



FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

AREA: GENÉTICA

CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**VARIACIÓN NATURAL DE *BOTRYTIS CINEREA*, ANÁLISIS
GENÉTICO Y GENÓMICO DE LAS DIFERENCIAS DE
AGRESIVIDAD**

Tesis Doctoral

Wilson Acosta Morel

Dirigida por:

Dr. D. Ernesto Perez Benito

Salamanca, 2018



VARIACIÓN NATURAL DE *BOTRYTIS CINEREA*, ANÁLISIS GENÉTICO Y GENÓMICO DE LAS DIFERENCIAS DE AGRESIVIDAD

Tesis presentada por D. Wilson Acosta Morel para optar al grado de Doctor en
Agrobiotecnología

Fdo.: Wilson Acosta Morel

VºBº

Director de la tesis

Dr. D. Ernesto Perez Benito
Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética
Universidad de Salamanca

Salamanca, 25 de Julio de 2018

Dr. D. Ernesto Pérez Benito, Profesor Titular, del Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la facultad de Biología de la universidad de Salamanca

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**VARIACIÓN NATURAL DE *BOTRYTIS CINEREA*, ANÁLISIS GENÉTICO Y GENÓMICO DE LAS DIFERENCIAS DE AGRESIVIDAD**”, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo mi dirección, por **D. Wilson Acosta Morel**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 25 de Julio de 2018.

Fdo: Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo: D. Wilson Acosta Morel

Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez, Coordinador del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología (RD 99/2011) de la Universidad de Salamanca

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**VARIACIÓN NATURAL DE *BOTRYTIS CINEREA*, ANÁLISIS GENÉTICO Y GENÓMICO DE LAS DIFERENCIAS DE AGRESIVIDAD**”, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del **Dr. D. Ernesto Pérez Benito**, por **D. Wilson Acosta Morel**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 25 de Julio de 2018.

Fdo: Dr. Carlos Nicolás Rodríguez

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio 1 del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Profesor Dr. Ernesto Pérez Benito. Durante el desarrollo de la Tesis he disfrutado de una beca de Doctorado del Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (MESCYT) de República Dominicana. El trabajo realizado ha sido posible gracias a la financiación conseguido en los proyectos SA-02-C2-1 del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Junta de Castilla y León, España, y AGL2012-39876-C02 y AGL2015-66131-C2-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad, España

Agradecimientos

A mi madre, mi padre y mis hermanos.

A Ernesto Pérez Benito por haberme elegido para realizar este trabajo y siempre estar disponible para explicar o responder cualquier duda, que han sido muchas. A José María Díaz Mínguez, Serenella Sukno y Mike Thon por su ayuda con en el laboratorio y con los programas bioinformativos.

A Riccardo Baroncelli por su ayuda con los genomas.

A mi compañera Virginia, por su ayuda tanto en cosas laborales como personales.

A mis compañeros de laboratorio Jonatan, Jose, Raúl, José, Daniela, Vinicio, Alex, Fran, Eduardo, Irene Martin y Elena.

A Verti, por ser mi fiel compañero, siempre.

A Victoria, por ayudarme siempre con trámites.

A Irene, por se la mejor compañera de piso del mundo y por su ayuda en las extracciones de ADN.

A los estudiantes que trabajaron conmigo en el laboratorio: Antonio, Carlos, David, Sergio, Ana y Kiko.

A Jorge y Angel, por que cada vez que los veo, recuerdo que todo pudiera ser peor.

Índice

Índice

Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas	IX
Símbolos y Abreviaturas.....	XI
Resumen.....	19
Introducción	¡Error! Marcador no definido.
1 La vid	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Importancia del cultivo de la vid.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2 <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de la vid.....	¡Error! Marcador no definido.
2 <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Aspectos generales.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Sistemática y descripción.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Ciclo de vida	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Ciclo de infección y epidemiología.....	¡Error! Marcador no definido.
2.5 Métodos de control de la enfermedad	¡Error! Marcador no definido.
2.6 Diversidad genética.....	¡Error! Marcador no definido.
3 Variación molecular y genética de poblaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1 Diversidad en el género <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.2 Taxonomía e identificación de especies en el género <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.3 El complejo de especies de <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.4 Diversidad de las poblaciones de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
4 Genómica de <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Secuenciación Pac-Bio.....	¡Error! Marcador no definido.
5 Aplicaciones basadas en el conocimiento del genoma.	¡Error! Marcador no definido.
5.1 Análisis de segregantes agupados	¡Error! Marcador no definido.
6 Justificación del trabajo y estudios previos.....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos	¡Error! Marcador no definido.
Materiales y Métodos.....	¡Error! Marcador no definido.
1 Organismos	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Hongos	¡Error! Marcador no definido.
1.2 Plantas	¡Error! Marcador no definido.
1.3 Bacterias.....	¡Error! Marcador no definido.
2 Medios y Condiciones de Cultivo.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Hongos	¡Error! Marcador no definido.

2.1.1	Cultivo en Medio Líquido de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.1.2	Cultivo en Medio Sólido de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.2	Plantas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3	Bacterias.....	¡Error! Marcador no definido.
3	Manejo de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.1	Extracción y recuento de esporas de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
3.2	Conservación de aislados.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3	Obtención de cultivos monospóricos.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.1	Cultivos derivados de ascoporas individuales.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3.2	Selección de transformantes monospóricos de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
4	Caracterización fisiológica.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1	Preparación de los discos.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2	Ensayos de esporulación.....	¡Error! Marcador no definido.
4.3	Ensayos de producción de esclerocios.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4	Ensayos de infección sobre hojas y sobre frutos de vid.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.1	Preparación del inóculo.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.2	Preparación del material vegetal e inoculación.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.2.1	Inoculación en Vid.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.2.2	Inoculaciones Uvas.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.3	Condiciones en Cámara de Crecimiento.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.4	Lectura del ensayo.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.5	Tratamiento estadístico de los datos.....	¡Error! Marcador no definido.
5	Extracción de ácidos nucleicos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1	ADN genómico de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.1.1	Extracción de ADN genómico de hongos filamentosos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1.2	Método recomendado para la secuenciación PacBio.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2	ADN plasmídico.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2.1	Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid.....	¡Error! Marcador no definido.
6	Vectores de Clonación.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1	pGEM®-T easy.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2	pBluescript II SK (+).....	¡Error! Marcador no definido.
6.3	pNR4.....	¡Error! Marcador no definido.
7	Tratamientos enzimáticos del ADN.....	¡Error! Marcador no definido.
7.1	Enzimas de restricción.....	¡Error! Marcador no definido.
7.2	Ligaciones con T4 ligasa.....	¡Error! Marcador no definido.

7.3	Clonación de fragmentos de ADN con la enzima Clonasa BP	¡Error! Marcador no definido.
8	Electroforesis de ácidos nucleicos	¡Error! Marcador no definido.
9	Recuperación de fragmentos de ADN	¡Error! Marcador no definido.
10	Transformaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
10.1	Transformaciones de <i>E. coli</i>	¡Error! Marcador no definido.
10.2	Transformación de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
12	Evaluación de diversidad genética.....	¡Error! Marcador no definido.
12.1	Estimación de las relaciones genéticas entre individuos.....	¡Error! Marcador no definido.
12.2	Parámetros de diversidad genética de las poblaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
12.3	Estructura genética de las poblaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
13	Cruzamientos entre aislados.....	¡Error! Marcador no definido.
14	Secuenciación	¡Error! Marcador no definido.
14.1	Secuenciación de Fragmentos cortos de ADN.....	¡Error! Marcador no definido.
14.2	Ion Torrent	¡Error! Marcador no definido.
14.3	Pac Bio	¡Error! Marcador no definido.
14.4	Análisis de secuencias.....	¡Error! Marcador no definido.
	Resultados.....	¡Error! Marcador no definido.
1	Trabajos Previos.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1	Recolección de Aislados	¡Error! Marcador no definido.
1.2	Análisis inicial de AFLPs	¡Error! Marcador no definido.
2	Caracterización genética de los individuos	¡Error! Marcador no definido.
2.1	Relaciones de similitud genética.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2	Análisis de secuencias y marcadores moleculares de identificación ...	¡Error! Marcador no definido.
2.3	Caracterización fisiológica de aislados de campo de <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.4	Resistencia a Fenhexamida	¡Error! Marcador no definido.
2.5	Evaluación de la agresividad sobre hojas de vid de los aislados de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.6	Variación en morfotipos, determinación de tipo sexual y determinación de transposones en la población de aislados de <i>Botrytis</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.6.1	Variación en morfotipos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6.2	Tipo sexual.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6.3	Transposones.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6.4	Resumen de la caracterización genética y fisiológica de la población de aislados analizados.....	¡Error! Marcador no definido.

2.7	Cruces intra- e inter específicos	¡Error! Marcador no definido.
3	Análisis de Genética de Poblaciones	¡Error! Marcador no definido.
3.1	Diversidad genotípica dentro de la población de aislados de campo de <i>B. cinerea</i> ...	¡Error! Marcador no definido.
3.2	Estructura de la población.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.1	Coefficientes de Diferenciación	¡Error! Marcador no definido.
3.2.2	Análisis de la variación molecular	¡Error! Marcador no definido.
3.2.3	Correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas	¡Error! Marcador no definido.
4	Análisis genético del carácter agresividad sobre vid en <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
4.1	Análisis de cruzamiento B448 x B371.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2	Análisis de segregación de los microsatélites	¡Error! Marcador no definido.
4.3	Análisis de la progenie: Genotipos de los individuos	¡Error! Marcador no definido.
4.4	Caracterización fisiológica.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.1	Producción de esporas y formación de esclerocios.....	¡Error! Marcador no definido.
4.4.2	Agresividad sobre hojas de vid	¡Error! Marcador no definido.
5	Análisis de segregantes agrupados.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1	Determinación de los polimorfismos existentes entre las dos cepas parentales consideradas, B448 y B371.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2	Análisis de segregantes agrupados en la descendencia.	¡Error! Marcador no definido.
5.3	Análisis de los ensamblajes de novo de los aislados B371 y B448.	¡Error! Marcador no definido.
6	Análisis del cromosoma 4: Estrategia de clonación para localizar el gen con efecto mayor sobre patogenicidad	¡Error! Marcador no definido.
6.1	Descripción de la región que incluye el gen con efecto mayor sobre patogenicidad.	¡Error! Marcador no definido.
	Discusión	¡Error! Marcador no definido.
1	Diversidad fisiológica y genética de <i>B. cinerea</i> en las poblaciones naturales de los viñedos de Castilla y León	¡Error! Marcador no definido.
2	Análisis genético y análisis genómico de la capacidad de infectar de <i>B. cinerea</i>	¡Error! Marcador no definido.
	Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
	Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Índice de Figuras

- Figura 1. Viñedo representativo de Castilla y León..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Infección de *B. cinerea* sobre vid variedad Malvasía (Toro, Zamora)... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* Tomado de (Amselem et al., 2011)... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Ciclo de Infección de *B. cinerea*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5. Tomado Hyde et al. (2014) Árbol filogenético de *Botrytis* sp. actualizado, basado en las secuencias de los genes..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Mapa circular del plásmido pGem®-T Easy..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7. Mapa del plásmido circular pBluescript II SK (+/-)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8. Mapa circular del plásmido pNR4..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9. Mapa de las zonas productoras de vino de Castilla y León visitadas en este estudio para recoger aislados de *Botrytis*. (1) Arribes; (2) Cigales; (3) Ribera del Duero; (4) Rueda; (5) Sierra de Francia; (6) Toro. (* Viñedos visitados)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10. Análisis de Coordenadas Principales realizado con los datos de la población original (en el programa NTSyS). En rojo fue marcado el grupo mayoritario que se agrupa en este análisis y en color verde fue marcado el grupo que se separa de la mayoría de los aislados..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Dendrograma generado mediante el método de agrupamiento UPGMA utilizando una matriz (con clones) de coeficiente de similitud tipo DICE entre aislados de *B. cinerea*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 12. Arbol filogenetico de Secuencias GAPDH y HSP60 concatenadas..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 13. Marcadores moleculares utilizados para la determinación y discriminación de genotipos de especies de *Botrytis*. (a) análisis de PCR-RFLP del gen *Bc-hch* (Fournier et al., 2003) en los aislados indicados. (b) Genotipo del locus *Bc6* (Fournier et al., 2002) in the indicated isolates. (c) Determinación de presencia/ausencia de una inserción de 21 pares de bases en el gen *Bcmrr1* (Leroch et al., 2013) en los aislados indicados..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 14. Evaluación de agresividad en hojas de *V. vinifera* de los aislados identificados como *B. pseudocinerea*, *B. prunorum* y “relacionados” a “*B. californica*”, junto con aislados seleccionados de *B. cinerea*. Las hojas lesionadas e inoculadas fueron incubadas a 22°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad durante 96 horas. Las imágenes de las hojas inoculadas con aislados representativos se muestran debajo..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 15. Evaluación de agresividad en uvas de mesa de los aislados identificados como *B. pseudocinerea*, *B. prunorum* y “relacionados” a *B. californica*, junto con aislados seleccionados de *B. cinerea*. Frutos lesionados e inoculados fueron incubados a 22°C bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por 120 horas. Las imágenes de las uvas inoculadas con aislados representativos se muestran debajo..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 16. Evaluación de la resistencia a fenhexamida de aislados representativos de las diferentes especies identificadas en este trabajo. *B. cinerea* grupo N: B448 y B547; *B. cinerea* grupo S: B249; *B. pseudocinerea*; B209; *B. prunorum*: B400; relacionado con *B. californica*: B568. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 17. (a) Resumen de la distribución del fenotipo “Agresividad en hojas de *V. vinifera*” en las poblaciones de los aislados de campo de *B. cinerea* analizados representada en un diagrama de caja. (b) Infección de aislados representativos en hojas *V. vinifera*: B459 es un aislado no agresivo, B444 es un aislado muy agresivo y B300 es un aislado moderadamente agresivo. Las hojas inoculadas fueron incubadas a 22°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 96 horas. (c) Imágenes de hojas inoculadas con los aislados indicados en (b). **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 18. Aislados representativos de los distintos morfotipos identificados en la población analizada (B547: Conidial; B448: Conidial-sclerocial; B459: Micelial)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 19. Cladograma UPGMA de las poblaciones de *B. cinerea* establecidas según las variedades de vid a partir de las cuales los aislados fueron recogidos y construido sobre los valores de Distancia Genética de Nei entre subpoblaciones..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 20. Fenotipos de los aislados B371 y B448 en relación con los dos caracteres analizados: agresividad sobre vid y sobre judía, y capacidad de esporulación. Las plantas de judía y las hojas de vid inoculadas fueron incubadas durante 96 h en condiciones de fotoperiodo 16/8 antes de tomar las fotografías. Debajo

- de las plantas y hojas infectadas por cada aislado se presentan placas en las que se pueden visualizar los morfotipos característicos de uno y otro aislado. Se presenta en la parte inferior de la figura un ejemplo de los apotecios producidos en el cruzamiento..... ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 21. Caracterización mediante PCR del locus microsatélite Bc292 en los aislados parentales B448 y B371 y en los individuos descendientes 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17. Primera carrera: marcador de tamaño ladder de 100 pnt..... ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 22. Aislados 112 y 142 de *B. cinerea* de la descendencia del cruzamiento B448 x B371. 112 produce abundantes esclerocios; 142 no produce esclerocios. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 23. Agresividad de las cepas parentales B371, B448 y los 183 aislados de la descendencia sobre hojas de vid (variedad tempranillo) estimada como el diámetro medio de lesión (mm) a las 96 horas después de la inoculación. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos de inoculación independientes (\pm DS)..... ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 24 Distribución del fenotipo “Agresividad en hojas de *V. vinifera*” en los descendientes agresivos analizados representada en un diagrama de caja. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 25 Diagrama de Venn resultado de combinar los polimorfismos identificados en los aislados B448 y B371 en relación con el genoma de referencia del aislado B05.10. Se representan todas las mutaciones detectadas (diagrama superior) y solo aquellas que afectan a secuencia codificante (diagrama inferior). ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 26. Esquema que presenta el fundamento de la estrategia de Análisis de Segregantes Agrupados para tratar de identificar marcadores moleculares asociados a genes de interés. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 27. Muestra de los aislados de la descendencia del cruzamiento B448 x B371 seleccionados como integrantes del grupo de aislados que esporulan y que infectan (panel Izquierdo de la imagen) y del grupo de aislados que no esporulan y que no infectan (parte Derecha de la imagen.). ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 28 Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 1 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 29 Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 2 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 30. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 3 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 31. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 4 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 32. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 5

(coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes.

- ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 41. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 14 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 42. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 15 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 43. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 16 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 44. Análisis de segregantes agrupados en el cruzamiento B488 x B371. Diagrama de puntos representando las diferencias de frecuencias (Freq. P4 – Freq. P3) de las variantes específicas del aislado B371 (panel superior) y específicas del aislado B448 (panel inferior) en los dos grupos de aislados descendientes considerados, P3 y P4, (representadas en el eje Y) localizadas en el cromosoma 17 (coordenadas indicadas en el eje X del diagrama). Los puntos azules representan polimorfismos en regiones no codificantes. Los puntos anaranjados representan polimorfismos en regiones codificantes. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 45. Regiones del Cromosoma 4 donde se observa asociación de variantes específicas de los aislados B371 y B448 con los fenotipos de agresividad considerados. Las regiones (I y II) están enmarcadas con cajas de color rojo. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 46. Alineamiento de los supercontigs de los ensamblajes B371 y B448 sobre los cromosomas 1, 2, 3 y 4 del aislado de referencia B05.10. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 47. Alineamiento de los supercontigs de los ensamblajes B371 y B448 sobre los cromosomas 5, 6, 7 y 8 del aislado de referencia B05.10. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 48. Alineamiento de los supercontigs de los ensamblajes B371 y B448 sobre los cromosomas 9, 10, 11 y 12 del aislado de referencia B05.10. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 49. Alineamiento de los supercontigs de los ensamblajes B371 y B448 sobre los cromosomas 13, 14, 15 y 16 del aislado de referencia B05.10. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 50. Alineamiento de los supercontigs de los ensamblajes B371 y B448 sobre los cromosomas 1, 2, 3 y 4 del aislado de referencia B05.10. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 51. Alineamiento de los supercontigs de los aislados B448 y B371 que corresponden con el cromosoma 4 del aislado B05.10 utilizando el programa Mauve. Se indican con rectángulos de color rojo las posiciones de las dos regiones candidatas identificadas en el análisis de segregantes agrupados. ... ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 52. Ubicación de la región candidata II en el cromosoma 4 de B. cinerea y esquema de los fragmentos de ADN de esta región que fueron clonados a partir del genoma del aislado B448 para su caracterización funcional en B371. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 53. Transformantes del aislado B371 obtenidos con el plásmido pWAM15 (1 a 10) y con los plásmidos pWAM12 y pWAM 23. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 54. Evaluación de la agresividad sobre hojas de vid de dos transformantes obtenidos con el plásmido pWAM15 en comparación con la agresividad de los aislados B371 y B448. Las hojas inoculadas fueron

incubadas durante 72 h desde la inoculación antes de tomar las fotografías. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 55. Representación de la región del cromosoma 4 amplificada mediante PCR con los oligonucleótidos diseñados al efecto (posiciones de anillamiento indicadas mediante un triángulo amarillo y un triángulo azul), mostrada en la parte inferior de la imagen con una caja de color azul oscuro, clonada en el plásmido pWAM15. Se indican los elementos incluidos en la anotación del genoma del aislado B01.10 de referencia en esta región (parte superior de la imagen)..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 56. Visualización de la localización del gen Bcin04g03490 en el cromosoma 4 del aislado B05.10 y organización de los tres transcritos anotados para el mismo según se recoge en el servidor Ensemblfungi (https://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Gene/Summary?g=Bcin04g03490;r=4:1251119-1255347;t=Bcin04g03490.2;db=core). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 57. Alineamiento de las de las secuencias de las proteínas codificadas por los tres transcritos descritos de gen Bcin04g03490. (Se indica con una caja en amarillo el aminoácido sustituido en la variante codificada por el alelo del gen característico del aislado B371). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 58. Dominios conservados identificados en la proteína Bcin04g03490P1. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 59. Localización de los polimorfismos identificados en la región candidata en los genomas de los aislados B371 y B448..... **¡Error! Marcador no definido.**

Índice de Tablas

- Tabla 1. Información general de los genomas de los aislados T4 y B05.10 tomado de Amselem y col. (2011).
..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 2. Colección de aislados de campo de *B. cinerea* analizados en este trabajo(* Racimo asintomático).
..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 4. Resumen de los aislados de *Botrytis* analizados en este trabajo indicando el origen (zona productora de vino –DO-), donde se localizan los viñedos visitados. Se incluyeron en este análisis seis aislados externos de *B. cinerea* que representan cepas de referencia previamente caracterizadas. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 5. Números de acceso de Genebank de las secuencias de los genes G3PDH y HSP60 determinadas en este trabajo en los aislados de campo indicados. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 6. Números de acceso de Genebank de las secuencias de los genes G3PDH y HSP60 de los aislados representativos de las especies del género *Botrytis* consideradas en este trabajo que fueron descargadas de la base de datos de NCBI. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 7. Número de aislados en cada subpoblación clasificados de acuerdo con el morfotipo que muestran (ND: No determinado). ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 8. Número de aislados en cada población clasificados según el tipo sexual. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 9. Número de aislados en cada población clasificados según el tipo de transposon identificado en cada aislado sexual. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 10. Caracterización de los individuos que integran la colección aislados de campo de los viñedos de Castilla y León analizados en este trabajo en relación con el “tipo sexual”, “morfotipo”, “agresividad sobre hojas de vid” y “tipos de transposon”..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 11. Cruces intentados entre los aislados de campo seleccionados de *B. cinerea* y aislados representativos de tres especies de *Botrytis* identificadas en este trabajo. Como referencia se utilizó el aislado SAS56 de *B. cinerea* (Faretra et al., 1988). Los cruces exitosos se representan con el símbolo “+” y los cruces en los que no se pudo observar ningún cuerpo fructífero se representan con el símbolo “-“. En la columna de la izquierda, acompañando al código identificativo de cada aislado se presenta entre paréntesis el idiomorfo correspondiente. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 12. Índices de diversidad genética analizando la población de aislados subdividida en función de la D.O. Análisis realizado con la matriz con clones y la matriz corregida (sin clones)..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 13. Resumen de los racimos de los que los aislados de *Botrytis* fueron purificados y clasificados de acuerdo con el número de individuos aislados purificados de cada racimo. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 14. Cálculo del coeficiente de Diferenciación (G_{st}) y del número de migrantes (N_m) en la población original con clones y en la población corregida sin clones..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 15. Análisis de la varianza molecular en las poblaciones de *B. cinerea* teniendo en cuenta el factor de agrupamiento D.O., año de colección y tipo de transposón. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 16. Distancias genéticas de Nei entre subpoblaciones de aislados de campo de *B. cinerea* (debajo de la diagonal) y distancias geográficas lineales (en kilómetros entre las localidades elegidas como representativas del centro geográfico (encima de la diagonal), de las DO consideradas en este trabajo.
..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 17. Cruzamientos de aislados de *B. cinerea* realizados y cantidad de descendientes en cada caso purificados de forma de cultivo monoasporico. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 18. Loci Microsatelites polimórficos entre los aislados 448 y 371, utilizados para caracterizar los aislados de la descendencia del cruce 448x371. Se indican los tamaños (pnt) de los alelos alternativos. ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 19. Genotipo de 100 individuos de la descendencia analizados en relación con los loci microsatélite Bc306, Bc389, Bc292 y Bc327..... ¡Error! Marcador no definido.
- Tabla 20. Tabla resumen de los datos de segregación de los loci microsatélite Bc306, Bc389, Bc292 y Bc327. Se presentan los datos del análisis χ^2 llevado a cabo..... ¡Error! Marcador no definido.

- Tabla 21 Genotipos observados en la población de descendientes del cruzamiento B371 x B448 analizada. Se presentan todos los genotipos que pueden surgir en el cruzamiento, el número de individuos que presenta cada genotipo y la frecuencia genotípica observada en cada caso. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 22 Resumen de la caracterización fisiológica de los aislados B448 y B371 y los aislados de la descendencia proveniente del cruce B448 y B371. Se indica el morfotipo de cada aislado y la estimación de la capacidad de esporulación, de la capacidad de producción de esclerocios y de la agresividad sobre hojas de vid. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 23. Análisis de datos de lecturas de la secuenciación Pac Bio de las cepas B371 y B448. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 24. Lista de plásmidos construidos para transformar el aislado B371. Se indican las coordenadas sobre el cromosoma 4 de los fragmentos de ADN clonados en cada caso. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 25. Transcritos del gen Bcin04g03490 anotados en el servidor Ensemblfungi. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 26. Listados de variantes de ambos los aislados B371 y B448 en el cromosoma 4 entre las posiciones 1.251.166 y 1.256.198. **¡Error! Marcador no definido.**

Símbolos y Abreviaturas

A	Adenina
ABS	<i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
AFLP	Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados
AMOVA	Análisis Molecular de la Varianza
ARN / RNA	Ácido ribonucleico / <i>Ribonucleic acid</i>
ARNss	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
ARNds	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNasa	Ribonucleasa
ATP	Adenosín trifosfato
Bc-hch	Homólogo del gen het-c de <i>Neurospora crassa</i> de compatibilidad vegetativa
BSC	Concepto Biológico de Especie/Biological Species Concept
C	Citosina
°C	Grado Celsius
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cdc-1	<i>Mutación de Ciclo Celular Termosensible</i>
Cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Cyp51	Codificador de una eburicol 14 α -dimetilasa
Cys	Cisteína
DEB	<i>DNA Extraction Buffer</i> (Tampón para extracción de ADN)
D.O.	Denominación de Origen
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
Dpi	Días post-inoculación
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Erg27	codificador de una 3-cetoreductasa
ET	Etileno

<i>et al.</i>	<i>Et alli</i> (Y colaboradores)
ETS	<i>Effector Triggered Susceptibility</i> (Susceptibilidad Desencadenada por Efectores)
ESC	Concepto de Especie Ecológico/ <i>Ecological Species Concept</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FC	Fracción Clonal
FWD / Fwd	<i>Forward</i>
g	Gramo
G	Guanina
G	Diversidad Genotípica
G/N	Diversidad Genotípica Normalizada
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa / <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCPSR	Concordancia Geneológica Filogenética de Reconocimiento de Especies / <i>Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition</i>
Gst	Coefficiente de Diferenciación Génica
h	Diversidad Génica de Nei
hl	Hectolitros
HMG	<i>High-Mobility Group</i>
hpi	Horas post-inoculación
HSP60	Proteína de Choque Térmico/ <i>Heat Shock Protein</i>
HS	Heterocigosidad Esperada
HT	Heterocigosidad Total
IGS	<i>Intergenic Spacer</i> (Región espaciadora intergénica)
INRA	Instituto Nacional de la Investigación Agronómica de Francia
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciadores intergénicos transcritos)
ISD	<i>Resistencia Inducida Sistémica</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
LB	<i>Luria Bertrani</i>

LD	Desequilibrio de Ligamiento
LRR	<i>Leucine-Rich Repeat</i> (Repeticiones ricas en leucinas)
M	Molar
MAT	<i>Mating Type</i>
Mb	Megabase
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>
MFS	<i>Major Facility Superfamily</i>
mg	Miligramo
Mha	Mil hectáreas
Mill. ha	Millones de Hectáreas
mL	Mililitro
MM	Medio mínimo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mrr1	Multiple Resistance Response
MSC	Concepto Morfológico de Especie / <i>Morphological Species Concept</i>
m/V	Masa Volumen
N	Normal
N	Número de Haplotipos
na	Numero de Alelos Observados
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ne	Numero Efectivo de Alelos
NEP1	<i>Necrosis and Ethylene Inducing Proteins 1</i>
NEP2	<i>Necrosis and Ethylene Inducing Proteins 2</i>
ng	Nanogramo
Nm	Flujo Genético
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar

NRPS	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i>
Nt	Nucleótidos
ODC	<i>Gen Codificador de la Enzima Ornitina Decarboxilasa</i>
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de lectura abierta)
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PKS	<i>PolyKetide Synthase</i>
PKS-NRPS	<i>PolyKetide Synthase - Non-Ribosomal Peptide Synthase hybrid</i>
PLP	Porcentaje de <i>Loci</i> Polimórficos
PSC	Concepto filogenético de Especie/ <i>Phylogenetic Species Concept</i>
p/v	Peso Volumen
RAPD	Fragmentos de ADN Amplificados al Azar
RPB2	Subunidad II de la ARN polimerasa dependiente de ADN/DNA- <i>dependant RNA polymerase subunit II</i>
QTL	<i>Quatitative Trait Loci</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
REV / Rev	<i>Reverse</i>
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>
s	Segundo
SAR	Resistencia Adquirida Sistémica
SC	<i>Similarity Coefficient</i>
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> (Región amplificada de una secuencia caracterizada)
sdhA/B/C/D	Genes que Codifican las Cuatro Subunidades del Succinato Dehidrogenasa

SDS	Dodecil-sulfato sódico
SH-Agar	
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
T	Timina
TAE	Tris acético EDTA
TE	Tris-EDTA
TCV	<i>Torrent Variant Caller</i>
TF	
TFB	<i>Transformation Buffer</i> (Tampón de transformación)
Tm	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracilo
V	Voltio
V	Volumen
VC	Vinos de Calidad
VCG	<i>Vegetative Compatibility Group</i> (Grupo de compatibilidad vegetativa)
v/v	Volumen Volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
UPGM	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USD	<i>United States Dollars</i>
UV	Ultravioleta

Resumen

Resumen

La podredumbre gris es descrita en los viñedos de Castilla y León año tras año. Dependiendo en las condiciones climáticas, ésta puede causar pérdidas sustanciales en el rendimiento del cultivo y alteraciones importantes en la calidad de los vinos producidos. Sin embargo, las poblaciones naturales del patógeno no han sido caracterizadas en profundidad. En España, la actividad económica en relación con el cultivo de la vid y la producción de vino se organiza alrededor de la “Denominación de Origen” (DO) como figura administrativa. Los agricultores y productores de vino siguen pautas estrictas en relación con las variedades de vid que se pueden cultivar en cada caso, el manejo de los cultivos y los procedimientos de producción de vino, para obtener y mantener la certificación de DO. En nuestro trabajo hemos evaluado la incidencia de la podredumbre gris en seis áreas productoras de vino en Castilla y León, cinco DOs y una zona de Vinos de la Tierra, durante dos campañas distintas (2002, 2007). En el curso de estas evaluaciones se colectaron racimos sintomáticos y racimos que no presentaban síntomas de podredumbre noble a partir de los cuales se aislaron y purificaron aislados que respondían a las características propias de las especies del género *Botrytis*. En total fueron purificados 620 aislados de los cuales 283 fueron seleccionados para su análisis fisiológico y genético. Esta caracterización constituye la base fundamental del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

Haciendo uso de una combinación de métodos basados en análisis de ADN se ha demostrado que los aislados de *B. cinerea* predominan en las poblaciones recogidas. No obstante, fue posible identificar aislados pertenecientes a la especie *B. pseudocinerea* y a la especie *B. prunorum*, siendo esta la primera vez que se describe la presencia de aislados de estas especies en España. Asimismo, fueron caracterizados dos aislados que forman parte de una de una entidad genética relacionada con *B. californica*. En una primera aproximación ha sido posible determinar que la mayor parte de los aislados de *B. cinerea* analizados son aislados del grupo N, aunque con baja frecuencia se han identificado aislados de genotipo Grupo S, siendo esta la primera ocasión en la que se cita la presencia de este genotipo en España.

Dada la agresividad sobre vid de los aislados de *B. prunorum* y los aislados relacionados con *B. californica*, muy reducida, y la baja frecuencia con la que *B. pseudocinerea* parece estar

presente, el impacto que estas especies puedan tener en el desarrollo de la podredumbre gris en los viñedos de Castilla y León debe ser muy limitado.

Los aislados de *B. cinerea* muestran una diversidad fisiológica muy importante. En el contexto de este trabajo es interesante destacar que los aislados de *B. cinerea* muestran grandes diferencias en su habilidad para infectar hojas de *V. vinifera*, y que la distribución de los valores agresividad en la población es una distribución de tipo normal sugestiva de la naturaleza cuantitativa de este carácter. Y es interesante destacar también que se han identificado varios aislados que representan variantes naturales incapaces de infectar la planta huésped, la mayoría de ellos del morfotipo micelial.

El análisis de genética de poblaciones ha demostrado que la diversidad genotípica dentro de las poblaciones naturales de *B. cinerea* sobre los viñedos de Castilla y León es muy alta y que las infecciones múltiples de un mismo racimo con individuos genéticamente diferentes son muy frecuentes. El nivel elevado de diversidad genotípica observado, junto con la distribución equilibrada de ambos tipos sexuales y la detección de desequilibrio de ligamiento permiten proponer que tanto la reproducción sexual como asexual tienen lugar en el campo. El análisis de los coeficientes de diferenciación y el análisis de la varianza molecular indican que el factor DO donde se realizó el aislamiento impone un pequeño efecto de diferenciación entre poblaciones, un efecto que no puede explicarse sólo como consecuencia de las distancias geográficas entre las DO, y por lo tanto de las poblaciones de aislados, sino más bien derivado de las prácticas de manejo del cultivo que imponen las DOs que probablemente limitan la libre dispersión del patógeno.

Nuestro estudio ha proporcionado variantes naturales de *B. cinerea* que consideramos que pueden resultar muy útiles en el análisis y disección de la capacidad de infectar de este patógeno. Disponiendo de aislados muy agresivos y de aislados incapaces de infectar que presentan tipos sexuales compatibles, ha sido posible proponer un análisis genético de la patogenicidad basado en la realización de cruzamientos. El cruzamiento entre el aislado B448, un aislado agresivo, que esporula profusamente y que produce esclerocios, con el aislado B371, un aislado no agresivo, que no esporula y que no produce esclerocios ha generado una descendencia integrada por 183 individuos cuyo análisis ha proporcionado información muy interesante. En primer lugar, ha sido posible comprobar que cada una de estas tres características está controlada por un único gen, pues en los tres casos la segregación en la descendencia de las dos alternativas fenotípicas

correspondientes es una segregación 1:1. En segundo lugar, que se trata del mismo gen para los tres caracteres, dada la estricta cosegregación de las alternativas fenotípicas “capacidad de infectar”-“capacidad de esporular”- “capacidad de producir esclerocios” e “incapacidad de infectar”-“incapacidad de esporular”- “incapacidad de producir esclerocios” . Y en tercer lugar, que éste es probablemente un gen con efecto mayor sobre patogenicidad (y sobre capacidad de esporular y de producir esclerocios) que permite la expresión de varios factores de patogenicidad que segregan en la descendencia, ya que la descendencia agresiva del cruzamiento, que constituye el 50% de los individuos, lo es en medida variable. Esta observación es compatible con la naturaleza compleja, multigénica, de tipo cuantitativo, del carácter agresividad en *B. cinerea* y permite proponer que los aislados B448 y B371 son polimórficos al menos en varios de los QTLs implicados en la determinación del mismo.

Nuestro grupo de investigación se ha propuesto, en una primera fase, abordar el aislamiento y caracterización del gen con efecto mayor sobre patogenicidad, y en una segunda, plantear la identificación de algunos de los QTLs responsables de la segregación observada para el carácter agresividad en la descendencia agresiva de este cruzamiento. La primera parte de esta propuesta ha sido abordada como parte de este trabajo de tesis doctoral. Para la identificación del gen con efecto mayor, se ha diseñado una estrategia experimental basada en la clonación posicional y en el análisis de segregantes agrupados. Su implementación ha puesto la determinación a escala genómica de los polimorfismos de tipo SNP e INDEL entre los aislados B448 y B371 y el estudio de su segregación en dos grupos de descendientes, uno integrado por individuos agresivos, como el aislado B448, y otro por individuos no agresivos, como el aislado B371.

La determinación de polimorfismos se ha llevado a cabo mediante secuenciación masiva de ambos genomas parentales con la tecnología Illumina y Pac Bio. La combinación de la información proporcionada sobre los dos genomas con ambas metodologías permite disponer de dos buenos ensamblajes y de listados de polimorfismos extensos y fiables. Se han secuenciado posteriormente las dos mezclas de ADN de los dos grupos de descendientes establecidos en función de los fenotipos de los parentales. El análisis de las frecuencias alélicas de las variantes características de un parental y otro en ambas mezclas de ADN ha permitido identificar una región en el cromosoma 4 entre las coordenadas 1.240.000 y 1.320.000 para la que se detectan valores máximos de frecuencia de los alelos característicos del parental B448 en la mezcla de ADN de los

descendientes agresivos y valores máximos de los alelos característicos del parental B371 en la mezcla de ADN de los descendientes no agresivos. Esta es la distribución esperada para marcadores asociados a un gen responsable de esta diferencia fenotípica en este cruzamiento.

La región identificada es una región amplia que incluye entre 40 y 50 genes. Para delimitar la posición del gen de interés, esta región del genoma del aislado B448 ha sido subclonada en fragmentos de 5 kb y los clones resultantes introducidos por transformación en el fondo genético del aislado B371. Sólo el inserto clonado en el plásmido pWAM15 ha determinado que los transformantes derivados muestran capacidad de esporulación, de producción de esclerocios y de infectar. Esta observación proporciona evidencias funcionales de que el polimorfismo responsable de la diferencia fenotípica entre ambos aislados se encuentra en esta región.

El análisis de la anotación del genoma de *B. cinerea* y el estudio de los polimorfismos entre los genomas de los aislados B448 y B371 identificados en nuestro análisis permite identificar un único gen en la región seleccionada, el gen Bcin04g03490, y un único polimorfismo característico del aislado B371, como responsable del fenotipo observado. Este gen no ha sido caracterizado en *B. cinerea*. Se identifican ortólogos del mismo en los genomas de hongos, pero en ningún caso se aporta información funcional. El gen de *B. cinerea* codifica una proteína en la que es posible identificar dos dominios funcionales conservados: un dominio LbM_MAT_GAT en el extremo carboxilo de la proteína y un dominio GAL4 de unión a ADN en la zona central. Es interesante destacar que la proteína Bcin04g03490 presenta únicamente el dominio de unión a ADN de Gal4. No se identifica un dominio activador tipo. La mutación específica del aislado B371 en la posición 1.251.759 supone un cambio de aminoácido, concretamente el cambio Glicina722Arginina, que afecta a un aminoácido localizado en la región correspondiente al dominio LbM_MAT_GAT.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible concluir que la proteína Bin04g03490P es esencial en la coordinación de los procesos relacionados con la capacidad de infectar del patógeno y también con la capacidad de esporular y de producir esclerocios. El alelo del gen Bcin04g03490 del aislado B371 es un alelo de pérdida de función derivado de una mutación puntual que determina la sustitución del aminoácido glicina por el aminoácido arginina en la posición 722 de la proteína Bcin04g03490P2. Este aminoácido forma parte del dominio conservado funcional LbM_MAT_GAT localizado en el extremo carboxilo de la proteína y resulta ser esencial para su actividad.