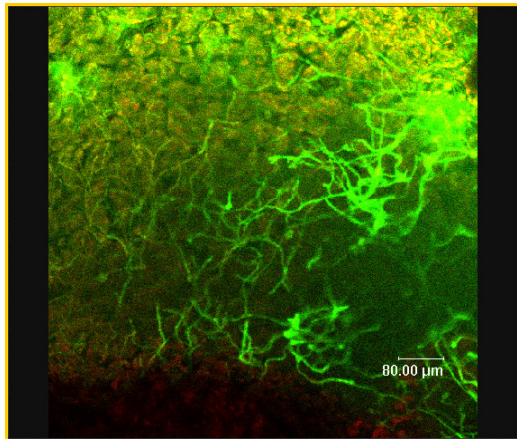
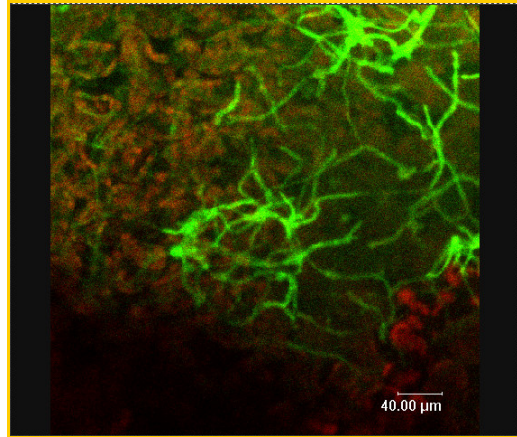
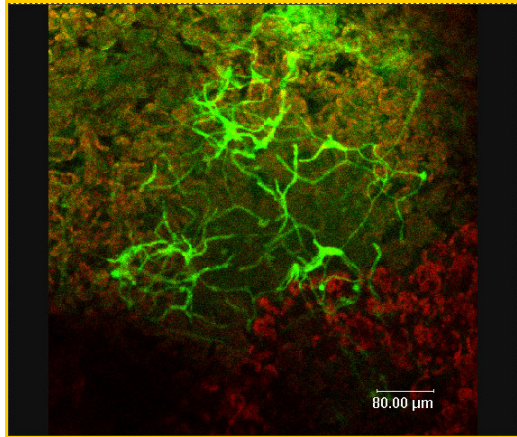
**DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA*  
MEDIANTE TINCIÓN CON DAF-2DA EN TABACO A  
LAS 20 HPI**



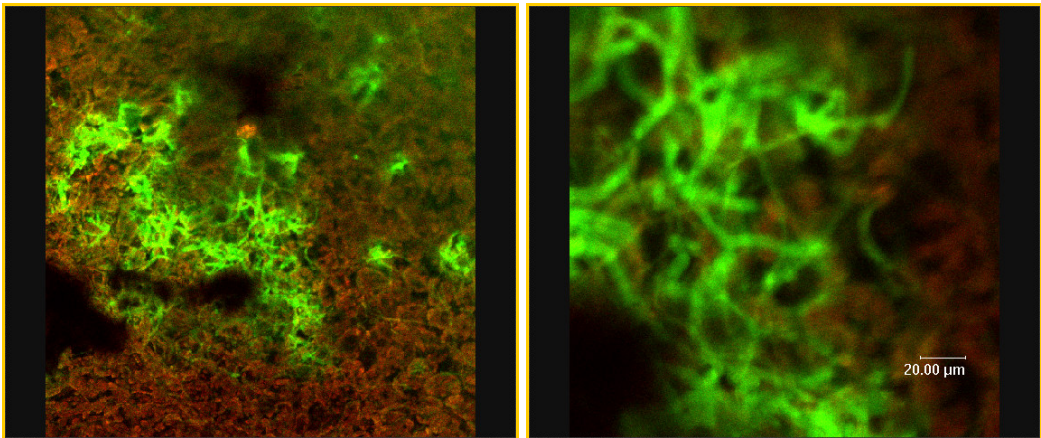
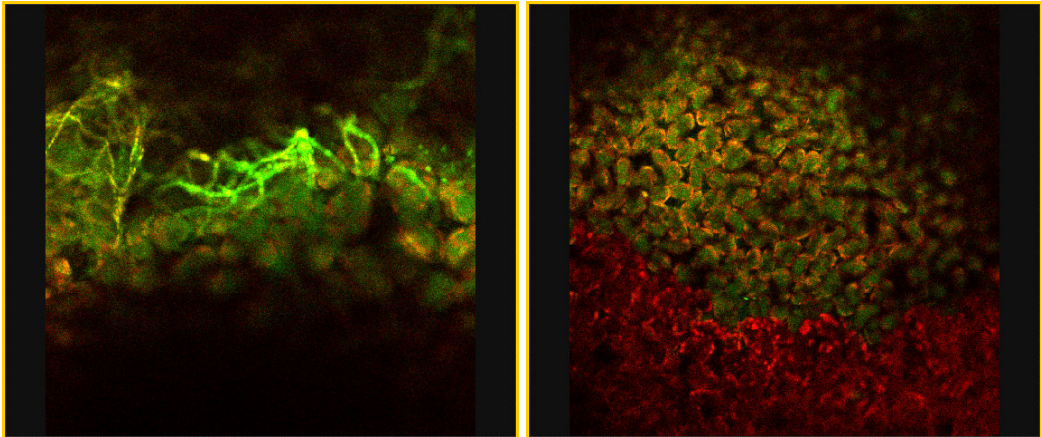
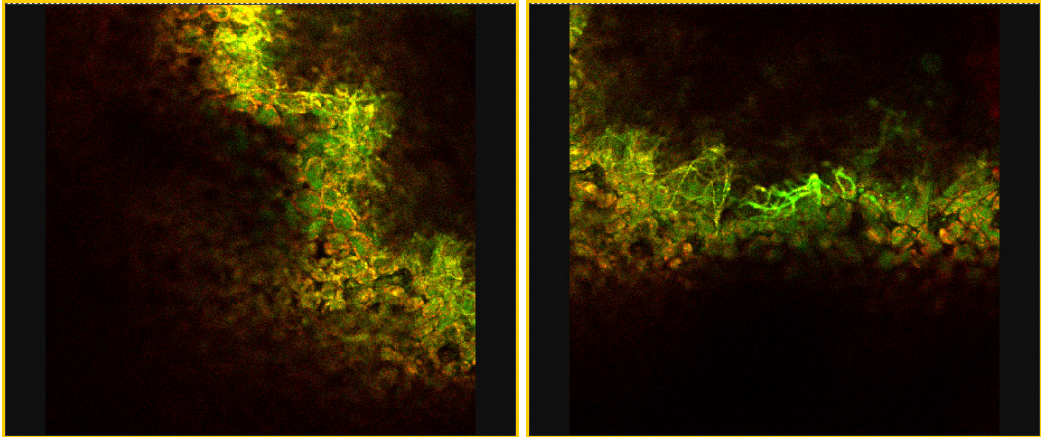


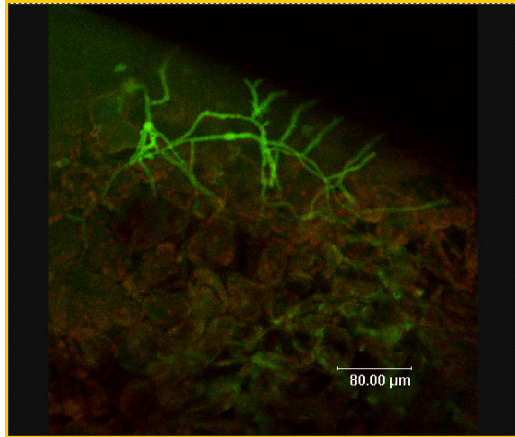
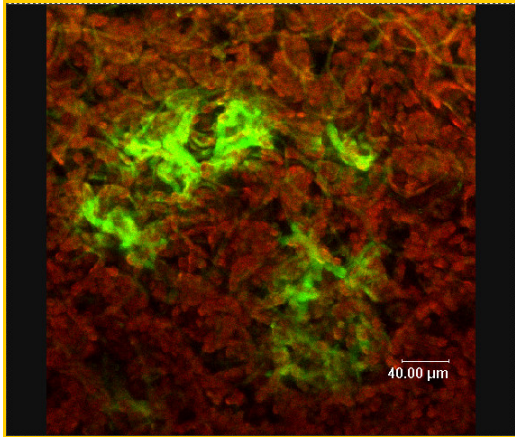
**DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN *B. CINEREA*  
MEDIANTE TINCIÓN CON DAF-2DA EN *ARABIDOPSIS*  
A LAS 72 HPI**











## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R.A., y Mengiste, T. 2006. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *Plant J.* **48**:28-44.
- Adak, S., Bilwes, A.M., Panda, K., Hosfield, D., Aulak, K.S., McDonald, J.F., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Crane, B.R., y Stuehr, D.J. 2002. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:107-112.
- Adams, J.M., y Cory, S. 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:715-720.
- Alfonso, C., Raposo, R., y Melgarejo, P. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathol.* **49**:243-251.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H.M., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. 2003. Genome-wide Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**:653-657.
- Bang, I.S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.L., Stamler, J.S., y Fang, F.C. 2006. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin hmp. *J. Biol. Chem.* **281**:28039-47.
- Bardas, G.A., Myresiotis, C.K., y Karaoglanidis, G.S. 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**:443-450.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupianez, J.A., y del Rio, L.A. 1999. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274**:36729-36733.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackener, A., Inze, D., Delledonne, M., y Van Breusegem, F. 2007. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **282**:1352-1358.
- Beligni, M.V., y Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.* **24**:267-278.
- Benito, E.P., Arranz, M., y Eslava, A.P. 2000. Factores de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:S43-S46.
- Benito, E.P., ten Have, A., van't Klooster, J.W., y 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**:207-220.
- Berrie, A.M., Harris, D.C., y Xu, X.M. 2002. A potential system for managing *Botrytis* and powdery mildew in main season strawberries. *Acta Hort.* **567**:647-649.

- Bethke, P.C., Gubler, F., Jacobsen, J.V., y Jones, R.L. 2004. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**:847-55.
- Boccaro, M., Mills, C.E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R.K., y Delledonne, M. 2005. Flavohaemoglobin 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**:226-37.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* **11**:66-75.
- Bolanos, J.P., Herrero-Mendez, A., Fernandez-Fernandez, S., y Almeida, A. 2007. Linking glycolysis with oxidative stress in neural cells: a regulatory role for nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:1224-1227.
- Bonamore, A., Gentili, P., Ilari, A., Schinina, M.E., y Boffi, A. 2003. *Escherichia coli* flavohemoglobin is an efficient alkylhydroperoxide reductase. *J. Biol. Chem.* **278**:22272-22277.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., y Lipton, S.A. 1995. Apoptosis and necrosis - 2 distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:7162-7166.
- Botrel, A., Magne, C., y Kaiser, W.M. 1996. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* **34**:645-652.
- Botrytis-cinerea-Sequencing-Project. 2008. Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broad.mit.edu>) [Online].
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y., y Mansuy, D. 1992. Cytochrome P450 Catalyzes the Oxidation of N-Omega-Hydroxy-L-Arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to Nitric-Oxide and Citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:880-886.
- Boveris, A., Costa, L.E., Poderoso, J.J., Carreras, M.C., y Cadenas, E. 2000. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**:121-135.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J., y Andrianopoulos, A. 2005. The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffei*. *Mol. Microbiol.* **55**:1487-1501.
- Braumann, I., van den Berg, M., y Kempken, F. 2008. Repeat induced point mutation in two asexual fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **53**:287-297.
- Brito, N., Espino, J.J., y Gonzalez, C. 2006. The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:25-32.
- Buisson, N., y Labbe-Bois, R. 1998. Flavohemoglobin expression and function in *Saccharomyces cerevisiae*; no relationship with respiration and complex response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**:9527-33.
- Buttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Bruckner, B., y Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* **25**:445-50.

- Cadenas, E., Poderoso, J.J., Antunes, F., y Boveris, A. 2000. Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic. Res.* **33**:747-756.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M.E., Benuzzi, D., y de Tosetti, M.I.S. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Food Microbiol.* **113**:251-257.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., y Werner, T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* **21**:2933-42.
- Cassanova, N., O'Brien, K.M., Stahl, B.T., McClure, T., y 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**:7645-53.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., y Cogoni, C. 2002. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev.* **16**:790-5.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., y Turgeon, B.G. 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell* **2**:1151-61.
- Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B., y Low, P.S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* **12**:2191-2199.
- Cevahir, G., Aytamka, E., y Erol, C. 2007. The role of nitric oxide in plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **21**:13-17.
- Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., y Vartapetian, A.B. 2004. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* **16**:157-171.
- Choi, J.K., y Kim, Y.J. 2008. Epigenetic regulation and the variability of gene expression. *Nat. Genet.* **40**:141-7.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* **15**:532-4, 536-7.
- Clergeot, P.H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.P., Pepin, R., Tharreau, D., Notteghem, J.L., y Lebrun, M.H. 2001. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:6963-6968.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., y Macino, G. 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J.* **15**:3153-63.
- Colmenares, A.J., Aleu, J., Duran-Patron, R., Collado, I.G., y Hernandez-Galan, R. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* **28**:997-1005.

- Conrath, U., Amoroso, G., Kohle, H., y Sultemeyer, D.F. 2004. Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J.* **38**:1015-1022.
- Corker, H., y Poole, R.K. 2003. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*; dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **278**:31584-92.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., y del Rio, L.A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**:145-150.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**:10881-90.
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca<sup>2+</sup> and protein kinases. *J. Exp. Bot.* **59**:155-163.
- Crawford, M.J., Sherman, D.R., y Goldberg, D.E. 1995. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* flavohemoglobin gene expression. *J. Biol. Chem.* **270**:6991-6.
- Crawford, N.M., y Guo, F.Q. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* **10**:195-200.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y.M., Okamoto, M., y Mack, A. 2006. Plant nitric oxide synthase: back to square one - Response. *Trends Plant Sci.* **11**:526-527.
- Cueto, M., HernandezPerera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S., y Golvano, M.P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* **398**:159-164.
- Darras, A.I., Joyce, D.C., Terry, L.A., Pompodakis, N.E., y Dimitriadis, C.I. 2007. Efficacy of postharvest treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate against *Botrytis cinerea* infecting cut *Freesia hybrida* L. flowers. *Austral. Plant Pathol.* **36**:332-340.
- de Guido, M.A., Angelini, R.M.D., Pollastro, S., Santomauro, A., y Faretra, F. 2007. Selection and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to fenhexamid. *J. Plant Pathol.* **89**:203-210.
- de Jesus-Berrios, M., Liu, L., Nussbaum, J.C., Cox, G.M., Stamler, J.S., y Heitman, J. 2003. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr. Biol.* **13**:1963-8.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N., y Talbot, N.J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**:244-245.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., y Williamson, B. 1999. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant J.* **20**:485-492.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Colmenares, A.J., Collado, I.G., y Williamson, B. 2001. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **57**:689-692.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:390-396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., y Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**:585-8.



- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., y 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**:13454-9.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., y French, R. 2001. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:6957-62.
- Doehlemann, G., Berndt, P., y Hahn, M. 2006. Different signalling pathways involving a G alpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol. Microbiol.* **59**:821-835.
- Doss, R.P., Deisenhofer, J., von Nidda, H.A.K., Soeldner, A.H., y McGuire, R.P. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **63**:687-691.
- Durner, J., Wendehenne, D., y 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**:10328-10333.
- Durner, J., Gow, A.J., Stamler, J.S., y Glazebrook, J. 1999. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:14206-14207.
- El Oirdi, M., y Bouarab, K. 2007. Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* **175**:131-9.
- Elad, Y., y Stewart, A. 2004. Microbial control of *Botrytis spp.*, p. 223-241, *In* Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynsk and N. Delen, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Faretra, F., Antonacci, E., y Pollastro, S. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2543-2550.
- Favey, S., Labesse, G., Vouille, V., y Boccara, M. 1995. Flavohaemoglobin Hmpx - a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain-3937. *Microbiol.-UK* **141**:863-871.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y.Q., Pallas, J.A., y Loake, G.J. 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:8054-8059.
- Ferret, P.J., Soum, E., Negre, O., Wollman, E.E., y Fradelizi, D. 2000. Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells. *Biochem. J.* **346 Pt 3**:759-65.
- Finkers, R., van Heusden, A.W., Meijer-Dekens, F., van Kan, J.A., Maris, P., y Lindhout, P. 2007a. The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theor. Appl. Genet.* **114**:1071-80.
- Finkers, R., van den Berg, P., van Berloo, R., ten Have, A., van Heusden, A.W., van Kan, J.A., y Lindhout, P. 2007b. Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **114**:585-93.
- Fitzgerald, A., van Kan, J.A.L., y Plummer, K.M. 2004. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet. Biol.* **41**:963-971.

- Fitzhugh, A.L., y Keefer, L.K. 2000. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1463-9.
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H., y 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**:718-30.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., y Durner, J. 2000. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* **23**:817-824.
- Frey, A.D., Farres, J., Bollinger, C.J.T., y Kallio, P.T. 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4835-4840.
- Fritz, R., Lanen, C., Colas, V., y Leroux, P. 1997. Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pestic. Sci.* **49**:40-46.
- Fujii, T., y Takaya, N. 2008. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* involves NADH-nitrate reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**:412-20.
- Fulci, V., y Macino, G. 2007. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:199-203.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., y Salzman, A.L. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:10378-83.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., Dou, Y., Li, T.S., Olson, J.S., Zhu, H., y Riggs, A.F. 2000. Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins - Sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition. *J. Biol. Chem.* **275**:31581-31587.
- Germeier, C., Hedke, K., y Vontiedemann, A. 1994. The use of pH-indicators in diagnostic media for acid-producing plant-pathogens. *Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* **101**:498-507.
- Gil-ad, N.L., Bar-Nun, N., Noy, T., y Mayer, A.M. 2000. Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**:121-6.
- Gilberthorpe, N.J., y Poole, R.K. 2008. Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium* - Roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J. Biol. Chem.* **283**:11146-11154.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., y Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* **14**:1177-1185.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K., y Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuata*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* **89**:967-973.
- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B., y Dam, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**:179-191.
- Gong, X.Y., Fu, Y.P., Jiang, D.H., Li, G.Q., Yi, X.H., y Peng, Y.L. 2007. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**:1368-1379.

- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M.H., y Levis, C. 2004. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Mol. Microbiol.* **51**:619-629.
- Govrin, E.M., y Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**:751-7.
- Govrin, E.M., y Levine, A. 2002. Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Mol. Biol.* **48**:267-76.
- Grindle, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **111**:109-120.
- Gronover, C.S., Kasulke, D., Tudzynski, P., y Tudzynski, B. 2001. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interactions* **14**:1293-1302.
- Gubler, W.D., Marois, J.J., Bledsoe, A.M., y Bettiga, L.J. 1987. Control of *Botrytis* bunch rot of grape with canopy management. *Plant Dis.* **71**:599-601.
- Guo, F.Q., Okamoto, M., y Crawford, N.M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**:100-3.
- Hamada, W., Soulie, M.C., Malfatti, P., Bompeix, G., y Boccara, M. 1997. Stability and modulated expression of a hygromycin resistance gene integrated in *Botrytis cinerea* transformants. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**:187-93.
- Hanahan, D., Jessee, J., y Bloom, F.R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**:63-113.
- Hausladen, A., Gow, A.J., y Stamler, J.S. 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:14100-5.
- Hausladen, A., Gow, A., y Stamler, J.S. 2001. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:10108-12.
- Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *Biocontrol* **47**:85-99.
- Hernandez-Urzua, E., Zamorano-Sanchez, D.S., Ponce-Coria, J., Morett, E., Grogan, S., Poole, R.K., y Membrillo-Hernandez, J. 2007. Multiple regulators of the Flavohaemoglobin (hmp) gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium include ramA, a transcriptional regulator conferring the multidrug resistance phenotype. *Arch. Microbiol.* **187**:67-77.
- Hernandez-Urzua, E., Mills, C.E., White, G.P., Contreras-Zentella, M.L., Escamilla, E., Vasudevan, S.G., Membrillo-Hernandez, J., y Poole, R.K. 2003. Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**:34975-82.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., y Stamler, J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:150-166.
- Hilber, U.W., Schwinn, F.J., y Schuepp, H. 1995. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *J. Phytopathol.-Phytopathol. Z.* **143**:423-428.

- Hong, I.S., Kim, Y.K., Choi, W.S., Seo, D.W., Yoon, J.W., Han, J.W., Lee, H.Y., y Lee, H.W. 2003. Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **222**:177-182.
- Hong, J.K., Yun, B.W., Kang, J.G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., y Loake, G.J. 2008. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. J. Exp. Bot. **59**:147-154.
- Hromatka, B.S., Noble, S.M., y 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**:4814-4826.
- Huang, D., Bhairi, S., y Staples, R.C. 1989. A transformation procedure for *Botryotinia squamosa*. Curr. Genet. **15**:411-414.
- Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K.A., y Boffi, A. 2002. The X-ray structure of ferric *Escherichia coli* flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket. J. Biol. Chem. **277**:23725-23732.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G.X., Vogelsberg, J., Kogel, K.H., y Huckelhoven, R. 2006. Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. Mol. Plant Pathol. **7**:279-284.
- Irelan, J.T., y Selker, E.U. 1996. Gene silencing in filamentous fungi: RIP, MIP and quelling. J. Genet. **75**:313-324.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schussler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossmann, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., y Vilgalys, R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature **443**:818-22.
- Jarvis, W.R. 1962. Splash Dispersal of Spores of *Botrytis Cinerea* Pers. Nature **193**:599-&.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., y Adrian, M. 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem. **50**:2731-41.
- Jeon, J., Park, S.Y., Chi, M.H., Choi, J., Park, J., Rho, H.S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Park, J.Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M.J., Han, S.S., Kim, B.R., Khang, C.H., Park, B., Lim, S.E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H.S., Kim, H., Kang, S., Choi, W.B., y Lee, Y.H. 2007. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. Nature Genet. **39**:561-565.
- Juge, N. 2006. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. Trends Plant Sci. **11**:359-67.

- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., y Mayama, S. 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:769-776.
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L., y van Kan, J.A.L. 2005a. Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol. Plant Pathol.* **6**:641-652.
- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A.E., y van Kan, J.A.L. 2005b. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* **43**:213-225.
- Katan, T., Elad, Y., y Yunis, H. 1989. Resistance to diethofencarb (Npc) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* **38**:86-92.
- Kato, H., Asai, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N., y Kawakita, K. 2008. Involvement of NbNOA1 in NO production and defense responses in INF1-treated *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Plant Pathol.* **74**:15-23.
- Keilin, D. 1953. Occurrence of haemoglobin in yeast and the supposed stabilization of the oxygenated cytochrome oxidase. *Nature* **172**:390-393.
- Kerssies, A., BoskervanZessen, A.I., Wagemakers, C.A.M., y vanKan, J.A.L. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* **81**:781-786.
- Kim, S.O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M.N., y Poole, R.K. 1999. Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* **445**:389-394.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., y Denby, K.J. 2005. Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J.* **44**:25-36.
- Klimpel, A., Gronover, C.S., Williamson, B., Stewart, J.A., y Tudzynski, B. 2002. The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* **3**:439-450.
- Kolla, V.A., y Raghavendra, A.S. 2007. Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* **130**:91-98.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**:8125-48.
- Kozak, M. 1990. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:8301-5.
- Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **115**:887-903.
- Kronstad, J.W. 1997. Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci.* **2**:193-199.
- Kulakiotu, E.K., Thanassouloupoulos, C.C., y Sfakiotakis, E.M. 2004. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. *Phytopathology* **94**:1280-1285.
- Kulkarni, R.D., Thon, M.R., Pan, H., y Dean, R.A. 2005. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biol.* **6**:R24.

- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-163.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A., y Boccara, M. 2006. Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytol.* **170**:537-50.
- Lawrence, M.G., y Crutzen, P.J. 1999. Influence of NO<sub>x</sub> emissions from ships on tropospheric photochemistry and climate. *Nature* **402**:167-170.
- Leone, G. 1990. In vivo and in vitro phosphate dependent polygalacturonase production by different isolates of *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **94**:1039-1045.
- Leshem, Y.Y., y Haramaty, E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *J. Plant Physiol.* **148**:258-263.
- Levis, C., Fortini, D., y Brygoo, Y. 1997. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Curr. Genet.* **32**:157-162.
- Lin, K.T., Xue, J.Y., Nomen, M., Spur, B., y Wong, P.Y.K. 1995. Peroxynitrite induced apoptosis in HI-60 cells. *J. Biol. Chem.* **270**:16487-16490.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., y Bellincampi, D. 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **143**:1871-80.
- Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J., y Stamler, J.S. 2000. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:4672-6.
- Lorbeer, J.W. 1980. Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*, p. 19-40, *In* J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK.
- Lorenz, D.H. 1983. Investigations on the morphological variability and the pathogenicity of *Botrytis cinerea* Pers and *Botryotinia fuckeliana* Whetz. *Z. Pflanzk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* **90**:622-633.
- Macmicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N., Chen, H., y Mudgett, J.S. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* **81**:641-650.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., y Ninnemann, H. 2001. Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiol.* **126**:1323-1330.
- Malolepsza, U., y Rozalska, S. 2005. Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance- Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* **43**:623-35.
- Mannick, J.B., y Schonhoff, C.M. 2002. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.* **408**:1-6.
- Mansfield, J.W., y Richardson, A. 1981. The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **19**:41.

- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., y Legendre, L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Ecol. **43**:359-366.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., y Bryant, S.H. 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. Nucleic Acids Res. **35**:237-40.
- Martin, S.J., y Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis death by 1000 cuts. Cell **82**:349-352.
- Membrillo-Hernandez, J., Coopamah, M.D., Channa, A., Hughes, M.N., y Poole, R.K. 1998. A novel mechanism for upregulation of the *Escherichia coli* K-12 hmp (flavo-haemoglobin) gene by the 'NO releaser', S-nitrosoglutathione: nitrosation of homocysteine and modulation of MetR binding to the glyA-hmp intergenic region. Mol. Microbiol. **29**:1101-1112.
- Milling, R.J., y Richardson, C.J. 1995. Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil - 2) Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. Pestic. Sci. **45**:43-48.
- Mitchell, H.H., Shonle, H.A., y Grindley, H.S. 1916. The origin of the nitrates in the urine. J. Biol. Chem. **24**:461-490.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Magalhaes, J.R., y Salgado, I. 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. FEBS Lett. **579**:3814-3820.
- Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., y Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high-molecular-weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Res. **20**:6115-6116.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., y Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. **43**:109-142.
- Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., y Helmann, J.D. 2004. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. J. Bacteriol. **186**:4655-4664.
- Morozkina, E.V., y Kurakov, A.V. 2007. Dissimilatory nitrate reduction in fungi under conditions of hypoxia and anoxia: A review. Appl. Biochem. Microbiol. **43**:544-549.
- Moyano, C., Gomez, V., y Melgarejo, P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. J. Phytopathol. **152**:484-490.
- Moyano, C., Raposo, R., Gomez, V., y Melgarejo, P. 2003a. Integrated *Botrytis cinerea* management in southeastern spanish greenhouses. J. Phytopathol.-Phytopathol. Z. **151**:80-85.
- Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R., y Melgarejo, P. 2003b. Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. Eur. J. Plant Pathol. **109**:515-522.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Deighton, N., Lyon, G.D., y Williamson, B. 2001a. *Botrytis cinerea* induces the formation of free radicals in fruits of

- Capsicum annuum* at positions remote from the site of infection - Rapid communication. *Protoplasma* **218**:112-116.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Williamson, B., Lyon, G.D., y Deighton, N. 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* **53**:207-214.
- Muckenschnabel, I., Williamson, B., Goodman, B.A., Lyon, G.D., Stewart, D., y Deighton, N. 2001b. Markers for oxidative stress associated with soft rots in French beans (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Botrytis cinerea*. *Planta* **212**:376-381.
- Muckenschnabel, I., Gronover, C.S., Deighton, N., Goodman, B.A., Lyon, G.D., Stewart, D., y Williamson, B. 2003. Oxidative effects in uninfected tissue in leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*) containing soft rots caused by *Botrytis cinerea*. *J. Sci. Food Agric.* **83**:507-514.
- Mur, L.A., Carver, T.L., y Prats, E. 2006. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**:489-505.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., y Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* **59**:501-520.
- Nakagawa, S., Niimura, Y., Gojobori, T., Tanaka, H., y Miura, K. 2008. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* **36**:861-71.
- Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B.Q., Kadotani, N., Tosa, Y., y Mayama, S. 2005. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet. Biol.* **42**:275-83.
- Nguyen, Q.B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., y Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Mol. Microbiol.* **68**:1348-65.
- Ninnemann, H., y 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**:393-398.
- Oliver, R.P., y Solomon, P.S. 2004. Does the oxidative stress used by plants for defence provide a source of nutrients for pathogenic fungi? *Trends Plant Sci.* **9**:472-473.
- Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J., y Crane, B.R. 2002. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **41**:11071-11079.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W., y Goldman, S.L. 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**:359-366.
- Patkowski, J. 2006. Role of hydrogen peroxide and apoplastic peroxidase in tomato - *Botrytis cinerea* interaction. *Acta Physiol. Plant.* **28**:589-598.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, A., Sonoda, M., Lamb, C., y Delledonne, M. 2004. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**:2785-2794.
- Pillonel, C., y Meyer, T. 1997. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic. Sci.* **49**:229-236.



- Pollastro, S., Faretra, F., DiCanio, V., y DeGuido, A. 1996. Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**:607-613.
- Poole, R.K., Anjum, M.F., Membrillo-Hernandez, J., Kim, S.O., Hughes, M.N., y Stewart, V. 1996. Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**:5487-92.
- Powell, A.L., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., y Labavitch, J.M. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:942-50.
- Powelson, R.L. 1960. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **50**:491-494.
- Prats, E., Mur, L.A.J., Sanderson, R., y Carver, T.L.W. 2005. Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol. Plant Pathol.* **6**:65-78.
- Prins, T.W., Wagemakers, L., Schouten, A., y van Kan, J.A.L. 2000. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **1**:169-178.
- Proudfoot, N.J., y Brownlee, G.G. 1976. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**:211-4.
- Ramos, B., Alves-Santos, F.M., Garcia-Sanchez, M.A., Martin-Rodrigues, N., Eslava, A.P., y Diaz-Minguez, J.M. 2007. The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet. Biol.* **44**:864-76.
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V., y Melgarejo, P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathol.* **45**:497-505.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T., y Melgarejo, P. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology* **90**:1246-1249.
- Reino, J.L., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R., y Collado, I.G. 2004. Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* **152**:563-566.
- Reis, H., Piffi, S., y Hahn, M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **6**:257-267.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W., y Martins, I.S. 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* **445**:283-286.
- Rivas, S., y Thomas, C.M. 2005. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:395-436.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., y Kaiser, W.M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**:103-110.
- Rolke, Y., y Tudzynski, P. 2008. The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **68**:405-423.
- Rolke, Y., Liu, S.J., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B., y Tudzynski, P. 2004. Functional

- analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* **5**:17-27.
- Rolland, S., Jobic, C., Fevre, M., y Bruel, C. 2003. *Agrobacterium* mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr. Genet.* **44**:164-171.
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Matte, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P., y Delledonne, M. 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M.E., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K.J., y Delledonne, M. 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**:4120-4130.
- Rosslénbroich, H.J., y Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* **19**:557-561.
- Rowe, H.C., y Kliebenstein, D.J. 2007. Elevated genetic variation within virulence-associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**:1126-1137.
- Rui, O., y Hahn, M. 2007. The Slt2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Mol. Plant Pathol.* **8**:173-184.
- Sakihama, Y., Nakamura, S., y Yamasaki, H. 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* **43**:290-297.
- Salloum, F.N., Abbate, A., Das, A., Houser, J.E., Mudrick, C.A., Qureshi, I.Z., Hoke, N.N., Roy, S.K., Brown, W.R., Prabhakar, S., y Kukreja, R.C. 2008. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* **294**:H1398-H1406.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarver, A., y DeRisi, J. 2005. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **16**:4781-4791.
- Sasaki, Y., Takaya, N., Nakamura, A., y Shoun, H. 2004. Isolation of flavohemoglobin from the actinomycete *Streptomyces antibioticus* grown without external nitric oxide stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:1106-12.
- Schmidt, H., y Walter, U. 1994. NO at Work. *Cell* **78**:919-925.
- Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B., y van Kan, J.A.L. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **3**:227-238.
- Schulze-Gronover, C., Schumacher, J., Hantsch, P., y Tudzynsk, B. 2005. A novel seven-helix transmembrane protein BTP1 of *Botrytis cinerea* controls expression of GST-encoding genes, but is not essential for pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* **6**:243-256.

- Schumacher, J., Viaud, M., Simon, A., y Tudzynski, B. 2008. The G alpha subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase coordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* **67**:1027-1050.
- Segmuller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., y Tudzynski, P. 2007. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* **6**:211-221.
- Selker, E.U. 1997. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: Useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends Genet.* **13**:296-301.
- Shi, F.M., y Li, Y.Z. 2008. *Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase. *BMB Rep.* **41**:79-85.
- Shoun, H., Kim, D.H., Uchiyama, H., y Sugiyama, J. 1992. Denitrification by Fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**:277-281.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.M., Tudzynski, B., y Tudzynski, P. 2005. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:602-612.
- Siriputthaiwan, P., Jauneau, A., Herbert, C., Garcin, D., y Dumas, B. 2005. Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Cell Sci.* **118**:323-329.
- Solomon, P.S., Waters, O.D.C., Simmonds, J., Cooper, R.M., y Oliver, R.P. 2005. The Mak2 MAP kinase signal transduction pathway is required for pathogenicity in *Stagonospora nodorum*. *Curr. Genet.* **48**:60-68.
- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J.A., y Bakker, F.T. 2007. Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genet. Biol.* **44**:52-63.
- Stakman, E.C. 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* **4**:193-199.
- Stuehr, D.J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1411**:217-230.
- Szibor, M., Richter, C., y Ghafourifar, P. 2001. Redox control of mitochondrial functions. *Antioxid. Redox Signal.* **3**:515-523.
- Takaya, N., Suzuki, S., Matsuo, M., y Shoun, H. 1997. Purification and characterization of a flavohemoglobin from the denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.* **414**:545-8.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., y van Kan, J.A.L. 1998. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:1009-1016.
- ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J., y van Kan, J.A.L. 2001. *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* **33**:97-105.
- Ullmann, B.D., Myers, H., Chiranand, W., Lazzell, A.L., Zhao, Q., Vega, L.A., Lopez-Ribot, J.L., Gardner, P.R., y Gustin, M.C. 2004. Inducible defense

- mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell **3**:715-23.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., y Boccara, M. 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. Mol. Plant Microbe Interact. **16**:360-7.
- Vallejo, I., Carbu, M., Rebordinos, L., y Cantoral, J.M. 2003. Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain. Biologia **58**:1067-1074.
- van Baarlen, P., Staats, M., y 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 Baarlen, P., Ernst, J., Staats, M., y van Kan, J.A.L. 2007. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. Mol. Plant Pathol. **8**:41-54.
- van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Brandwagt, B.F., Vantklooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., y Vankan, J.A.L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. **97**:1193-1200.
- van Kan, J.A.L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends Plant Sci. **11**:247-253.
- van Kan, J.A.L., vantKlooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., Dees, D.C.T., y vanderVlugtBergmans, C.J.B. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. **10**:30-38.
- Vasudevan, S.G., Armarego, W.L.F., Shaw, D.C., Lilley, P.E., Dixon, N.E., y Poole, R.K. 1991. Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a hemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. **226**:49-58.
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.M., y Levis, C. 2003. Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Mol. Microbiol. **50**:1451-1465.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pecheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P., y Legendre, L. 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. Mol. Plant Microbe Interact. **19**:1042-50.
- Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., y Hilber, U.W. 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Mycol. Res. **106**:329-335.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V.G., y Cole, F.M. 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology **94**:850-857.
- Wang, J., y Higgins, V.J. 2005. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. Fungal Genet. Biol. **42**:284-92.
- Weeds, P.L., Beaver, R.E., Sharrock, K.R., y Long, P.G. 1999. A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Physiol. Mol. Plant Pathol. **54**:13-35.

- Wendehenne, D., Durner, J., y Klessig, D.F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:449-55.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., y Durner, J. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**:177-183.
- Williamson, B., Tudzynsk, B., Tudzynski, P., y van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* **8**:561-580.
- Wubben, J.P., ten Have, A., van Kan, J.A.L., y Visser, J. 2000. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **37**:152-157.
- Wubben, J.P., Mulder, W., Ten Have, A., van Kan, J.A.L., y Visser, J. 1999. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1596-1602.
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C., y Legard, D.E. 2001. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Dis.* **85**:901-909.
- Xu, J.R. 2000. MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* **31**:137-152.
- Xu, W.T., Huang, K.L., Guo, F., Qu, W., Yang, J.J., Liang, Z.H., y Luo, Y.B. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol. Technol.* **46**:86-94.
- Ye, R.W., Averill, B.A., y Tiedje, J.M. 1994. Denitrification - production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1053-1058.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M., y Van Breusegem, F. 2006. Nitric oxide and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* **141**:404-11.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., y Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:15811-6.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., y Lamb, C. 2004. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**:2875-86.
- Zhao, X.J., Raitt, D., P, V.B., Clewell, A.S., Kwast, K.E., y Poyton, R.O. 1996. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae* - Evidence for a role in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* **271**:25131-8.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S., y Xu, J.R. 2000. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:724-732.
- Zhu, H., y Riggs, A.F. 1992. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:5015-9.
- Zhu, J., Jambhekar, A., Sarver, A., y Derisi, J. 2006. A Bayesian Network Driven Approach to Model the Transcriptional Response to Nitric Oxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **1**:94.