

Universidad de Cádiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Microbiología, Medicina Preventiva y
Salud Pública, Fisiología y Genética

Laboratorio de Microbiología

**Estudio de la Variabilidad Genética y
Organización Cromosómica en el Hongo
Fitopatógeno *Botrytis cinerea***

TESIS DOCTORAL

María Carbú Espinosa de los Monteros

Puerto Real (Cádiz), 2006

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA.**

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales
Laboratorio de Microbiología
CASEM

**Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el
Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea***

Memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz, presentada por:
María Carbú Espinosa de los Monteros



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA.**

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales
Laboratorio de Microbiología
CASEM

Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el
Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz, presentada por:
María Carbú Espinosa de los Monteros

Directores

Dr. D. Jesús Manuel Cantoral Fernández

Dra. D^a. Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera

Doctorando

María Carbú Espinosa de los Monteros

Don Jesús Manuel Cantoral Fernández, Catedrático de Microbiología
y **Dña. Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera**, Profesora Titular de
Microbiología de la Universidad de Cádiz,

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea***”, presentada por Dña. María Carbú Espinosa de los Monteros, para optar al grado de Doctora, ha sido realizada bajo su dirección y autorizan su presentación y defensa.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Puerto Real a 19 de Octubre de 2006

Dr. D. Jesús Manuel Cantoral Fernández

Dra. D^a. Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera

A mis padres, Juan y Paquita

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. Descripción y Distribución del Género <i>Botrytis</i>	3
2. Características Morfológicas Generales de <i>Botrytis cinerea</i>	4
2.1.- Micelio	4
2.2.- Conidióforos o Macroconidióforos	5
2.3.- Conidios o Macroconidios	6
2.4.- Microconidióforos y Microconidios	9
2.5.- Clamidosporas	10
2.6.- Esclerocios	11
2.7.- Apotecios	13
3. Ciclo Biológico de <i>B. cinerea</i>	14
4. Taxonomía de <i>Botrytis</i> y <i>Botryotinia</i>	17
5. Proceso de Infección	21
5.1.- Adhesión de los Conidios	22
5.2.- Germinación	23
5.3.- Penetración	24
5.3.1.- Penetración mediada por el apresorio	24
5.3.2.- Penetración mediada por el tubo germinativo	25
5.3.3.- Función de la cutinasa en la penetración	26
5.3.4.- Función de las pectinasas en la penetración	26
5.3.5.- Función de las lipasas en la penetración	27
5.4.- Muerte del Tejido Vegetal	28
5.4.1.- Las toxinas	28
5.4.2.- El ácido oxálico	29
5.4.3.- Inducción de especies activas de oxígeno (AOS)	29
5.5.- Fase de Latencia	30
5.6.- Colonización. Maceración	31
5.7.- Esporulación y Dispersión	31
5.7.1.- Dispersión de los conidios por el viento y la lluvia	31
5.7.2.- Dispersión de los conidios por los insectos	32
6. Control	33
6.1.- Control Químico	33
6.2.- Prácticas de Cultivo	33
6.3.- Creación de Plantas Transgénicas Resistentes	34
6.4.- Control Biológico	34
6.5.- Diseño Biosintético de Fungicidas	35
6.6.- Factores de Patogenicidad	36
6.7.- Control Integrado	38
7. Variabilidad Genética en <i>B. cinerea</i>	38
7.1.- Variabilidad Asexual	39
7.1.1.- Nivel de ploidía	40
7.2.- Reproducción Sexual	41
7.3.- Elementos Genéticos Extracromosómicos	42
7.3.1.- Mitocondrias y plásmidos mitocondriales	42
7.3.2.- Elementos transponibles	43
7.3.3.- Micovirus	45

8. Técnica de Electroforesis en Campo Pulsante	46
8.1.- Cariotipo Electroforético	49
8.2.- Polimorfismo Cromosómico	50
8.3.- Minicromosomas o Cromosomas B	52
8.4.- Mapeo de Genes	54
9. Los Telómeros	55
II. Objetivos del Trabajo	59
III. Material y Métodos	63
1. Microorganismos Empleados	65
1.1.- Cepas Fúngicas	65
1.2.- Cepa Bacteriana	67
2. Medios de Cultivo	67
3. Crecimiento de los Microorganismos	69
3.1.- Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i>	69
3.2.- Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	70
4. Mantenimiento y Conservación	70
4.1.- <i>Botrytis cinerea</i>	70
4.2.- <i>Escherichia coli</i>	71
5. Procedimiento Seguido para la Realización de Cruzamientos entre Cepas de <i>B. cinerea</i>	71
5.1.- Producción de Esclerocios y Microconidios	71
5.2.- Espermatización	72
5.3.- Germinación Carpogenética	72
6. Protocolo para la Obtención de las Ascosporas	73
7. Seguimiento de las Poblaciones de Hongos Filamentosos en la Vid	74
7.1.- Toma de Muestra	74
7.2.- Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos	75
7.3.- Inoculación de la Vid con <i>B. cinerea</i>	76
8. Bioensayos de Patogenicidad	76
8.1.- Preparación del Material Vegetal	76
8.2.- Preparación de la Suspensión de Conidios	77
8.3.- Lectura del Bioensayo	77
8.4.- Tratamiento Estadístico de los Datos	77
9. Aislamiento del ADN	78
9.1.- Aislamiento del ADN Plasmídico de <i>E. coli</i>	78
9.2.- Extracción de ADN Fúngico	79
9.2.1.- Eliminación del ARN	81
10. Digestión con Enzimas de Restricción	82
11. Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa	83
11.1.- Condiciones y Marcadores de Tamaño	83
11.2.- Extracción de ADN de Geles de Agarosa	84
12. Cariotipo Electroforético	85
12.1.- Obtención de Protoplastos	85
12.2.- Preparación de los Bloques de Agarosa	86
12.3.- Preparación del Gel de Electroforesis	87
12.4.- Electroforesis	87
12.5.- Visualización del ADN Cromosómico	88
13. Transferencia del ADN de los Geles de Agarosa a Filtros	89

14. Hibridación de los Ácidos Nucleicos	90
14.1.- Descripción y Obtención de las Sondas	90
14.1.1.- Sonda ribosómica ADNr 18S-5.8S-28S	90
14.1.2.- Sonda telomérica (TTAGGG) _n	91
14.2.- Marcaje de las Sondas	91
14.2.1.- Sonda ADNr 18S-5.8S-28S	92
14.2.2.- Sonda telomérica (TTAGGG) _n	92
14.3.- Prehibridación	93
14.4.- Hibridación	93
14.5.- Lavados Post-Hibridación	93
14.6.- Detección	94
14.7.- Tratamiento de los Datos	95
14.8.- Reutilización de los Filtros	95
IV. Resultados	97
1. Estudio de la Competitividad de <i>B. cinerea</i> en Viñedos de Jerez	99
1.1.- Estudio de la Micobiota Presente en la Viña antes de la Inoculación (to)	99
1.2.- Estudio de la Micobiota a Tiempo Final (tf)	101
2. Cruzamiento entre Cepas de <i>B. cinerea</i>	104
3. Bioensayos de Patogenicidad	106
4. Cariotipo Electroforético de <i>B. cinerea</i>	113
4.1.- Segregación de las Bandas Cromosómicas	121
4.2.- Caracterización Molecular de las Cepas de <i>B. cinerea</i> T4 y Bd90	126
5. Hibridación del Cariotipo Electroforético de <i>B. cinerea</i>	127
5.1.- Hibridación con una Sonda de ADN Ribosómico	129
5.2.- Hibridación con una Sonda de ADN Telomérico	132
6. Hibridación de los RFLP con una Secuencia de ADN Telomérico	138
6.1.- Estimación del Número de Cromosomas	144
6.2.- Estudio de la Variabilidad en <i>B. cinerea</i>	146
V. Discusión	149
1. Estudio de la Competitividad de <i>B. cinerea</i> en el Marco de Jerez	151
2. Bioensayos de Patogenicidad	154
3. Cariotipo Electroforético de <i>B. cinerea</i>	155
3.1.- Estudio del Polimorfismo Cromosómico en <i>B. cinerea</i>	158
3.2.- Efecto de la Meiosis en la Variabilidad Cariotípica	161
3.3.- Relación entre la Patogenicidad y los Patrones Cromosómicos	163
4. Localización Cromosómica del ADN ribosómico	164
5. Hibridación de los Geles de Electroforesis en Campo Pulsante con una Sonda de ADN Telomérico	166
6. Hibridación de los RFLP con una Sonda de ADN Telomérico	169
7. Variabilidad Genética en <i>B. cinerea</i>	173
VI. Conclusiones	175
VII. Bibliografía	179

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Micelio de *B. cinerea* al microscopio óptico (40X).
- Figura 2.** Estructura del macroconidióforo de *B. cinerea* al, A: microscopio óptico (4x), B: microscopio electrónico.
- Figura 3.** Podredumbre gris sobre tejido vegetal.
- Figura 4.** Conidios de *B. cinerea* al microscopio óptico (40X)
- Figura 5.** Estructuras al microscopio óptico (40x) de los microconidióforos con sus microconidios (A) teñidos con azul de bromofenol y (B) los conidios de *B. cinerea*.
- Figura 6.** Esclerocios producidos sobre placas de cultivo envejecido (A) y vista al microscopio óptico (10X) de la superficie del mismo (B).
- Figura 7.** Apotecios de *Botryotinia fuckeliana* (A). (B) Fotografía al microscopio óptico de la sección del tecio y las ascosporas teñidas con azul de bromofenol.
- Figura 8.** Ciclo biológico de *Botrytis cinerea*. F. fecundación.
- Figura 9.** Posición taxonómica de *Botryotinia fuckeliana*.
- Figura 10.** Ciclo de infección de *B. cinerea* sobre el tejido del huésped.
- Figura 11.** Esquema de la distribución de los liños de vid en las dos parcelas de trabajo.
- Figura 12.** Sistema FastPrep® para la extracción de ADN
- Figura 13.** Evolución del número de colonias de cada género de hongos a los 15 dpi. Lc(tf): liño control 15 dpi. Li(tf): liño inoculado 15 dpi.
- Figura 14.** Apotecios de *B. cinerea*
- Figura 15.** Bioensayos de patogenicidad en *B. cinerea*. A: 48 hpi; B: 7 dpi; 1: Cepa UCA992; 2: Cepa SAS56.
- Figura 16.** Número de descendientes que presenta cada valor del diámetro de la lesión. ♀: indica el diámetro de lesión producido por el parental SAS56; ♂: indica el diámetro de lesión producido por el parental UCA992; X: valor medio del diámetro de la lesión de los 73 individuos; n: número de descendientes analizados.
- Figura 17.** Dendrograma de las cepas de *B. cinerea* a partir de los datos de diámetro de las lesiones, utilizando la distancia euclídea al cuadrado y el método de vinculación inter-grupo. Las flechas indican la situación de los parentales. N° romanos: n° de conglomerados.
- Figura 18.** Cariotipo electroforético de las 24 cepas de *B. cinerea* obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la izquierda y derecha corresponden con los pesos moleculares de los marcadores en Mbp.
- Figura 19.** Esquema de los 9 patrones cromosómicos (en números romanos) obtenidos mediante PFGE de 24 cepas de *B. cinerea*.
- Figura 20.** Cariotipo electroforético del cruzamiento SAS56 × UCA992 obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la derecha se corresponden con los pesos moleculares de los marcadores e Mbp.
- Figura 21.** Cariotipo electroforético del cruzamiento SAS405 × UCA993 obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la derecha se corresponden con los pesos moleculares de los marcadores e Mbp.
- Figura 22.** Esquema de los diferentes patrones cromosómicos (números romanos) obtenidos tras la electroforesis en campo pulsante de los descendientes de los cruzamientos SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993.

- Figura 23.** Caracterización molecular de las cepas Bd90 y T4. A. Cariotipo electroforético obtenido mediante PFGE. Pesos moleculares de los marcadores indicados a los lados (Mbp), ADNmt: ADN mitocondrial; B: Esquema de los patrones cromosómicos (en números romanos).
- Figura 24.** Esquema de los diferentes patrones cromosómicos (en números romanos) obtenidos tras la electroforesis en campo pulsante de 74 cepas de *B. cinerea*.
- Figura 25.** Hibridación del cariotipo electroforético de 8 cepas de *B. cinerea*, aisladas de campo, con una sonda de ADN ribosómico. A la izquierda se indican las bandas cromosómicas donde hibrida la sonda.
- Figura 26.** Polimorfismo cromosómico de *B. cinerea* detectado por PFGE (1^a y 2^a) e hibridación con ADN ribosómico (1B y 2B. 1: corresponde al PFGE e hibridación en los parentales SAS56 y UCA992 así como 2 descendientes de su cruzamiento. 2: corresponde al PFGE e hibridación en los parentales SAS405 y UCA993 así como 2 descendientes de su cruzamiento).
- Figura 27.** Cariotipos electroforéticos de 13 cepas de *B. cinerea* determinados mediante PFGE (A) e hibridación con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. Al los lados, los tamaños moleculares de los marcadores en Mbp de *Schizo. pombe* (izquierda) y *H. wingeii* (derecha).
- Figura 28.** Esquema del cariotipo electroforético de 16 cepas de *B. cinerea* hibridado con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. Bandas verdes: minicromosomas; bandas grises: banda de mayor movilidad electroforética; banda amarilla: nueva banda identificada en la cepa UCA992-16 (P XXIV). ADNmt + (TTAGGG)_n: indica la banda donde comigran el ADN mitocondrial junto a algún minicromosoma o fragmento de cromosoma.
- Figura 29.** Organización cromosómica de *B. cinerea* determinada mediante la hibridación del PFGE con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n y el ADN ribosómico. Banda rojo: localización del ADN ribosómico; banda gris y ADNmt + (TTAGGG)_n: banda donde comigran el ADN mitocondrial junto a algún minicromosoma o fragmento de cromosoma.
- Figura 30.** (A) Hibridación con la secuencia (TTAGGG)_n del ADN de 14 cepas de *B. cinerea* digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII*. A los lados, los tamaños moleculares (bp) de los marcadores λ -*HindIII* (izquierda) y marcador XIV (derecha). (B) Asignación de bandas mediante la utilización del programa Fingerprinting II (BioRad). 1: UCA993; 2: UCA994; 3: UCA996; 4: UCA992; 5: UCA992-16; 6: UCA992-21; 7: UCA992-26; 8: UCA992-75; 9: UCA992-93; 10: SAS56; 11: 2100; 12: 2850; 13: Bd90; 14: T4.
- Figura 31.** (A) Hibridación con la secuencia (TTAGGG)_n del ADN de 14 cepas de *B. cinerea* digerido con la enzima *BamHI* y *PstI*. A los lados, los tamaños moleculares (bp) de los marcadores λ -*HindIII* (izquierda) y marcador XIV (derecha). (B) Asignación de bandas mediante la utilización del programa Fingerprinting II (BioRad). 1: UCA993; 2: UCA994; 3: UCA996; 4: UCA992; 5: UCA992-16; 6: UCA992-21; 7: UCA992-26; 8: UCA992-75; 9: UCA992-93; 10: SAS56; 11: 2100; 12: 2850; 13: Bd90; 14: T4.
- Figura 32.** Dendrograma construido basándose en el polimorfismo de los RFLP de las 14 cepas de *B. cinerea* tras la hibridación con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n.
- Figura 33.** Dendrograma basado en el *telomeric fingerprinting* y la hibridación de los geles de electroforesis en campo pulsante con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Especies de *Botrytis* y su estado teleomorfo, *Botryotinia*.
- Tabla 2.** Cariotipo electroforético de diversos hongos. NC: N° de Cromosomas.
- Tabla 3.** Secuencias del ADN telomérico.
- Tabla 4.** Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles.
- Tabla 5.** Número de colonias fúngicas aisladas/ Kg de uva muestreada a tiempo inicial (to). (%): porcentaje que representa cada género sobre el total.
- Tabla 6.** Valores medios de los parámetros climáticos durante los dos años de estudio.
- Tabla 7.** Número total de colonias fúngicas aisladas/ Kg de una muestreada. Lc (to): liño control a tiempo inicial; Lc(tf): liño control 15 dpi; Li(tf): liño inoculado a 15 dpi.
- Tabla 8.** Número de colonias de *B. cinerea*/ Kg de una muestreada. Lc (to): liño control en el primer muestreo; Lc(tf): liño control 15 dpi; Li(tf): liño inoculado a 15 dpi. n.d.: no detectado.
- Tabla 9.** Alelos de compatibilidad sexual de las 10 cepas de *B. cinerea*.
- Tabla 10.** Resultados de los cruzamientos entre cepas de *B. cinerea*. +: cruzamiento fructífero; -: no ha habido fecundación; ♀: cepa que actúa como gameto femenino; ♂: cepa que actúa como gameto masculino.
- Tabla 11.** Datos del diámetro de la lesión a los 7 dpi (mm). N: n° de datos.
- Tabla 12.** ANOVA para los conglomerados. gl: grados de libertad; F: estadístico F; Sig: nivel de significación.
- Tabla 13.** Patrones cromosómicos definidos en las 24 cepas de *B. cinerea*.
- Tabla 14.** Patrones cromosómicos que presentan las cepas monoascospóricas de dos cruzamientos entre cepas de *B. cinerea*. A: patrón de los parentales UCA992 y UCA993; b: patrón del parental SAS56; c: SAS405 presentó el patrón IX.
- Tabla 15.** Segregación de las bandas cromosómicas observadas en los dos cruzamientos aislados. +: indica presencia de la banda; -: indica ausencia de banda; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$.
- Tabla 16.** Número de telómeros obtenidos mediante hibridación de los RFLP con la sonda (TTAGGG)_n. *: estimación por defecto.
- Tabla 17.** Número mínimo de cromosomas obtenido mediante *telomeric fingerprinting* e hibridación del cariotipo electroforético con una secuencia de ADN telomérico. *: estimación por defecto.
- Tabla 18.** Matriz de similitud elaborada a partir de los valores de *telomeric fingerprinting*.
- Tabla 19.** Número de descendientes que presentan un patrón cromosómico y grupo de patogenicidad. ^a: indica los patrones del parental SAS56; ^b: indica los patrones del parental UCA992.

Introducción

1.- Descripción y Distribución del Género

Botrytis

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente conocido, en el que podemos encontrar especies que parasitan a una sola especie vegetal, como *B. tulipae*, *B. squamosa* o *B. fabae*, patógenos de tulipán, cebolla y haba respectivamente, y una especie, denominada *B. cinerea*, capaz de infectar al menos 235 especies de plantas distintas (Elad, 1997), causando la enfermedad conocida como “*Podredumbre Gris*” o “*Botrytis*”. Entre los hospedadores de *B. cinerea* se incluyen una enorme variedad de plantas ornamentales (rosas, geranios, tulipanes, claveles, etc.), plantas frutales (vid, fresa, kiwi, etc.) y verduras y hortalizas (tomate, lechuga, pimiento, alcachofa, calabaza, etc.). En cada uno de los cultivos y bajo condiciones de humedad relativa alta, la podredumbre gris puede afectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas. Además, el ataque no sólo se produce sobre cultivos en el campo o en invernaderos, donde el hongo destruye rápidamente los tejidos y coloniza la planta, sino que también provoca enfermedades post-cosecha, comenzando con una infección latente en el cultivo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Coley-Smith *et al.*, 1980).

Este hongo supone un peligro potencial, ya que es capaz de desarrollarse en regiones de clima templado como es el caso de España, en áreas secas y desérticas de Israel (Yunis & Elad, 1989) y en zonas frías como Alaska (Anderson, 1924), causando cuantiosas pérdidas en la agricultura. En Andalucía son los cultivos de la fresa, el tomate y la vid los más perjudicados por *B. cinerea*, ocasionando daños tanto cualitativos como cuantitativos en las cosechas. Se estima que el 20 % de las cosechas a nivel mundial, están afectadas por *B. cinerea*, lo que se traduce en un coste de 10 a 100 billones de euros al año (Genoscope, 2005).

En el cultivo de la vid y bajo condiciones de brumas matinales y temperaturas diurnas secas, *B. cinerea* ocasiona la denominada “*Podredumbre Noble*”, la cual aporta a los vinos sabores y aromas característicos, que los hacen de un especial interés enológico. Entre los vinos más conocidos, procedentes de la podredumbre noble, están

el Sauternes-Barsac y Sainte Croix du Mont de Francia, el Trockenbeerenauslee de Alemania y Austria y el Tokaj de Hungría.

El gran número de hospedadores, la gran distribución y la importancia de los daños que ocasiona *B. cinerea*, justifican el enorme interés que despierta este patógeno, siendo, desde hace más de 175 años, objeto de numerosos estudios relacionados con su fisiología, bioquímica, patogenicidad y control de la enfermedad.

2.- Características Morfológicas Generales de *Botrytis cinerea*

El presente trabajo se centra en la especie *Botrytis cinerea*, siendo ésta de especial importancia en la región en la que nos encontramos, por los efectos perjudiciales que causa en los cultivos de vid y fresa. A continuación, se abordará el estudio de la morfología y función de todas las estructuras implicadas en el ciclo de vida de *B. cinerea*.

2. 1.- Micelio

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos (Fig. 1), que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos. Características morfológicas como son la coloración y el diámetro de las hifas, son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio (Moshin, 1990).

El micelio cumple una doble función: i) como estructura de propagación de la enfermedad, causada ésta por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio y, ii) como estructura de resistencia. Se sabe que el micelio de *B. cinerea* puede encontrarse en las flores de la vid (Gessler & Jermini, 1985), en bulbos, semillas,

etc., donde puede sobrevivir durante periodos de tiempo considerables (Coley-Smith *et al.*, 1980).

A partir del micelio, generalmente envejecido, se originan diversas estructuras, como son los macroconidióforos, los microconidióforos y los esclerocios, cuya finalidad es la propagación y supervivencia ante condiciones adversas.

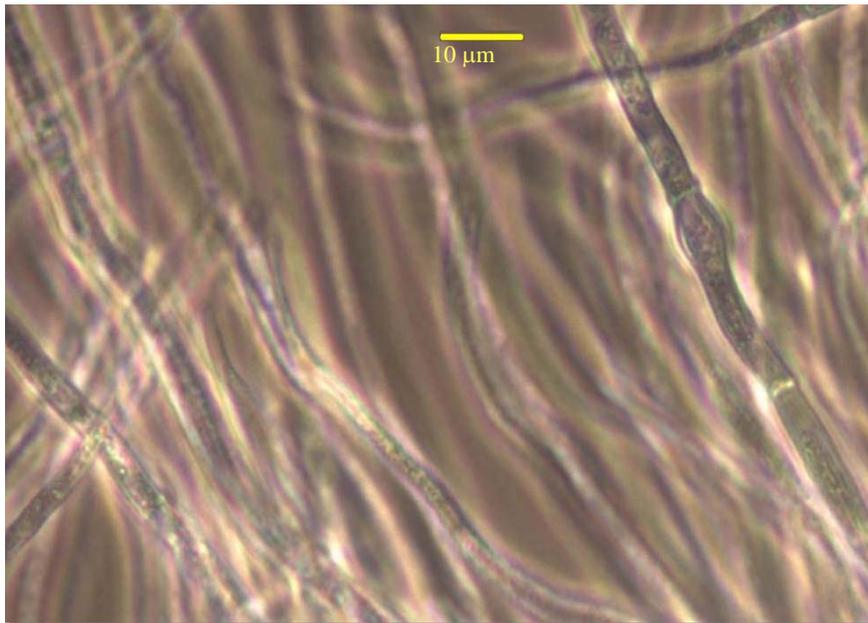


Figura 1. Micelio de *B. cinerea* al microscopio óptico (40x)

2. 2.- Conidióforos o Macroconidióforos

Los conidióforos o macroconidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios.

Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias (Fig. 2A). Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios o macroconidios (Fig. 2B), los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de éste se queda una herida en la región de

unión. Los conidios se forman a partir de la gemación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas.

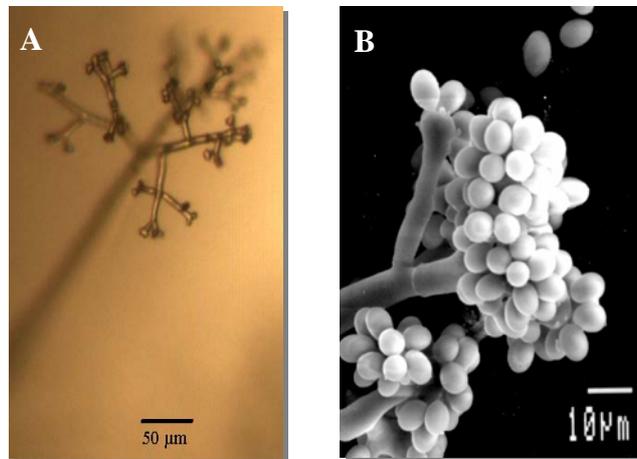


Figura 2. Estructura del macroconidióforo de *B. cinerea* al:
A: Microscopio óptico (4x),
B: Microscopio electrónico

Para que la esporulación o formación de los conidios pueda tener lugar son necesarias unas determinadas condiciones de luz y humedad. La proliferación de un gran número de estos conidióforos sobre la superficie vegetal, da lugar a una coloración blanquecina, parda o grisácea (Fig. 3), a la que hay que atribuir la denominación común de la enfermedad producida por el hongo, “*Podredumbre Gris*”.

2. 3.- *Conidios o Macroconidios*

Los conidios o macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *B. cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo (Elad *et al.*, 2004b). En condiciones naturales, la viabilidad de los conidios depende de las condiciones ambientales (temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz solar), habiéndose demostrado que el espectro de luz ultravioleta es el factor ambiental más importante en la mortalidad de los mismos.



Figura 3. Podredumbre gris sobre tejido vegetal

Son estructuras ovaladas, globosas o elípticas (Fig. 4), separadas del pedicelo por un septo transversal y sus dimensiones oscilan entre 6-8.4 μm de sección transversal y los 8.8-11 μm de longitudinal.



Figura 4. Conidios de *B. cinerea* al microscopio óptico (40X)

El estudio al microscopio, tanto óptico como electrónico, realizados por distintos autores ha permitido conocer la estructura interna de los conidios (Coley-Smith *et al.*, 1980), destacando:

- a) Una **superficie externa** que presenta, al microscopio óptico, un aspecto liso e irregular, gruesa y con un pequeño cuello cuando se observa al microscopio electrónico. Esta envoltura está compuesta por grupos aminos, carboxilos y lipídicos.
- b) La siguiente envuelta es la **pared celular**, que consiste en un armazón de microfibrillas de quitina y β -1,3-glucano ordenadas al azar (El Ghaouth *et al.*, 1997). La quitina está unida a glicoproteínas, lo que le da la forma, rigidez y resistencia física a la pared. La capa más externa de la pared celular presenta coloración, lo que puede ser debido a la presencia de melanina, pigmento capaz de proteger a los conidios de la acción enzimática, de la desecación y servirle como defensa frente a las toxinas secretadas por las plantas (Doss *et al.*, 2003).
- c) Y como última envoltura, una **membrana plasmática** con su habitual composición lípido-proteica. Se caracteriza por la presencia de dos superficies, una próxima a la pared celular y la otra hacia el citoplasma, en las cuales aparecen unas proyecciones verrugosas de función desconocida.
- d) En el **citoplasma** se encuentran los distintos orgánulos celulares, mitocondrias, pequeñas vacuolas, numerosos cuerpos de reserva (Buckley *et al.*, 1966), el retículo endoplasmático y numerosos ribosomas. También se aprecian en él, cuerpos lipídicos que se encuentran en el margen celular y otros cuerpos multivesiculares, los cuales pueden estar implicados en la formación de la pared celular o en la secreción de enzimas extracelulares.
- e) Y por último, un número variable y elevado de **núcleos**, oscilando entre los 5 y 11 observados por Vallejo *et al.* (2003), los 3 y 18 encontrados por Hansen y Smith (1932), ó 1 y 10 según Shirane *et al.* (1988). Cada núcleo presenta sólo una región organizadora nucleolar (NOR) (Taga & Murata, 1994).

2. 4.- *Microconidióforos y Microconidios*

Los microconidióforos son estructuras caracterizadas por la formación de una pequeña vesícula de la que surgen uno o más esterigmas a modo de botella de base ancha llamados fiálides, en cuyo extremo se forman los microconidios (Fig. 5). Esta morfología básica puede presentarse sola o agrupada dependiendo de la estructura inicial de partida sobre la que se origina. Pueden desarrollarse de forma exógena y endógena al propio hongo (Urbasch, 1985):

- a) La forma exógena se puede originar partiendo de 5 estructuras distintas: una hifa primaria, una endohifa que emergen de una hifa primaria, de células de los macroconidióforos, de esclerocios germinados y desde el tubo germinativo de un conidio.
- b) La forma endógena se puede formar a partir de sólo 3 estructuras: sobre endohifas que surgen en el interior de una hifa primaria, en el interior de células de los macroconidióforos y sobre ascosporas que se encuentran en el interior de sus ascas.

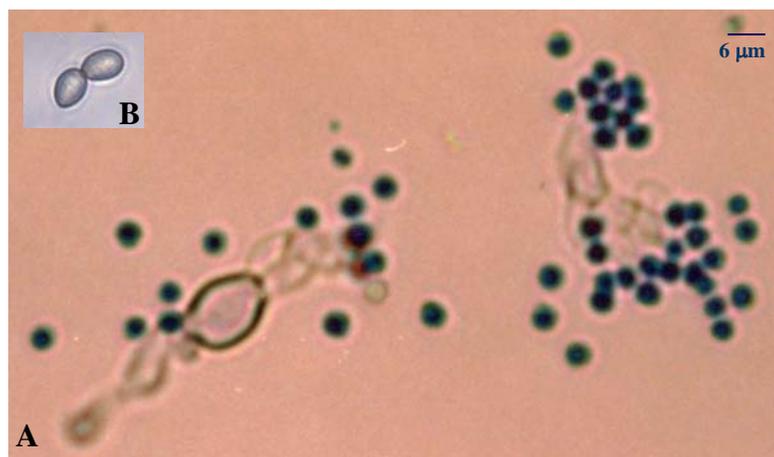


Figura 5. Estructuras al microscopio óptico (40X) de los microconidióforos con sus microconidios (A) teñidos con azul de bromofenol y (B) los conidios de *B. cinerea*

Los microconidios son estructuras unicelulares de morfología esférica (Drayton, 1932), muy similares a la de los conidios, aunque de menor tamaño (Fig. 5), con un diámetro de 2-4 μm .

La función fundamental que se le atribuye a esta estructura es la de gameto masculino en el ciclo de vida sexual del hongo. Aunque también se le atribuye una función alternativa como estructura de resistencia, debido a su capacidad de permanecer viable en estado de dormancia bajo condiciones ambientales adversas (Urbasch, 1985).

2. 5.- *Clamidosporas*

Las clamidosporas son células de aspecto hialino con una alta variabilidad de forma y tamaño (Urbasch, 1983; 1986). Habitualmente aparecen en cultivos envejecidos, en zonas del cultivo que han sido contaminadas por otros microorganismos y en asociación con los esclerocios. Se forman a partir de la transformación de partes del micelio y son liberadas por la disgregación de las hifas.

Han sido observadas en tomate y en hojas de *Fuchsia hybrida* infectadas tanto de forma natural como de forma artificial, aumentando el número de clamidosporas a medida que las lesiones son más viejas (Urbasch, 1983; 1986).

Bajo condiciones húmedas y con escasez de nutrientes, las clamidosporas germinan dando lugar a microconidios, los cuales permanecen en estado de latencia. Si se adicionan nutrientes, son capaces de germinar originando hifas que pueden penetrar en el huésped o pueden esporular y formar conidios. En frutas como la nectarina, la ciruela y la pera, sometidas a periodos secos o a temperaturas de 5 °C durante 48 horas, los conidios de *B. cinerea* forman clamidosporas a partir de tubos germinativos cortos (Holz, 1999). Por lo tanto, las clamidosporas pueden actuar como estructuras de resistencia permitiéndole al hongo superar periodos cortos bajo condiciones desfavorables sobre la planta.

2. 6.- *Esclerocios*

Los esclerocios son las principales estructuras de resistencia de *B. cinerea*. Son órganos pluricelulares, de morfología plano-convexa (Fig. 6A), cuyas dimensiones oscilan entre 1-5 mm de sección transversal y 1-15 mm de sección longitudinal, dependiendo de las condiciones de cultivo. Están compuestos por un 75 % de carbohidratos, 10 % de proteínas, 5 % de glucosamina y 0.21 % de lípidos.

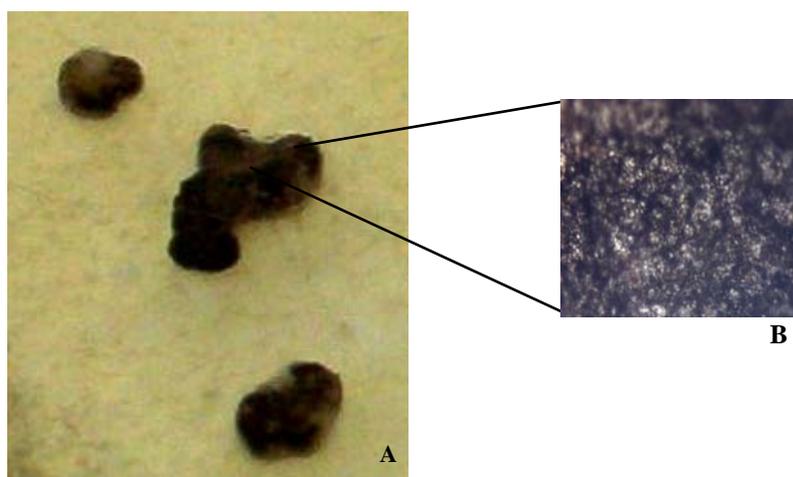


Figura 6. Esclerocios producidos sobre placa de cultivo envejecido (A) y vista al microscopio óptico (10X) de la superficie del mismo (B)

Su estructura se forma por el crecimiento de las hifas, las cuales van entrecruzando sus paredes a medida que se van dividiendo hasta que se fusionan unas con otras dando lugar a un tejido compacto de coloración oscura (Fig. 6B). La formación de los esclerocios está influenciada por múltiples factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el que se desarrolla (López Herrera *et al.*, 1986).

En el esclerocio maduro se distinguen tres capas:

- a) Un **córtex externo** formado por un conjunto de hifas empaquetadas, las cuales presentan gruesas paredes celulares que las hacen especialmente resistentes a la desecación (Fig. 6B). Esta capa presenta una coloración oscura debido a la acumulación de melanina en las paredes de las hifas más

externas. Un estudio histoquímico de las células indican un contenido en quitina, β -1,3-glucanos y compuestos fenólicos.

- b) Un **córtex interno** constituido por un tejido donde la separación entre las hifas es indistinguible y en el que las células adoptan una morfología poliédrica debido a la presión que ejercen unas sobre otras, dando lugar a la desaparición de espacios intracelulares.
- c) Y una **médula** compuesta por un tejido donde las hifas permanecen como filamentos individuales y cuyas células son largas, con paredes hialinas y gelatinosas, rodeadas por una matriz de β -glucanos. En su interior se encuentran proteínas, glicógeno, polifosfatos y lípidos que le sirven como sustancias de reserva.

La función más relevante que desempeñan los esclerocios es la de supervivencia del hongo, siendo su compacta morfología y la alta acumulación de sustancias nutritivas, las que le proporcionan las condiciones idóneas para soportar temperaturas bajas en la estación invernal, para posteriormente, con la llegada de la primavera poder germinar dando lugar a un nuevo micelio (Grindle, 1979). También juegan un importante papel en el ciclo sexual del hongo, porque son ellos los que participan como gameto femenino, y a partir de los cuales se desarrollan los apotecios. Y además, poseen una enorme capacidad para producir conidióforos.

Generalmente, la formación de los esclerocios tiene lugar en los tejidos de las plantas, sin embargo, se ha encontrado que también puede ocurrir en el interior de insectos. Louis *et al.* (1996) han demostrado que la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* puede actuar como vector de *B. cinerea*. Los conidios germinan en el intestino del insecto, desarrollándose un micelio y diferenciándose en microesclerocios, los cuales se mantienen en su interior durante el ciclo de vida del insecto, permitiéndole al hongo conservarse durante el invierno.

2. 7.- *Apotecios*

Los apotecios son cuerpos reproductivos que surgen, individualmente o en grupo, de los esclerocios que han sido fecundados (Fig. 7A). Su morfología consta de un pequeño tallo o **estípite** (de 2 a 20 mm de longitud y 0.5-1.5 mm de grosor) y una región ensanchada a modo de embudo denominada **himenio** o **tecio**.

Los estípites están compuestos por hifas septadas, dispuestas longitudinalmente y paralelas entre sí. En el tecio o región fértil se encuentran las **ascas** dispuestas regularmente y en distintos estadios de desarrollo. Las ascas son hifas fértiles con forma cilíndrica y alargadas que contienen en su interior un total de ocho **ascosporas** (Fig. 7B). Además de las ascas se presentan unas hifas estériles ramificadas en la base del tecio llamadas **paráfisis**.

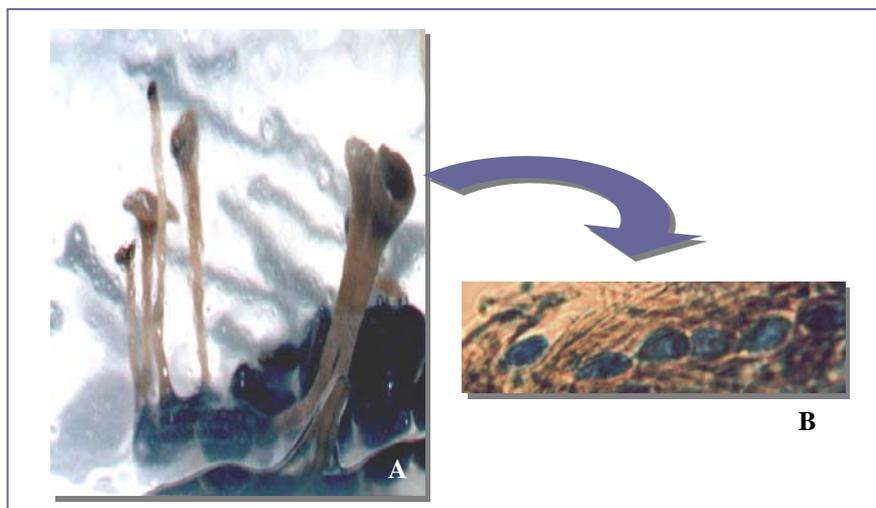


Figura 7. Apotecios de *Botryotinia fuckeliana* (A). (B) Fotografía al microscopio óptico de la sección del tecio y las ascosporas teñidas con azul de bromofenol

Las ascosporas poseen una morfología elipsoidal con unas dimensiones que oscilan entre 9-17.6 μm para la sección longitudinal y de 4-9.3 μm para la transversal y su interior contiene un variable y elevado número de núcleos. En 1987, Faretra & Antonacci hicieron la siguiente descripción, para esclarecer este hecho: “las ascas contienen un solo núcleo diploide con la información genética de los dos parentales, el

cual, tras sufrir una meiosis y posterior mitosis, aumenta hasta ocho núcleos haploides. Cada uno de estos núcleos está rodeado por las envueltas que darán lugar a una ascospora uninucleada. Mientras la ascospora está en el interior del asca, se produce la mitosis lo que dará lugar a que el número final de núcleos de la ascospora sea elevado y variable”.

3.- Ciclo Biológico de *B. cinerea*

B. cinerea es un hongo pleomórfico, con una fase sexual o perfecta y una fase asexual o imperfecta, la cual se detecta con mayor frecuencia en la naturaleza y por tanto, la que se considera más ligada al desarrollo del hongo. Sin embargo, recientes estudios moleculares de la población han proporcionado evidencias de que la reproducción sexual ocurre más frecuentemente de lo que se pensaba hasta ahora (Prins *et al.*, 2000).

El estado asexual o imperfecto del hongo (Fig. 8) se caracteriza por la proliferación de hifas sobre el sustrato que coloniza, hasta dar lugar a la formación de un micelio, desde donde surgen 3 estructuras básicas. Por una parte, los conidióforos o macroconidióforos en cuyos extremos se desarrollan los conidios o macroconidios, los cuales puestos en contacto con el sustrato y en condiciones adecuadas, germinan dando lugar a un nuevo micelio. Además, a partir de las hifas del micelio, se pueden originar los microconidióforos que forman los microconidios, y los esclerocios.

El ciclo sexual del hongo (Fig. 8) implica la fecundación del cuerpo ascógeno (órgano femenino de los Ascomicetos), por parte de los microconidios (que actúan como gametos masculinos o espermacios) de cepas que sean sexualmente compatibles entre sí. A partir de lo cual, puede desarrollarse el **apotecio** o esporofito, característico de los Ascomicetos.

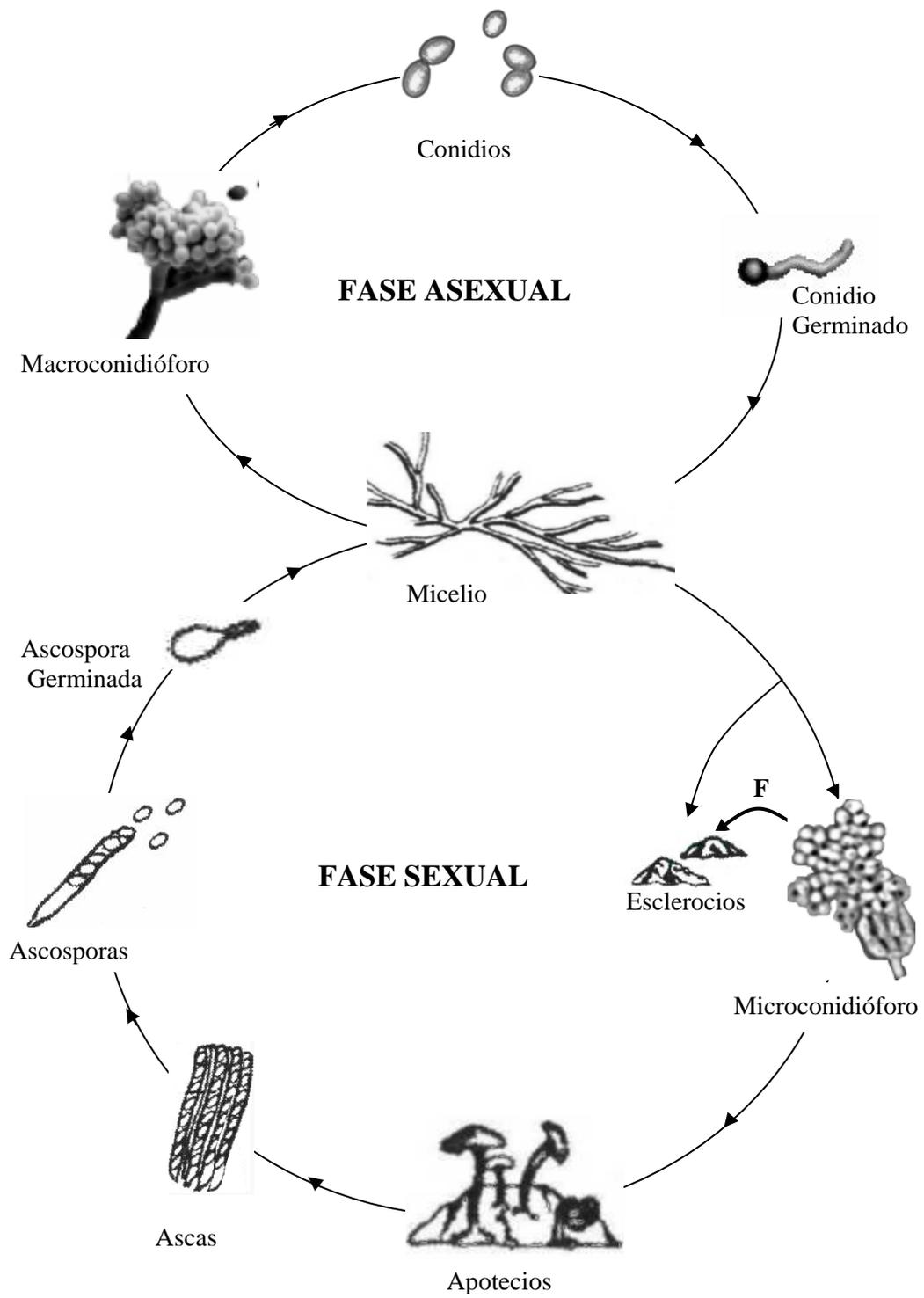


Figura 8. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea*. **F:** fecundación

La compatibilidad sexual de *B. cinerea* fue establecida en 1988 por Faretra *et al.*, quienes analizando la descendencia de cruzamientos, realizados *in vitro*, entre cepas aisladas de diferentes cultivos de Italia, establecieron que el tipo de compatibilidad sexual está controlado por un único gen con dos alelos (Faretra *et al.*, 1988a), los cuales se denominaron *MAT1-1* y *MAT1-2*, siguiendo la nomenclatura propuesta por Yoder *et al.* (1986).

Cuando tiene lugar la fecundación, los núcleos de las cepas que actúan como parentales, de grupo de compatibilidad sexual opuesto, se fusionan dando lugar a un único y heterocigótico núcleo diploide. Este cigoto entra inmediatamente en meiosis para formar las ascas lineales en el apotecio. En *B. cinerea*, al igual que en cualquier otro Ascomiceto, tras la meiosis se forman cuatro células que constituyen una tétrada, las cuales se mantienen juntas y ordenadas en la misma posición en la que emigraron los cromosomas en anafase I y las cromátidas en anafase II (Puertas, 1999). A continuación sufren una división mitótica, dando lugar a ocho **ascosporas** que permanecen encerradas en el **asca**, lo que supone una poderosa herramienta para realizar estudios genéticos. Los núcleos de cada par de ascosporas deben ser genéticamente idénticos, teniendo en cuenta que son el resultado de la división mitótica de uno de los productos de la meiosis.

Todo apotecio en formación, está constituido por un primordio que formará el estípite que sostiene al tecio, en cuyo interior se encuentran las ascas. En *B. cinerea*, los primordios apoteciales se originan una vez que ha tenido lugar la fecundación (Mohsin, 1990). Los primordios están constituidos por un córtex externo compuesto de células apiladas, cuya estructura se opone a la penetración de los gametos masculinos. Además, el ápice de los primordios se hincha para comenzar a formar los discos apoteciales, después de lo cual se origina un poro apical u ostiolo. Este, se encuentra cerrado por una membrana que impide la penetración de los espermacios, que protegerá a las ascas de cambios climáticos externos y que únicamente se desgarrará una vez formados los apotecios, permitiendo la liberación de las ascosporas. Es decir, la fecundación tiene lugar antes de la aparición de los primordios apoteciales.

Si las condiciones del medio son las adecuadas y existen suficientes nutrientes, las ascosporas pueden llegar a germinar y dar lugar a un nuevo micelio. Este micelio por

la propia naturaleza nuclear de la ascospora, debe ser un cultivo muy uniforme y, por tanto, idóneo para estudios genéticos.

4.- Taxonomía de *Botrytis* y *Botryotinia*

Botrytis fue reconocido por primera vez como género en 1729 por Micheli, apareciendo, en 1797, la primera referencia sobre la especie en el *Tentamen dispositionis methodicae fungorum*, donde Persoon describe las características de un hongo filamentoso refiriéndose a él como *Botrytis cinerascens*, no siendo hasta 1832 en el *Sistema Mycologicum*, cuando se acepta el nombre de *Botrytis cinerea* para la especie (Groves & Loveland, 1953).

En 1866, De Bary observa la relación existente entre *B. cinerea* y otro hongo capaz de formar ascas y, por tanto, perteneciente al grupo de los Ascomicetos, al que él mismo denominó *Peziza fuckeliana*. De sus estudios de campo, observa la enorme similitud que presentan los esclerocios formados por este hongo, con los ya analizados en *B. cinerea*. El autor explica que, si los esclerocios caen sobre el suelo, germinan dando lugar a un micelio, unos conidióforos y unos conidios del tipo *B. cinerea*; sin embargo, si quedan soterrados bajo la tierra, producen apotecios del tipo de los originados por *Peziza fuckeliana*. No obstante, los conidios de *B. cinerea* y las ascosporas de *P. fuckeliana* germinan produciendo siempre el mismo tipo de micelio y conidios, aunque se diferencian en la producción de los apotecios. Esto condujo a De Bary a agrupar a todas las formas conidiales en el género *Botrytis* y a las formas apoteciales bajo el de *Peziza*, proponiendo *P. fuckeliana* para los que se producen en hojas de vid (Hennebert, 1973). Por tanto, se acepta a *B. cinerea* y *P. fuckeliana* como el estado imperfecto y perfecto, respectivamente.

Posteriormente Fuckel describió un nuevo género denominándolo *Sclerotinia*, siendo las primeras especies mencionadas *Sclerotinia candolleana* y *Sclerotinia fuckeliana*. Años más tarde, De Bary establece una asociación entre *B. cinerea* y *Sclerotinia fuckeliana*; incluso el autor llega a definir a *Sclerotinia fuckeliana* como el estado perfecto de *B. cinerea*. Desde este momento, son numerosas las citas de autores,

donde se refieren indistintamente como *S. fuckeliana* o *Peziza fuckeliana* al tratar a las formas apoteciales del hongo. Sin embargo, debido a la imposibilidad de obtención del estado sexual del hongo a partir de cultivos puros y a la pérdida de las muestras analizadas por De Bary, muchos científicos no aceptaban totalmente la idea de que *S. fuckeliana* formara parte del ciclo de vida de *B. cinerea*.

En 1930, el análisis realizado por Whetzel (1945) sobre numerosas ascosporas, dio como resultado un micelio y unos conidióforos análogos a los producidos por *B. cinerea*. De esta manera, se describió un nuevo género, denominado *Botryotinia*, con el que se asignaban a todas las formas apoteciales del hongo. A partir de este momento, la diferenciación entre *Botryotinia* y *Botrytis* se realiza en función a la observación de las características morfológicas del hongo.

El problema taxonómico no fue realmente solventado hasta 1939, cuando Groves y Drayton consiguen poner a punto el método de obtención del ciclo sexual *in vitro*, a partir del cruzamiento de cepas de *B. cinerea*, quedando demostrada la capacidad de reproducción sexual del hongo.

Años más tarde, Gregory (1949) localiza en el Museo de Historia Natural de Londres el material original de *Peziza fuckeliana*, recolectado por De Bary. Comparando los resultados obtenidos del estudio de este material con los apotecios obtenidos por Groves y Drayton, comprueba la similitud entre ambas y, por tanto, concluye que ***Botrytis cinerea* presenta un estado perfecto que es *Botryotinia fuckeliana*.**

En 1973 el género *Botrytis* fue redefinido por Hennebert, quien incluyó en el género hasta 22 especies, especificando el nombre del género y especie para el estado perfecto e imperfecto. Además, Hennebert introdujo el término “pleomorfo”, considerando las distintas formas anatómicas del hongo como:

- El **Estado Imperfecto** o **Anamorfo**, que incluye las formas de reproducción asexuales mitóticas del hongo:

- la forma conidial, denominada *Botrytis*
 - la forma microconidial, conocida como *Mycroconium*
 - la forma esclerocial, llamada *Sclerotium*.
- El **Estado Perfecto** o **Teleomorfo**, que es la expresión sexual del hongo caracterizada por la producción de esporas meióticas, al cual se le denomina *Botryotinia*.

Hoy día, ha aumentado hasta 26 el número de especies que se reconocen como pertenecientes al género *Botrytis*, aunque tan sólo en 18 de ellas es conocido el estado anamorfo y teleomorfo (Beever & Weeds, 2004) (Tabla 1).

De acuerdo con la clasificación, *Botrytis cinerea* Pers., es el nombre que recibe el estado conidial imperfecto de esta especie, mientras que el estado sexual o estado teleomorfo, típico de los Ascomycetos, se ha denominado *Botryotinia fuckeliana*. En la figura 9 se esquematiza, de forma exacta, la posición taxonómica de *Bt. fuckeliana*.

- Reino: Fungi
- Phylum: Ascomycota
- Subphylum: Pezizomycotina
- Clase: Leotiomyces
- Orden: Helotiales
- Familia: Sclerotiniaceae
- Género: *Botryotinia*
- Especie: *Botryotinia fuckeliana*

Figura 9. Posición taxonómica de *Botryotinia fuckeliana*

En general, la mayoría de los taxónomos recomiendan que el nombre científico dado sea el del estado sexual preferentemente; por tanto sería *Botryotinia fuckeliana* la forma que debería de emplearse como nombre específico. Sin embargo, es el binomio latino *Botrytis cinerea* el empleado, debido a que se encuentra ampliamente reconocido por micólogos y fitopatólogos, y a que es el estado imperfecto el más extendido en la naturaleza.

ANAMORFO	TELEOMORFO
<i>B. aclada</i> Fresen	-
<i>B. alli</i> Munn	-
<i>B. anthophila</i> Bondartsev	?
<i>B. byssoidea</i> J. C. Walker	?
<i>B. calthae</i> Hennebert	<i>Bt. calthae</i> Hennebert & M. E. Elliott
<i>B. cinerea</i> Pers.: Fr	<i>Bt. fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel
<i>B. convallariae</i> (Kleb) Ondej	-
<i>B. convoluta</i> Whetzel & Drayton	<i>Bt. convoluta</i> (Drayton) Whetzel
<i>B. croci</i> Cooke & Masee	-
<i>B. elliptica</i> (Berk.) Cooke	<i>Botryotinia</i> sp.
<i>B. fabae</i> Sardiña	<i>Bt. fabae</i> J. Y. Lu & T. H. Wu
<i>B. ficariarum</i> Hennebert	<i>Bt. ficariarum</i> Hennebert
<i>B. galanthina</i> (Berk. & Broome) Sacc.	-
<i>B. gladiolorum</i> Timmerm.	<i>Bt. draytonii</i> (Buddin & Wakef.) Seaver
<i>B. globosa</i> A. Raabe	<i>Bt. globosa</i> N. F. Buchw.
<i>B. hyacinthi</i> Westerd. & J. F. H. Beyma	-
<i>B. narcissicola</i> Kleb. ex Westerd. & J.F.H. Beyma	<i>Bt. narcissicola</i> (P.H. Greg.) N.F. Buchw.
<i>B. paeoniae</i> Oudem.	-
<i>B. pelargonii</i> Røed	<i>Bt. pelargonii</i> Røed
<i>B. polyblastis</i> Dowson	<i>Bt. polyblastis</i> (P. H. Greg.) N. F. Buchw.
<i>B. porri</i> N. F. Buchw.	<i>Bt. porri</i> (J. F. H. Beyma) Whetzel
<i>B. ranunculi</i> Hennebert	<i>Bt. ranunculi</i> Hennebert & W. H. Groves
<i>B. ricini</i> N. F. Buchw.	<i>Bt. ricini</i> (G. H. Godfrey) Whetzel
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Bt. fritillarii-pallidiflori</i> Q. T. Chen & J. L. Li
<i>Botrytis</i> sp	<i>Sclerotinia spermophila</i>
<i>B. sphaerosperma</i> N. F. Buchw.	<i>Bt. sphaerosperma</i> N. F. Buchw.
<i>B. squamosa</i> J. C. Walker	<i>Bt. squamosa</i> Vienn.-Bourg
<i>B. tulipae</i> Lind	-

Tabla 1. Especies de *Botrytis* y su estado teleomorfo, *Botryotinia*

5.- *Proceso de Infección*

B. cinerea infecta principalmente a los órganos fructíferos de la planta (flores y frutos), pero también es capaz de originar pudriciones en los tallos, ahogamientos de plántulas, manchas foliares y pudriciones de tubérculos, bulbos y raíces (Agrios, 1997). Como se puede observar, existen grandes diferencias entre los huéspedes a los que puede infectar, lo que hace pensar que *B. cinerea* posee un mecanismo de infección complejo. De forma general, el ciclo de infección (Prins *et al.*, 2000) puede considerarse dividido en varias etapas (Fig. 10):

1. Adhesión de los conidios sobre la superficie del huésped.
2. Germinación de los conidios si las condiciones son favorables.
3. Penetración del tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, mediante la participación de distintas enzimas, la utilización de procesos enzimáticos, la excreción de toxinas o combinación de estas.
4. Muerte de las células adyacentes al punto de penetración, dando lugar a la formación de una lesión primaria.
5. En algunos casos, una fase de latencia, durante la cual parece que los mecanismos de la planta logran controlar al patógeno, que permanece localizado en las áreas necrosadas de las primeras lesiones.
6. Una vez vencidas las defensas de la planta, se inicia la diseminación en el tejido vegetal circundante, originando la colonización y la maceración.
7. Y la esporulación del hongo sobre el tejido macerado, produciéndose una nueva generación de conidios que están listos para ser dispersados e iniciar un nuevo ciclo de infección.

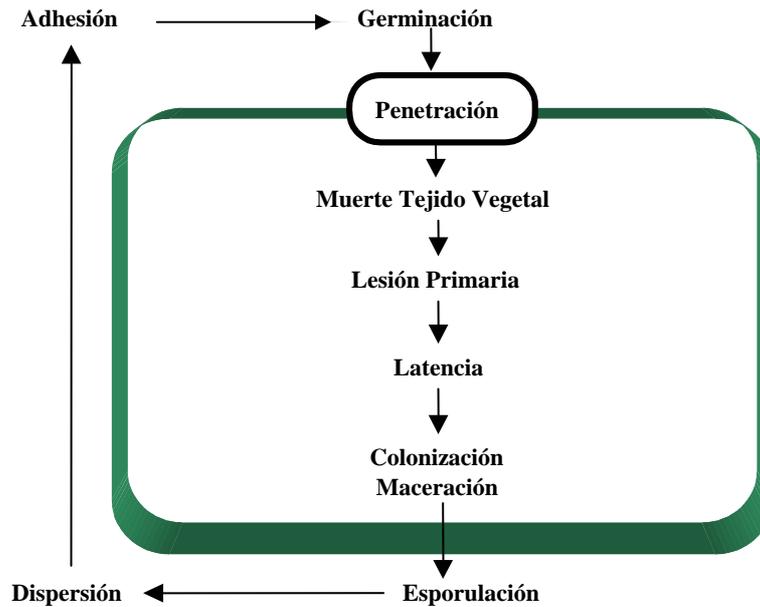


Figura 10. Ciclo de infección de *B. cinerea* sobre el tejido del huésped

Bajo condiciones ambientales óptimas, un ciclo de infección completo puede durar de 3 a 4 días, dependiendo del tipo de huésped atacado (Prins *et al.*, 2000).

A continuación, se describirá cada una de las etapas del proceso de infección.

5. 1.- *Adhesión de los Conidios*

La adhesión de los conidios sobre la superficie del tejido vegetal tiene lugar en dos fases (Doss *et al.*, 1993; 1995). En la primera fase, que tiene lugar inmediatamente después de la hidratación del conidio, se establecen interacciones hidrofóbicas entre el huésped y la superficie del conidio. Y en la segunda, una vez que el conidio ha germinado, el tubo germinativo produce una matriz extracelular que le sirve de adhesivo, haciendo muy difícil la eliminación de los conidios de la superficie del huésped.

La matriz extracelular está compuesta por una mezcla de lípidos, polisacáridos y polipéptidos que constituyen el 50-60 % de la masa total, siendo el resto de su composición un pigmento oscuro con las mismas características fisicoquímicas que la melanina (Doss *et al.*, 2003). Gil *ad et al.* (2001), han sugerido que la matriz

extracelular desempeña la función de protección del hongo frente a los compuestos de defensa producidos por el huésped. Además, se cree que la melanina está implicada en el proceso de adhesión y como protección del hongo frente a la desecación (Doss *et al.*, 2003), radiación U.V. y temperaturas extremas.

Cuando *B. cinerea* se crece en un medio líquido, segrega cinereano, un β -(1, 3)-(1, 6)-D-glucano (Doss *et al.*, 1995), el cual forma una cápsula adhesiva alrededor del micelio. Una vez que la glucosa se agota en el medio, *B. cinerea* degrada este polímero en unidades de glucosa que pueden servirle como nutriente. Además, el cinereano le puede servir al hongo de reserva de agua, protegiendo a las hifas que comienzan a formarse de la deshidratación (Prins *et al.*, 2000).

5. 2.- Germinación

La germinación de los conidios adheridos a la superficie del huésped está inducida por varios factores: (i) la disponibilidad de agua en la superficie así como una humedad relativa alta (>93 % H R) (Blakeman, 1980); (ii) la dureza e hidrofobicidad de la superficie; (iii) la fuente de carbono orgánico (Doehlemann *et al.*, 2006); (iv) la presencia de nutrientes (fosfatos y glucosa) (Benito *et al.*, 1998) y/o (v) la producción de etileno por parte de los tejidos senescentes del hospedador o durante la maduración del fruto (Prins *et al.*, 2000).

Doehlemann *et al.* (2006) han propuesto que la germinación de *B. cinerea* está controlada bajo vías de señalización en las que intervienen la proteína G_{α} , la MAP kinasa BMP1 y el AMP cíclico. Así pues, la inducción de la germinación en un medio enriquecido es dependiente de la MAP kinasa BMP1; la inducción por una fuente de carbono requiere de la presencia de la proteína G_{α} , la MAP kinasa BMP1 y el AMP cíclico y por último, la inducción por la hidrofobicidad de la superficie es totalmente dependiente de la MAP kinasa BMP1.

La observación al microscopio ha revelado que la germinación comienza con la hinchazón de los conidios y posterior emisión del tubo germinativo, transcurridas 1 a 3 horas postinoculación. Después de seis horas, dicho tubo germinativo se especializa

formando el apresorio. Durante el proceso de germinación los diferentes orgánulos sufren una serie de cambios, no existen vacuolas en el tubo emergente mientras que en el conidio se forma una vacuola central. Al microscopio óptico, se puede observar que los orgánulos, el núcleo y varias mitocondrias se desplazan hacia la punta del tubo germinativo (Tenberge, 2004). Y lo que es más importante, aumenta el número de cisternas del retículo endoplasmático y en algunas ocasiones, aparecen conectadas a la membrana nuclear. Tan pronto como el tubo germinativo emerge del conidio, este se recubre de una funda mucilaginosa que le sirve de adhesión.

5. 3.- *Penetración*

B. cinerea es un oportunista capaz de iniciar la infección en tejidos dañados, en tejidos que han sido previamente infectados por otros patógenos, mediante penetración directa de la epidermis e incluso a través de aberturas naturales como son los estomas. En cualquiera de los casos, las estructuras de penetración formadas por *B. cinerea* son el apresorio o el tubo germinativo.

5. 3. 1.- *Penetración mediada por el apresorio*

Los apesorios se forman a partir de los tubos germinativos incipientes. A veces, consisten en meras inflamaciones del extremo del tubo germinativo pero, en ocasiones, éste comienza a dividirse y produce estructuras muy ramificadas que se compactan formando un pseudotejido (Verhoeff, 1980).

B. cinerea es capaz de formar un apresorio durante su penetración en judía y tomate, incluso durante su desarrollo sobre una superficie artificial como el vidrio o una superficie con acetato de amilo, lo que parece indicar que el desarrollo celular es independiente de la interacción con la superficie del huésped (Tenberge, 2004). En cualquiera de los casos, para que el apresorio se desarrolle es indispensable la adición de nutrientes y la presencia de agua.

Los estudios sobre la estructura del apresorio, han demostrado que durante la hinchazón del extremo del tubo tiene lugar el movimiento de los orgánulos y el citosol y que no existe septo para separar el tubo germinativo, como sí ocurre en el género *Magnaporthe*. Durante la formación del apresorio, la pared celular de la región inflamada contiene quitina (Tenberge, 2004) y la capa externa se encuentra melanizada (Doss *et al.*, 2003), lo que facilita la conexión entre el apresorio y la superficie del tejido vegetal.

La calcineurina es una proteína muy conservada, formada por tres subunidades la calcineurina A (subunidad catalítica), la calcineurina B (subunidad reguladora) y la calmodulina. El ensamblaje y la actividad de este trímero parece estar regulada por la ciclofilina A, conocida por ser la diana del inmunosupresor ciclosporina A (CsA). Mutantes nulos para el gen que codifica para la ciclofilina A (*bcp1*) son incapaces de desarrollar el ciclo infeccioso completo y la inhibición de la calcineurina modifica la morfología de las hifas e impide la formación de las estructuras de infección (Viaud *et al.*, 2003). Resultados similares se han encontrado en *Magnaporthe grisea* y *Cryptococcus neoformans* (Viaud *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Además, los estudios realizados mediante la utilización de arrays en *B. cinerea*, indican que la calcineurina está implicada en la morfogénesis de las estructuras de penetración, mientras que la ciclofilina tiene un papel fundamental en los siguientes estadios del proceso infeccioso, tales como, la penetración o la colonización de los tejidos vegetales (Viaud *et al.*, 2003).

5. 3. 2.- Penetración mediada por el tubo germinativo

Existen numerosos trabajos que ponen de manifiesto la penetración directa a través del tubo germinativo, la cual se ve favorecida por la inoculación en seco y sin la adición de nutrientes. En estos casos, se considera que la hifa de infección se forma como una elongación directa del tubo germinativo y que la penetración tiene lugar sin formación de ninguna otra estructura. En líneas generales, son una serie de señales las que desencadenan el cambio morfogénico de elongación a penetración directa.

Si bien en *Magnaporthe*, el gen *pmk1*, que codifica para una MAP kinasa, es indispensable para la formación del apresorio y la infección, en *B. cinerea* la función no está perfectamente demostrada. No obstante, Zeng *et al.* (2000) comprobaron que, en este hongo, el gen *bmp1*, homólogo al *pmk1*, está implicado en los procesos de penetración y maceración del tejido vegetal.

En la comunidad científica existe una gran controversia sobre si la penetración de la superficie del huésped está mediada por la formación de estas estructuras especializadas o si el hongo previamente produce sustancias capaces de degradar la pared y de esa manera se abre paso al interior del vegetal. Entre estas sustancias se encuentran enzimas con actividad cutinasa, pectinasa y lipasa.

5. 3. 3.- Función de la cutinasa en la penetración

La cutícula es la primera barrera con la que se encuentra el patógeno durante su penetración en el huésped. La cutina es el componente estructural de la cutícula y está constituido por un ácido graso con grupos hidroxilo unidos por enlaces éster. En los primeros estudios sobre el papel de la cutinasa A de *B. cinerea* en la infección, realizados empleando anticuerpos anti-cutinasa, se sugería un importante papel para esta enzima en la penetración de los tejidos del hospedador. Sin embargo, cuando se ha clonado y caracterizado el gen *cut A* (Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997) que codifica para la cutinasa A, y se ha generado un mutante carente de cutinasa mediante interrupción dirigida del gen (Kan *et al.*, 1997), el mutante, no presentó diferencias en patogenicidad respecto a la cepa silvestre, por lo que se excluyó a la cutinasa como enzima esencial en el proceso de penetración.

5. 3. 4.- Función de las pectinasas en la penetración

Estudios de microscopía han mostrado que tras la penetración de la cutícula, las hifas de *B. cinerea* invaden la pared celular entre dos células adyacentes, lo que implica la degradación de la pectina de la pared celular de estas células.

En *B. cinerea*, se han estudiado ampliamente enzimas implicadas en la degradación de la pectina. Por un lado, se ha descrito la excreción de diversas poligalacturonasas al medio extracelular, de las cuales se han clonado y caracterizado 6 genes que codifican 6 isoenzimas diferentes (Wubben *et al.*, 1999). La mutación de uno de ellos, el gen *bcp1*, produce un descenso significativo en la capacidad de desarrollar infecciones secundarias (ten Have *et al.*, 1998), aunque debido al amplio número de isoformas es complejo valorar la participación de estas enzimas en la patogenicidad del hongo. Por otro lado, la existencia de tal número de isoenzimas podría explicar la capacidad adaptativa y la flexibilidad del patógeno.

También se ha descrito la existencia en el medio extracelular de diversas exopoligalacturonasas (Rha *et al.*, 2001), pectin-liasa (Chilosi & Magro, 1997), ramnogalacturonano hidrolasa (Chen *et al.*, 1997) y una pectinmetil esterasa, codificada por el gen *Bcpme1*, cuya mutación reduce la infectividad del hongo en varios hospedadores (Valette-Collet *et al.*, 2003). No obstante, todos los mutantes obtenidos han sido capaces de penetrar en el tejido huésped.

5. 3. 5.- Función de las lipasas en la penetración

La capa cerosa de los pétalos de flores como la rosa o la gerbera no suponen una barrera para la infección de *B. cinerea*, posiblemente porque el hongo produce un surfactante, metabolito o proteína que reduce la hidrofobicidad de la superficie y disuelve la capa cerosa. Se ha descrito que el cinereano, que recubre al tubo germinativo de *B. cinerea* puede actuar como un surfactante, aunque pueden ser enzimas las encargadas de reducir la tensión superficial.

B. cinerea produce una lipasa triacylglycerol extracelular durante su cultivo en presencia de ésteres de ácidos grasos. Esta enzima es capaz de hidrolizar ésteres de ácidos grasos insaturados de cadena larga, los cuales componen la cutina y la cera de las flores (Kars & van Kan, 2004). Comménil *et al.* (1999) clonaron y caracterizaron el gen de la lipasa triacylglycerol (*Lip 1*) y generaron mutantes deficientes en lipasa, los cuales no produjeron lipasa extracelular pero mantuvieron su capacidad de infectar las hojas de

Phaseolus vulgaris, lo que implica que la lipasa no es esencial para la penetración del tejido.

5. 4.- Muerte del Tejido Vegetal

Una vez atravesada la cutícula, *B. cinerea* mata las células adyacentes al punto de penetración, lo que da lugar a la formación de una lesión primaria y le facilita la posterior invasión del tejido. Recientes estudios han demostrado que la invasión del huésped por *B. cinerea* provoca la condensación nuclear y daños en la membrana plasmática de las células de las plantas (Govrin & Levine, 2000). Estos cambios en el huésped son originados por la difusión de ciertos factores que, de manera directa o indirecta, tienen actividad fitotóxica (toxinas, ácido oxálico y especies activas de oxígeno).

5. 4. 1.- Las toxinas

Ciertos metabolitos secundarios producidos por cultivos de *B. cinerea*, tales como el botridial, el dihidrobotridial (Duran-Patrón *et al.*, 1999; Rebordinos *et al.*, 1996) y la bocinolida (Cutler *et al.*, 1993) poseen carácter fitotóxico cuando son ensayados sobre tejido vegetal. Inicialmente, la producción de estos metabolitos *in planta* se puso en duda. Sin embargo, se ha demostrado que el botridial se acumulaba sobre la superficie del huésped (Deighton *et al.*, 2001) y que está íntimamente relacionado con el desarrollo de las manchas necróticas sobre el mismo, en un proceso dependiente de la luz. Actualmente, la ruta de biosíntesis del botridial ha sido resuelta (Colmenares *et al.*, 2002b) y varios genes se han identificado (Siewers *et al.*, 2005). La delección de uno de estos genes, produjo la reducción de la virulencia de una cepa pero no en otras, indicando que algunas cepas emplean exclusivamente el botridial para causar la muerte celular, mientras que otras pueden producir otras toxinas adicionales como la bocinolida (Reino *et al.*, 2004).

5. 4. 2.- El ácido oxálico

B. cinerea produce ácido oxálico tanto *in vitro* (Gentile, 1954) como *in planta* (Verhoeff *et al.*, 1988). El ácido oxálico forma cristales de oxalato cálcico dentro del tejido el huésped (Prins *et al.*, 2000), cuya concentración en hojas de vid y judías están correlacionadas con el tamaño de las lesiones. No obstante, aún no está claro si el nivel de ácido oxálico producido *in planta* es suficiente para causar la muerte de las células del huésped.

Es conocido que si *B. cinerea* se cultiva en medios con pH bajo tiene lugar un aumento de la producción y actividad de las enzimas endopolygalacturonasas, proteinasas y lacasas (Manteau *et al.*, 2003), así como la inducción de toxinas (botridial).

Además, el oxalato posee actividad quelante de iones metálicos, particularmente de iones calcio y cobre. En las plantas, la mayor cantidad de calcio se encuentra en la pared celular, embebido en la pectina. El oxalato es capaz de secuestrar los iones calcio de la pectina, principalmente cuando está siendo degradada por las enzimas pectinasas. La eliminación del calcio provoca la precipitación de los cristales de oxalato cálcico y la desestabilización de la pectina. Como consecuencia, la estructura del polímero absorbe agua y se hincha, provocando una deformación del área de contacto planta-patógeno.

La ruta de biosíntesis del oxalato aún no está determinada. Varios metabolitos podrían servir como precursores del oxalato: el glioxal, el oxalacetato o el ácido eritroascórbico. Actualmente, se está investigando la función del gen de la oxalacetato hidrolasa en la producción del ácido oxálico (Kars & van Kan, 2004).

5. 4. 3.- Inducción de especies activas de oxígeno (AOS)

Son numerosos los estudios que se están realizando para determinar la relación entre la producción de las especies activas de oxígeno (AOS) y la patogenicidad de *B. cinerea*. El término especies activas de oxígeno engloba al anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Durante la infección del tejido vegetal tiene lugar

un estrés oxidativo y una modificación del potencial redox de la interfase huésped-patógeno así como en el tejido próximo al punto de infección.

Existe un gran número de enzimas que contribuyen a la producción del peróxido de hidrógeno. La superóxido dismutasa y la glucosa oxidasa extracelular son dos enzimas candidatas. La delección de los genes que codifican para estas enzimas ha mostrado que sólo los mutantes en la superóxido dismutasa reducen significativamente su virulencia y la acumulación extracelular de peróxido de hidrógeno (Rolke *et al.*, 2004).

5. 5.- Fase de Latencia

En muchos casos, tras las lesiones primarias se inicia una fase de latencia durante la cual, los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno. Durante esta etapa, las condiciones no son favorables para el hongo, pero no muere, sino que permanece en estado latente, localizado en las áreas necróticas, esperando una señal para iniciar la expansión.

Este corto período de tiempo ha sido descrito en numerosos frutos aunque tiene lugar con mayor frecuencia en fresa, frambuesa y vid. La detención del crecimiento del hongo en vid se atribuye a la presencia de fitoalexinas (resveratrol) sintetizadas por la planta como respuesta a la invasión por el patógeno. También se ha detectado la presencia de proteínas inhibidoras de la polygaracturonasa (Johnston *et al.*, 1994) o de sustancias como es la saponin tomatina, previo a la infección (Verhoeff, 1980) como respuesta a la infección por el patógeno. No obstante, aparece un oscurecimiento de las lesiones, indicativo de que se están sintetizando y acumulando nuevos compuestos fenólicos, algunos de los cuales poseen actividad fungiestática. En respuesta a la aparición de estos compuestos inhibidores del crecimiento, el hongo sintetiza enzimas capaces de degradar dichas sustancias (Pezet *et al.*, 1991) o facilitar la secreción (De Waard, 1997).

5. 6.- *Colonización. Maceración*

Una vez que el hongo ha invadido los tejidos subepidérmicos, intra e intercelularmente, la infección se establece. El hongo degrada las paredes celulares facilitándose la entrada y obteniendo nutrientes para su crecimiento. Para este fin el hongo segrega una serie de enzimas degradativas de la pared celular (Prins *et al.*, 2000), entre las que se han estudiado las pectin metilesterasa, pectin liasas, endopolygalacturonasas, ciclofilinas, celulasas, etc.

El éxito del ataque depende tanto de la actividad del patógeno como de la respuesta de defensa que desarrolle la planta frente a la presencia del patógeno (producción de fitoalexinas, fitoanticipinos, hormonas, inhibidores de enzimas, etc.), sin olvidar factores ambientales como el calor, la humedad, etc. Recientes estudios han demostrado que *B. cinerea* es capaz de inducir la muerte celular programada (apoptosis) en *Arabidopsis thaliana* (Govrin & Levine, 2000) y en hojas de tomate (Hoeberichts *et al.*, 2003) y que se beneficia de estas células muertas para crecer y colonizar el huésped.

5. 7.- *Esporulación y Dispersión*

Ya establecida la infección, ésta se manifiesta mediante la putrefacción del huésped. Durante esta fase tiene lugar la formación de numerosos conidióforos y conidios sobre la superficie del cultivo, dando lugar a la coloración grisácea característica de la enfermedad.

En el huésped, el patógeno está presente como micelio, conidióforo, conidio y/o esclerocio, los cuales pueden ser dispersados por diversas vías como el viento, la lluvia y los insectos. En cualquiera de los casos, es necesario que se desplacen desde la fuente de inóculo primario hasta una zona susceptible de ser infectada.

5. 7. 1.- *Dispersión de los conidios por el viento y la lluvia*

Los conidios son las estructuras de dispersión de *B. cinerea* por excelencia. El mecanismo por el cual el viento los dispersa se divide en tres fases: liberación,

transporte y deposición. La liberación tiene lugar por una torsión del conidióforo, inducida por el viento o por las salpicaduras del agua de lluvia. Una vez liberados, el viento es el agente que transporta los conidios, de manera que, conforme aumenta la velocidad del viento, mayor va a ser la concentración de conidios en la atmósfera. La distancia a la que son depositados depende no sólo de la velocidad del viento sino también de la posición de la fuente de inóculo. En viña, el 95% de los conidios de *B. cinerea* son depositados a 1 metro de la fuente (Holz *et al.*, 2004).

La última fase, la deposición, conlleva dos procesos, sedimentación e impacto, ambos influenciados por la fuerza del viento. La sedimentación es el proceso mediante el cual los conidios descienden bajo la influencia de la gravedad. El impacto implica el choque entre el conidio y la superficie del huésped. Holz *et al.* (2004) han demostrado que los conidios se depositan de forma individual y no agrupados, independientemente de que el número de conidios que son transportados sea muy elevado.

La lluvia también juega un papel importante en la liberación y dispersión de los conidios. Las gotas de lluvia golpean las hojas desprendiendo los conidios de las lesiones. Sin embargo, éstos no llegan a humedecerse e introducirse en la gota, sino que se quedan sobre la superficie de las gotas de agua. Además, el agua es un factor primordial en la adhesión y germinación de los conidios.

5. 7. 2.- Dispersión de los conidios por los insectos

Los conidios pueden ser dispersados por los insectos, al quedar atrapados entre los segmentos, la cutícula, las alas, etc., de los mismos. Se han aislado conidios de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), la polilla de la vid (*Lobesia botrana*), el trips de Nueva Zelanda (*Trips obscuratus*) y la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*). Incluso pueden permanecer viables después de ser ingeridos por los insectos y atravesar su tubo digestivo (Holz *et al.*, 2004).

En algunos casos, los conidios pierden su papel como agentes de dispersión y son el micelio o las clamidosporas los que actúan como tal.

6.- Control

El control de *B. cinerea* no resulta sencillo por diversas razones: i) es capaz de atacar a cultivos en cualquier estado de desarrollo, incluida la post-cosecha, ii) infecta cualquier órgano vegetal, iii) es hábil para crecer a temperaturas de almacenamiento muy bajas y iv) es genética y morfológicamente heterogéneo, lo que le posibilita un crecimiento y desarrollo diferente en condiciones de cultivo desiguales. Tradicionalmente, la práctica más usada para el control de enfermedades fúngicas ha sido la utilización de fungicidas químicos.

6. 1.- Control Químico

El control químico depende principalmente de la disponibilidad y validez de los productos fitosanitarios. Entre los fungicidas más comúnmente utilizados destacan el benomilo, carbendazima, captan y diclofuanida, entre otros. No obstante, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan, estando sujeta su utilización a restricciones tales como el período de espera entre la última aplicación y la cosecha, problemas de residuos, etc. Por otra parte, la gran adaptabilidad de las cepas del hongo a los botricidas comerciales ha conllevado a la aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes, lo que ha hecho necesario un cambio continuado de fungicidas y un incremento considerable de las dosis, con el consiguiente riesgo de persistencia de estos productos en el suelo. Actualmente, están surgiendo alternativas, para lo que se ha hecho imprescindible profundizar en el conocimiento de la bioquímica del hongo.

6. 2.- Prácticas de Cultivo

Las prácticas de cultivo van encaminadas a reducir los niveles de inóculo y crear condiciones ambientales que sean lo menos favorables a la infección. Hoy día, las prácticas seguidas son la desinfección de semillas, la eliminación de restos de cultivos infectados, la rotación de las cosechas, el control de las condiciones para reducir la

cantidad de inóculo y la dispersión del mismo (control de los niveles de nitrógeno en suelo, aireación, etc.), el control del riego en invernaderos, etc.

6. 3.- Creación de Plantas Transgénicas Resistentes

Otra de las estrategias empleadas es la creación de plantas resistentes, lo que resulta bastante difícil, ya que aún no se conocen los genes principales de resistencia contra *Botrytis*. Sin embargo, se están obteniendo algunos resultados esperanzadores, como los de Hain *et al.* (1993), quienes lograron transformar células de tabaco con un gen estilbenosintasa de uva, aumentando la resistencia de la planta frente a *B. cinerea*.

Se han desarrollado plantas resistentes que expresan genes propios de organismos utilizados en biocontrol (Carstens *et al.*, 2003), genes de otras plantas implicados en el desarrollo de mecanismos de defensa (Tabei *et al.*, 1997), etc. También, se ha descrito en plantas el fenómeno conocido como silenciamiento génico post-transcripcional y su posible aplicación, a largo plazo, en la obtención de variedades resistentes (Wesley *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicabilidad en los campos de cultivo de estas plantas modificadas todavía necesita ser valorada con exhaustividad.

6. 4.- Control Biológico

Este consiste en el uso de microorganismos que suelen colonizar las heridas de los tejidos vegetales utilizando todos los nutrientes disponibles, lo que dificulta la germinación de las esporas de otros organismos patógenos. Tiene como ventaja frente a los métodos químicos de control, su menor coste económico sin daño en la ecología.

Entre estos agentes de biocontrol destacan bacterias, nematodos y levaduras, así como diversos hongos. Desde 1970, *Trichoderma* spp. ha sido uno de los más estudiados por varias razones: tiene una alta tasa de crecimiento, esporula abundantemente, compite bien con otros microorganismos del suelo, se suele comportar como micoparásito, muestra resistencia a pesticidas químicos y produce varios antibióticos (gliotoxina y viridina) además de otros productos extracelulares. En España, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Reino Unido, Francia y otros países europeos,

se comercializan ya formulaciones basadas en *Trichoderma*. En el caso concreto de *Botrytis*, *Thichoderma* es capaz de provocar una reducción en la germinación y en la elongación de los tubos germinativos en hojas de judía, al reprimir la excreción de diversas enzimas al medio extracelular (Kapat *et al.*, 1998). Sin embargo, la eficacia de estos métodos basados en el uso de agentes de biocontrol no es demasiado alta y en ocasiones los resultados no son repetitivos ni previsibles.

Otros hongos estudiados en el control de *B. cinerea* han sido las especies de *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarium*, *Alternaria alternata*, *Ulocladium atrum* y especies de *Gliocladium*, *Penicillium*, *Phytium* y *Olpidium*, entre otros.

No obstante, no sólo se han utilizado hongos como antagonistas de *B. cinerea*, sino también bacterias y levaduras (Elad & Stewart, 2004). Un ejemplo de ello es la bacteria *Pseudomonas cepacia* que inhibe el crecimiento de *B. cinerea* gracias a la producción de la sustancia identificada como pirrolnitrina. Otras bacterias estudiadas han sido *Streptomyces*, *Xanthomonas maltophilia*, *Bacillus pumilus* y especies de *Lactobacillus*. En relación a las levaduras existen datos de control por parte de *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus albidus*, las cuales actúan sobre la superficie de las hifas, conidios y conidióforos de *B. cinerea*.

A pesar de los numerosos resultados positivos, la aplicación de agentes biológicos no es todavía una estrategia mayoritaria en el control de la podredumbre gris. Sólo en combinación con otros métodos se ha conseguido un control de la infección en un amplio rango de cultivos.

6. 5.- *Diseño Biosintético de Fungicidas*

El descubrimiento del papel que juegan las toxinas excretadas por algunos hongos fitopatógenos en el mecanismo de infección de los mismos, ha permitido abordar una nueva y racional alternativa a los fungicidas comerciales. Esta nueva estrategia ha sido bautizada con el nombre de Diseño Biosintético de Fungicidas e implica: el conocimiento profundo de las rutas biosintéticas que conducen a las toxinas excretadas por *B. cinerea* y su posterior inhibición mediante análogos biosintéticos.

Desde los caldos de cultivo de *B. cinerea* se han aislado más de 30 toxinas (Colmenares *et al.*, 2002a; Duran-Patrón *et al.*, 1999; Durán-Patrón *et al.*, 2000), agrupadas en 2 grandes familias, una con esqueleto de botriano, cuyo máximo representante es el botridial y sus derivados, y otra, con un esqueleto de macrolactona polihidroxilada, menos activa que la anterior. De entre todas, cabe destacar el botridial y dihidrobotridial, responsables de las manchas necróticas características de la infección por *B. cinerea* (Rebordinos *et al.*, 1996).

La utilización de análogos que inhiban la ruta biosintética de los metabolitos fitotóxicos o de las enzimas implicadas en la infección, proporcionaría una biodegradación rápida y fácil, permitiendo su eliminación de la biosfera, obteniéndose por tanto, compuestos fungicidas racionales y compatibles con el medio ambiente. Por ejemplo, basándose en la importante actividad antifúngica mostrada por sustancias como danielona, fitoalexina aislada de la papaya como respuesta al ataque por *Colletotrichum gloesporioides*, se han sintetizado compuestos que han demostrado su actividad antifúngica frente a *B. cinerea* (Bustillo Pérez, 2001).

6. 6.- *Factores de Patogenicidad*

La identificación de **factores de patogenicidad**, es decir, aquellos factores que contribuyen de manera relevante a la penetración, invasión, colonización, maceración y, en definitiva, a la infección de un tejido vegetal vivo y a la dispersión de la enfermedad de *B. cinerea* presenta un gran interés, en cuanto a que pueden conducir al desarrollo de nuevas formas de lucha contra la infección, estableciendo mecanismos que permitan neutralizar este tipo de factores en el hongo. Además, debido a la gran variedad de plantas que puede infectar, se suele considerar a *B. cinerea* como un buen modelo para estudiar el arsenal de mecanismos de infección más comunes presentes en hongos fitopatógenos en general.

Los tipos de genes esenciales implicados en la patogénesis dependen del hongo que estemos estudiando. Así, en *B. cinerea* cobran importancia los genes implicados en la degradación de la cutícula y de la pared celular, en la formación de las estructuras de infección (apresorios, haustorios, etc.), en la producción de toxinas, señalización

intracelular, etc. Hasta la fecha, se han obtenido resultados prometedores al analizar el gen *bac*, que codifica para una adenilato ciclasa (Klimpel *et al.*, 2002), o los genes *bcg1* y *bcg2*, que codifican para subunidades α de la proteína G (Gronover *et al.*, 2001), ya que al mutar alguno de ellos, el hongo es capaz sólo de llevar a cabo una infección primaria en la planta. Sin embargo, la MAP kinasa, codificada por el gen *bmp1* (Zheng *et al.*, 2000), constituye el único factor que, por ahora, se ha considerado como esencial para la patogenicidad del hongo, ya que su mutación hace que los conidios del hongo sean incapaces de penetrar y macerar el tejido.

Otros candidatos han sido los genes que codifican para la quitina sintasa, es decir, los implicados en la síntesis de la quitina, como principal componente de la pared celular de los hongos. La disrupción de los genes de la clase I y III de la quitina sintasa de *B. cinerea*, ha provocado una reducción de la virulencia del hongo sobre *Vitis vinifera* y *Arabidopsis thaliana* (Soulié *et al.*, 2003; 2006), lo que los hace unos candidatos perfectos para el diseño de fungicidas.

Se ha analizado también, la participación de proteínas de membrana en la patogénesis del hongo. Más concretamente, miembros de los que se han venido a llamar ATPasas del tipo ABC (ATP Binding Casete ó ABC) y la “principal superfamilia de facilitadores” (major facilitor superfamily ó MFS), que proporcionan protección al hongo frente a compuestos de defensa de la planta durante la patogénesis y, que por tanto, podrían considerarse como la defensa de primera línea de este patógeno en los mecanismos de supervivencia. De hecho, la mutación del gen que codifica para el transportador *BcatrB* provoca una ligera disminución en la capacidad infectiva del hongo (Schoonbeek *et al.*, 2001).

Pese a todo, los estudios realizados demuestran que la disminución de la virulencia depende de la naturaleza de los estudios de patogenicidad y sobre todo, de la cepa de *B. cinerea* usada en el mismo. Así por ejemplo, la supresión de gen *bcP450-12* (equivalente al *cnd5*) reduce la virulencia en la cepa T4 y, sin embargo, no tiene efecto sobre las cepas SAS56 y ATCC58025 (Siewers *et al.*, 2005). Este hecho implica una complicación adicional y la necesidad de estandarizar estos estudios en la comunidad científica.

6. 7.- *Control Integrado*

Desde hace unos años se está poniendo en práctica el uso conjunto de los métodos preventivos y de control tanto biológico como químico, lo que se conoce como control integrado.

En la actualidad, el control integrado real que se está llevando a cabo en el campo es la aplicación conjunta de fungicidas químicos y métodos de cultivo, como podrían ser la rotación de cosechas, medidas higiénicas y baja densidad de plantas en la cosecha, ya que el control biológico está todavía en fase de investigación.

Para el control de *B. cinerea* en diferentes cultivos (uvas, fresas, tomates, pepinos y garbanzos) se ha ensayado la combinación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* con fungicidas como iprodona, procimidona, vinclozolina y thiram, obteniéndose resultados mejores que los logrados con la aplicación de un único fungicidas.

Una de las ventajas del empleo del control integrado es que permite disminuir sensiblemente el uso de fungicidas químicos, al lograrse reducir las dosis y el número de tratamientos.

7.- *Variabilidad Genética en B. cinerea*

Dentro del género *Botrytis*, la especie *B. cinerea* se caracteriza por su gran variabilidad genética. Sin embargo, aún no se conocen completamente los mecanismos involucrados en ella. Una de las primeras evidencias de variabilidad en *B. cinerea*, tiene lugar cuando se aíslan las cepas de la naturaleza y se cultivan en medios sintéticos, donde muestran una gran diversidad fenotípica, tanto en cuanto a morfología como a producción de enzimas, patogenicidad o resistencia a fungicidas.

Jarvis (1980) y Lorbeer (1980) aportaron los primeros datos sobre taxonomía y variabilidad, proponiendo para esta especie dos tipos de variabilidad, dependiendo de si el mecanismo a través del cual se genera es asexual o sexual. Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas moleculares, existen numerosos resultados que desvelan nuevos factores que influyen en la variabilidad, así como los mecanismos implicados en ella.

7. 1.- *Variabilidad Asexual*

La variabilidad asexual se debe a las anastomosis que pueden producirse entre las hifas del hongo y que dan lugar a células multinucleadas y, generalmente, heterocarióticas. En 1932, Hansen y Smith, observaron cómo los núcleos de una cepa podían migrar al interior de las células de otra por anastomosis de hifas vecinas, produciendo así, un micelio heterocariótico. Estos autores aislaron cuarenta y siete cepas de *B. cinerea* y transfirieron conidios individuales de cada una de ellas a medio fresco para analizar su segregación somática. Tras numerosos pases, los cultivos, siempre monoconidiales, manifestaron características morfológicas muy diversas. Este hecho, unido a la presencia de varios núcleos en las células del hongo y a la capacidad de anastomosarse de las hifas, les llevó a concluir que los conidios podían actuar como propágulos heterocarióticos.

En 1979 Grindle, al igual que los anteriores autores, postuló que la heterocariosis era la responsable de la variabilidad pero que además, habría que considerar la función de los elementos citoplasmáticos.

Akutsu *et al.* (1987; 1988) mediante experimentos en los que ponían en contacto dos cepas, una resistente y otra sensible a un determinado fungicida, pudieron demostrar que la anastomosis y las transferencias intermiceliales de núcleos portando marcadores de resistencia al producto se daban frecuentemente. Además, observaron, al microscopio óptico, que la transferencia de núcleos se establece de dos modos diferentes: i) mediante una hifa de contacto o ii) por la unión directa de una hifa con otra, sin que exista una hifa de contacto entre ellas.

La incompatibilidad vegetativa, proceso por el cual las hifas de dos cepas no pueden fusionarse o proporcionar un heterocarionte viable, es frecuente entre numerosas especies de hongos fitopatógenos, como *Sclerotinia* o *Monilinia* (Free *et al.*, 1996; Kohn *et al.*, 1990). Este fenómeno, que supone una barrera infranqueable para la heterocariosis como fuente de variabilidad, se ha detectado entre algunas cepas de *B. cinerea* (Beever & Parkes, 1993), aunque no parece estar muy generalizado en la especie. Las bases genéticas de dicha incompatibilidad son aún desconocidas en *B. cinerea*, aunque los datos indican que el sistema es similar al que ocurre en otros Ascomicetos (Glass *et al.*, 2000), donde la incompatibilidad vegetativa viene determinada por varios genes (*vic* o *het*) con dos o más alelos cada uno.

7. 1. 1.- Nivel de ploidía

La enorme variabilidad fenotípica que muestra la mayoría de los hongos fitopatógenos se atribuye, en muchos casos, a una desviación del número normal de cromosomas o heteroploidía. Los hongos pueden sufrir frecuentes cambios en el número de cromosomas por núcleo, variando desde los nulisómicos ($n-x$), pasando a través de series euploides de $1n$, $2n$, $3n$..., e incluyendo varios aneuploides. La contribución de la aneuploidía a la variabilidad es potencialmente enorme, debido a la gran variedad de aneuploides que son posibles y cuyo número potencial está gobernado por el número de cromosomas en el estado haploide y por el grado al cual puede darse la poliploidía. Por tanto, la poliploidía no está necesariamente restringida a los euploides, ya que los aneuploides pueden también formar diploides y poliploides.

Para determinar el nivel de ploidía de *B. cinerea*, Büttner *et al.* (1994) emplearon la técnica de microscopía de fluorescencia y estimaron el contenido de ADN por núcleo en distintas cepas y lo compararon con el de la cepa SAS56, la cual previamente había sido tratada con benomilo para inducir la haploidización de la misma. Tras el tratamiento consiguieron una serie de cepas con un contenido en ADN inferior a la cepa SAS56 sin tratar, incluso una de ellas solamente mostró una tercera parte del contenido de ADN con respecto a la cepa original, lo que les llevó a concluir que la cepa SAS56 es poliploide o quizás aneuploide. Cuando se comparó la cepa SAS405 con la de referencia, ésta presentaba 0.69 veces el contenido de ADN de

SAS56, lo que sugiere que debe ser diploide. Otras cepas de campo mostraron valores más altos e incluso más bajos que SAS56. Entre los mecanismos que explican la variabilidad están la heteroploidía descrita en hongos (Tolmsoff, 1983), el fallo de la mitosis o la fusión de núcleos asociada con la pérdida o ganancia de cromosomas. Según Covert (1998) la pérdida de cromosomas supernumerarios durante el crecimiento vegetativo puede ser otra causa de variación en el contenido de ADN. La aneuploidía, por su parte, también se ha tenido en cuenta a la hora de explicar el hecho de que, después de sucesivas transferencias monoconidiales, los cultivos monoascospóricos de *B. cinerea* pierden la constancia en sus características fenotípicas.

7. 2.- *Reproducción Sexual*

En la naturaleza, es muy poco frecuente encontrar apotecios de *B. cinerea*. Sin embargo, sí se han hallado esclerocios en regiones como Almería (Raposo *et al.*, 2001) e Israel (Yunis & Elad, 1989), donde las condiciones climáticas de veranos secos y templados son las que hacen poco probable encontrar apotecios. Las primeras aportaciones acerca del comportamiento sexual de *B. cinerea* se deben a Groves y Loveland (1953) quienes, después de numerosos cruzamientos concluyeron que éste es autoestéril, es decir, heterotálico. Años más tarde, Lorenz y Eichhorn (1983) detectaron algunos homotálicos entre un elevado número de cepas aisladas de vid en Alemania. Finalmente, en 1988, tras los numerosos cruzamientos realizados por Faretra *et al.*, se determinó que la compatibilidad en *B. cinerea* está controlada por un único gen con dos alelos, *MATI-1* y *MATI-2*, y que las cepas de *B. cinerea* eran heterotálicas.

Tras el cruzamiento de numerosas cepas aisladas de distintas partes del mundo con las cepas de referencia, SAS56 (*MATI-1*) y SAS405 (*MATI-2*), se comprobó que la mayoría eran heterotálicas y un bajo porcentaje funcionaron como homotálicas (*MATI-1/2*), dando lugar a apotecios fértiles cuando fueron cruzadas con ambas cepas de referencia (Beever & Parkes, 2003; Delcán & Melgarejo, 2002; Faretra & Pollastro, 1993; Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993). Además, se observó que el porcentaje de cepas *MATI-1* fue significativamente más alto que las *MATI-2*. Faretra *et al.* (1988) llegaron a la conclusión de que las cepas *MATI-1/2* (el 16 % de las cepas de su estudio) eran heterocarióticas para el gen de compatibilidad sexual. Del estudio de la

compatibilidad sexual de las ascosporas se dedujo que algunas de ellas (un 4-6% de la descendencia) eran homotálicas. En estos casos, dado que el núcleo de la ascospora proviene de un núcleo haploide, la heterocariosis no nos permite explicar el fenómeno del homotalismo. A partir del análisis de tétradas ordenadas, Faretra y Pollastro (1996) observaron que las ascosporas homotálicas ocupaban la posición esperada para una cepa *MAT1-2*, sugiriendo un fenómeno de modificación del alelo de compatibilidad sexual siempre en el caso de la cepa *MAT1-2*, lo que ha sido descrito en otros ascomicetos como *Sclerotinia trifoliorum* (Uhm & Fuji, 1983). Las bases moleculares que explican esta inestabilidad no son conocidas aún, pero los datos analizados en *B. cinerea* indican que en algunas ascas, 1 ó 2 de los núcleos meióticos son epigenéticamente modificados, lo que origina que tras la división mitótica se observe un micelio heterocariótico para el tipo de compatibilidad sexual.

7. 3.- *Elementos Genéticos Extracromosómicos*

En general en hongos y también en *B. cinerea*, existe una gran variedad de elementos extracromosómicos, entre los que se incluyen los cromosomas de las mitocondrias, virus, plásmidos y elementos transponibles. Mientras que las mitocondrias son claramente esenciales para el crecimiento, los otros elementos pueden ser considerados dispensables aunque sí pueden desempeñar una importante función en la evolución y en la variabilidad entre cepas.

7. 3. 1.- Mitocondrias y plásmidos mitocondriales

El ADN de las mitocondrias supone una fuente de variación genética adicional a la nuclear, siendo especialmente interesante cuando se buscan diferencias intra-especies en hongos. El genoma mitocondrial de los Ascomicetos es circular y hoy día se conoce la secuencia completa de varias especies, entre las que se encuentra *Neurospora crassa* (Griffiths *et al.*, 1995). En el caso de *B. cinerea* se conoce la existencia de un ADN mitocondrial circular de pequeño tamaño, 25.8 Kbp (Vallejo *et al.*, 1996) y un plásmido lineal mitocondrial de 2-3 Kbp (Hiratsuka *et al.*, 1987). En general, se considera que los plásmidos confieren selección frente al huésped y algunos, pueden estar asociados con la senescencia inducida (Griffiths, 1995).

7. 3. 2.- Elementos transponibles

Los elementos transponibles son elementos móviles de ADN presentes tanto en procariotas como eucariotas. En ambos casos, presentan características comunes como es la presencia de uno o más genes necesarios para su transposición, así como las secuencias específicas repetidas e invertidas una con respecto a la otra, en los extremos del elemento transponible.

Los elementos móviles de eucariotas cuya transposición depende de mecanismos de transcripción y de transcripción inversa se agrupan dentro de 2 clases: Clase I y Clase II. En los de Clase I, los elementos se transponen por transcripción de un ARN intermedio, mientras que los de Clase II, lo hacen a nivel de ADN mediante la escisión de un punto y posterior reintegración en otro.

Con el objetivo de estudiar la variabilidad genética en *B. cinerea*, se ha analizado la presencia de secuencias repetidas de ADN. En otros organismos, tales elementos, indican un alto grado de polimorfismo, debido en su mayor parte a la deriva genética y a procesos de reorganización (Dover, 1982)

En *B. cinerea* se han detectado dos elementos transponibles: ***Boty*** y ***Flipper***:

✓ ***Boty***

Boty es un elemento transponible de Clase I con un tamaño de 6 Kbp, caracterizado por la presencia de numerosas copias de repeticiones terminales largas (LTR) que se encuentran flanqueando un segmento central y repartidas por diferentes regiones del genoma. En la región interna de este elemento se ha identificado un marco de lectura que codifica para una retrotranscriptasa y para una ARNasa. Se han llegado a detectar hasta tres secuencias *Boty* en un mismo genoma (Diolez *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1999).

El grado de polimorfismo encontrado con el empleo de sondas *Boty*, es superior al detectado cuando se emplean sondas de genes ribosómicos en estudios de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Por tanto, el polimorfismo encontrado entre las secuencias *Boty* puede ser empleado como herramienta para estudios epidemiológicos, para determinar la variabilidad y diversidad de *B. cinerea* y para el análisis de las interacciones planta-patógeno.

✓ *Flipper*

Flipper es un elemento transponible de Clase II, cuya secuencia tiene una longitud de 1842 bp, con secuencias repetidas e invertidas en sus extremos y un marco abierto de lectura que codifica potencialmente para una transposasa. Se ha detectado insertado dentro de la región que codifica para el gen de la nitrato reductasa (*niaD*) (Levis *et al.*, 1997a). El número de copias de *Flipper* encontrado en distintas cepas de *B. cinerea* ha sido entre 0 y 20.

Al igual que *Boty*, *Flipper* puede ser usado para estudios de variabilidad, diversidad y patogenicidad.

Inicialmente fueron los métodos de hibridación ADN-ADN los empleados para detectar estos elementos, pero hoy día es posible usar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Muñoz *et al.*, 2002). En los primeros trabajos se encontraron sólo dos tipos de cepas, las que contenían los dos tipos de elementos, *transposa*, y las que carecían de ambos, *vacuma*. Sin embargo, pronto se descubrieron en Europa cepas que contenían solamente el elemento *Boty* o el elemento *Flipper* (Albertini *et al.*, 2002; De Miccolis *et al.*, 2004; Giraud *et al.*, 1999).

La cepa SAS405 presenta 9 copias de *Flipper*, las cuales se heredan siguiendo una segregación típicamente Mendeliana (Levis *et al.*, 1997a). Cada copia segrega independientemente, indicando que no están ligadas, y que el número de copias no varía durante el cruzamiento. Por tanto, es posible que *Flipper* se extienda rápidamente en la población siempre y cuando tenga lugar la reproducción sexual.

7. 3. 3.- *Micovirus*

Los micovirus son elementos intracelulares que están presentes tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Generalmente, su genoma está constituido por ARN de doble cadena empaquetado en una cubierta esférica o isométrica de naturaleza proteica. En la mayoría de los huéspedes parecen estar latentes ya que muchos hongos infectados por micovirus no presentan ningún síntoma, aunque se han dado casos donde se presentaba un claro fenotipo asociado con la presencia de virus. Este incluye el fenotipo “Killer” de *Saccharomyces cerevisiae* entre otros. Generalmente, se transmiten vía reproducción asexual.

Howitt *et al.* (1995) describieron que de 200 aislados de *B. cinerea*, un 70 % de ellos estaban infectados por ARN de doble cadena. Del análisis de los patrones electroforéticos se observó una enorme variabilidad entre los micovirus existentes en las cepas, tanto en número (1 a 8 bandas) como en tamaño (0.8 a 1.5 Kbp). Esta variabilidad puede ser debida a que las cepas hayan sufrido más de un tipo de infección, a la presencia de virus satélites o a que el micovirus haya sufrido deleciones.

Además, se han detectado 3 micovirus en *B. cinerea*, los cuales se han designado como L, M₁ y M₂, y tienen un tamaño de 8.3, 2.0 y 1.4 Kbp, respectivamente (Castro *et al.*, 1999; Vilches & Castillo, 1997). La visualización al microscopio óptico muestra la presencia de partículas víricas de un tamaño aproximado de 40 nm de diámetro. No han sido encontradas en el interior del núcleo, pero si se han detectado grupos de micovirus cerca de la membrana y también cerca del septo transversal, sugiriendo que estas partículas se transfieren de una célula a otra. Tampoco se han observado en el interior de las mitocondrias, ni en los cuerpos lipídicos.

Estos micovirus están formando agregados en el interior de vesículas membranosas constituidas por una simple o doble membrana. En aquellas células donde están presentes se ha detectado un cierto grado de degeneración celular, desapareciendo algunos orgánulos celulares y citoplasmáticos debido a un fenómeno de lisis interna, y es probable que la pared del hongo sea la que prevenga de la lisis de la célula. A parte de estas observaciones, no se ha evidenciado ningún otro fenotipo asociado a la

presencia de estos micovirus en las cepas. Los estudios de reproducción sexual (Beever & Weeds, 2004) indican que estos virus no pasan a la ascosporas.

También se han caracterizado y secuenciado dos micovirus de ARN de cadena simple en un aislado de *B. cinerea* (Howitt, 1998; 2001): Virus F de *Botrytis* (BVF) y Virus X de *Botrytis* (BVX). El genoma del virus F tiene un tamaño de 6827 nucleótidos y el virus X de 6966 nucleótidos, ambos con una cadena poly(A). Son dos virus significativamente diferentes a los ya existentes, por lo que han sido reconocidos como un nuevo género. Comparando el virus X con los virus de plantas, existe un 75 % de homología entre los aminoácidos de éste y el alexivirus *Garlic virus A* (Beever & Weeds, 2004), lo que apunta a una transferencia horizontal de genes entre las plantas (especialmente *Allium*) y *B. cinerea*.

La posibilidad de encontrar virus hipervirulentos para el huésped, lo que implicaría una reducción de la patogenicidad del hongo, ha despertado un enorme interés entre la comunidad científica, al poder usarlos en biocontrol. En el caso de *Sclerotinia* spp, existen ya varios virus y en *Botrytis*, se ha identificado uno recientemente (Castro *et al.*, 2001).

8.- Técnica de Electroforesis en Campo

Pulsante

La técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis) permite la separación de los cromosomas intactos, cuando se someten a un campo eléctrico pulsante en una matriz de agarosa. Los cromosomas migran a través de dicha matriz con una velocidad que depende de su tamaño y su estructura tridimensional, lo que se traduce en una resolución del genoma en bandas cromosómicas, denominada **cariotipo electroforético**. La electroforesis en campo pulsante proporciona, por tanto, una determinación tanto del número como del tamaño cromosómico.

El cariotipo electroforético se desarrolló por primera vez por Schawrtz y Cantor (1984), usando un PFGE que consistía en dos campos eléctricos alternativamente pulsantes (de los cuales al menos uno, no era homogéneo) y orientados perpendicularmente. El PFGE permitía la separación de moléculas de ADN con un tamaño máximo de dos Megabases en una matriz de agarosa. En el mejor de los casos, el ADN de las células lisadas de *Saccharomyces cerevisiae* se separaron en once bandas con distinta resolución, las cuales, mediante hibridación con sondas marcadas radiactivamente, se confirmaron que correspondían a cromosomas intactos. No obstante, en la técnica PFGE la migración de las moléculas de ADN es inestable a lo largo de las calles, lo que es debido a la falta de uniformidad del campo eléctrico a través del gel. Esto hace extremadamente difícil la comparación de la movilidad molecular entre líneas y, por tanto, la determinación del tamaño molecular. Con el objetivo de mejorar este problema, se ampliaron numerosas alternativas de configuración. Carle y Olson (1984) desarrollaron una técnica llamada **electroforesis en campo ortogonal alternante** (OFAGE, Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis), en la que los dos campos eléctricos aplicados no eran homogéneos, produciendo una migración más constante del ADN entre carriles adyacentes. Sin embargo, debido a que el ángulo entre los dos campos eléctricos variaba de la parte superior a la inferior del gel, las moléculas migraban con distinta proporción en diferentes zonas, es decir las moléculas en los carriles presentaban cierta curvatura. Vistos los resultados, ambos investigadores desarrollaron una nueva técnica denominada **electroforesis por inversión de campo** (FIGE, Field-inversion gel electrophoresis) (Carle *et al.*, 1986). En este caso, cambiaron los dos campos eléctricos aplicados, por un solo campo, el cual se invertía periódicamente, siendo el pulso de avance más prolongado que el de retroceso, produciéndose una migración neta en el sentido de avance. Este sistema produce una huella perfectamente derecha del movimiento del ADN y permite resolver fragmentos de ADN de más de 2 Mbp.

A pesar del importante adelanto que supusieron estos métodos respecto a PFGE, la falta de uniformidad del campo eléctrico entre todos los carriles dificultaba la lectura comparativa de éstos. Como consecuencia se desarrollaron métodos aún más sofisticados y resolutivos. Entre ellos, la **electroforesis en campo eléctrico homogéneo** (CHEF, Contour-clamped homogeneous electric field) y la **electroforesis en campo**

transverso alternante (TAFE, Transverse alternating-field electrophoresis), que fueron descritos al mismo tiempo.

En el sistema CHEF (Chu *et al.*, 1986) el campo eléctrico es generado por veinticuatro electrodos orientados alrededor de un gel horizontal, con una disposición hexagonal o cuadrada. El contorno de electrodos genera un campo orientado en ángulo recto en el caso de la disposición cuadrada y un campo de 120° o 60° para la hexagonal. Este sistema permite resolver moléculas de un tamaño de 10 Mbp, lo que supone una ventaja frente a FIGE. La dinámica de migración del ADN en este sistema es muy compleja y ha sido caracterizada por Vollrath y Davis (1987), quienes definen cuatro regiones de separación:

- *Región 1*: área de buena resolución donde se encuentran las moléculas más pequeñas y cuya definición parece ser función lineal del tamaño molecular.
- *Región 2*: área cercana a la zona media del gel y caracterizada por una pobre resolución.
- *Región 3*: correspondiente con otra zona de buena resolución, donde tamaño y movilidad vuelven a ser directamente proporcionales.
- *Región 4*: área donde se encuentran las moléculas de mayor tamaño. Se caracteriza por su baja resolución.

El sistema TAFE se basa en una distribución de electrodos tal que, el campo eléctrico aplicado, se encuentra orientado transversalmente a un gel vertical. Durante la electroforesis, las moléculas de ADN recorren el gel tridimensionalmente. Como resultado, los carriles que se obtienen son rectos.

Por último el sistema más sofisticado, el caso de la **electroforesis con electrodos controlados automáticamente** (PACE, Programmable autonomously controlled electrode gel electrophoresis). Este está constituido, al igual que el sistema CHEF, por un hexágono de veinticuatro electrodos, pero cada electrodo está controlado

de manera individual. De este modo, es posible generar un número ilimitado de condiciones electroforéticas, referidas tanto a la fuerza del campo eléctrico, como a la reorientación de los ángulos y los tiempos de pulso. PACE se convierte así, en uno de los modelos electroforéticos más interesantes, aunque hoy por hoy su fabricación resulta demasiado costosa. Schwartz *et al.* desarrollaron en 1989, un sistema más económico alternativo al PACE, llamado simplemente **aparato de electroforesis** (ED, Electrophoresis device). DE posee un diseño sencillo y, por lo tanto, de bajo coste, permite variar, de un modo más o menos flexible, la fuerza del campo eléctrico y la reorientación del ángulo. ED ha dado muy buenos resultados en la resolución de cariotipos de levaduras como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*.

Independientemente del sistema utilizado, las electroforesis suelen ser de larga duración en el caso de hongos, ya que el voltaje debe mantenerse bajo, pues un alto voltaje podría romper los cromosomas de gran tamaño. Aún así, la aplicación de la electroforesis en campo pulsante (PFGE) es una herramienta muy valiosa para analizar genomas fúngicos. Esta técnica permite, además, la asignación de genes a cromosomas particulares, lo que ha sido de especial utilidad en aquellas especies en las que no existen estudios de genética clásica sobre grupos de ligamiento. También ha servido para la elaboración de mapas de restricción de fragmentos muy grandes de ADN e incluso de cromosomas enteros.

8. 1.- *Cariotipo Electroforético*

Tradicionalmente para estudiar los cromosomas se ha utilizado la **citogenética clásica**, la cual se fundamenta en la observación y clasificación de los cromosomas durante el estadio de metafase del ciclo de división celular, y la disposición del centrómero. Esta técnica ha sido empleada para la determinación de la ploidía y caracterización de cromosomas en hongos, aunque su utilidad ha sido limitada por el reducido tamaño de sus cromosomas.

En 1989, Shirane *et al.*, empleando el método *de rotura del tubo germinativo* (GTBM), obtuvieron el cariotipo citogenético de *B. cinerea*, describiendo 16 cromosomas en metafase. Además, observaron la presencia de una estructura inusual,

similar a una hebra fina, en algunos cromosomas. Sin embargo, no lograron establecer la disposición de los centrómeros, ni los brazos de los cromosomas. Años más tarde, Faretra y Grindle (1992) también definieron 16 cromosomas en las ascas en desarrollo de *Bt. fuckeliana*.

La aplicación de la electroforesis en campo pulsante ha aportado un instrumento importante para el estudio de cromosomas de hongos, favoreciendo la resolución de cromosomas intactos de pequeño tamaño, con más exactitud que los métodos clásicos y revelando el cariotipo electroforético (EK) en un gran número de especies de hongos (Tabla 2).

El análisis del cariotipo electroforético en *B. cinerea* ha revelado una media de 13 bandas de gran tamaño, en el rango de 3.7 a 1.8 Mbp y 3 bandas en el rango de tamaño de 220 a 580 Kbp, correspondientes a los minicromosomas y al ADN mitocondrial (Faretra & Pollastro, 1996; Rebordinos *et al.*, 1997; Vallejo *et al.*, 1996; van Kan *et al.*, 1993). El mayor tamaño del genoma que se ha determinado, es de 33.9-39.7 Mbp, calculado por van Kan *et al.* (1993), quienes consideran como doble cada banda que aparece con mayor intensidad en el cariotipo. Con esta consideración, el número de cromosomas se establece entre 12-14, valor que se asemeja a los resultados obtenidos mediante cariotipo citogenético (16 cromosomas).

8. 2.- *Polimorfismo Cromosómico*

La aplicación de la electroforesis en campo pulsante ha permitido, además de obtener el cariotipo electroforético, identificar el polimorfismo en la longitud de los cromosomas (CLP), que en la práctica representa la diversidad de los cromosomas y que se ha denominado “**polimorfismo cromosómico**”.

La aparición de variaciones en el tamaño de los cromosomas es frecuente en los hongos que carecen de un ciclo sexual. Apoyados en esta premisa, Kistler y Miao (1992) plantearon la hipótesis de que los polimorfismos cromosómicos están en relación inversa a la frecuencia con que se dan en los hongos los fenómenos sexuales. Para ello, los autores se basan en la fuerte selección que produce la meiosis contra las

aberraciones cromosómicas entre los dos parentales. Sin embargo, el hecho de observar polimorfismo cromosómico intra-especie en hongos con reproducción asexual y sexual, pone de manifiesto que los mecanismos involucrados en el CLP no están completamente esclarecidos (Fierro & Martín, 1999; Zolan, 1995).

ORGANISMOS	NC	Referencias
<i>Aspergillus nidulans</i>	8	(Brody & Carbon, 1989)
<i>Aspergillus niger</i>	8	(Debets <i>et al.</i> , 1990)
<i>Beauveria bassiana</i>	5-8	(Viaud <i>et al.</i> , 1996)
<i>Candida albicans</i>	7	(Magee & Magee, 1987)
<i>Claviceps purpurea</i>	3-6	(Hüsgen <i>et al.</i> , 1999)
<i>Fusarium oxysporum</i>	9-14	(Boehm <i>et al.</i> , 1993)
<i>Histoplasma capsalatum</i>	6-7	(Romero-Martínez <i>et al.</i> , 2004)
<i>Magnaporthe grisea</i>	7	http://www.broad.mit.edu
<i>Mucor circinelloides</i>	8-9	(Díaz-Mínguez <i>et al.</i> , 1999)
<i>Neurospora crassa</i>	7	(Galagan <i>et al.</i> , 2003)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	4	(Nogueira-Cano <i>et al.</i> , 1998)
<i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>P. notatum</i>	4	(Fierro <i>et al.</i> , 1993)
<i>Penicillium janthinellum</i>	8	(Kayser & Schulz, 1991)
<i>Penicillium nalgioiensen</i>	4	(Färber & Geisen, 2000)
<i>Penicillium paxilli</i>	8	(Young <i>et al.</i> , 1998)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	5	(Chávez <i>et al.</i> , 2001)
<i>Podospora anserina</i>	7	http://podospora.igmors.u-psud.fr
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	(Chu <i>et al.</i> , 1986)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3	(Smith <i>et al.</i> , 1987)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16	(Fraissinet-Tachet <i>et al.</i> , 1996)
<i>Ustilago maydis</i>	20	(Kinscherf & Leong, 1988)
<i>Verticillium dahliae</i>	6-7	(Pantou & Typas, 2005)

Tabla 2. Cariotipo electroforético de diversos hongos. NC: N° de Cromosomas

El polimorfismo cromosómico se ha descrito en un gran número de hongos como *Beauveria bassiana* (Viaud *et al.*, 1996), *Claviceps purpurea* (Hüsgen *et al.*, 1999), *Histoplasma capsulatum* (Romero-Martínez *et al.*, 2004), *Fusarium oysporum* (Boehm *et al.*, 1993), *Penicillium notatum* y *P. chrysogenum* (Fierro *et al.*, 1993).

En *B. cinerea*, la existencia de polimorfismo cromosómico fue demostrada por van Kan *et al.* (1993) y Vallejo *et al.* (1996). Estos últimos autores estudiando, mediante electroforesis en campo eléctrico homogéneo (CHEF), 5 cepas aisladas de diferentes huéspedes y regiones geográficas, observaron que cada una de ellas presentaban un cariotipo electroforético diferente. Estos mismos resultados fueron obtenidos posteriormente, al ampliar el número de cepas estudiadas (Rebordinos *et al.*, 1997).

8. 3.- *Minicromosomas o Cromosomas B*

El desarrollo de la técnica de electroforesis en campo pulsante, desde mediados de los ochenta, ha permitido determinar, a pesar de su pequeño tamaño, la presencia de cromosomas “extras” en numerosos hongos filamentosos, los cuales se encuentran presente sólo en algunos individuos de la especie. Para designar a estos cromosomas adicionales se han usado 4 términos diferentes (Covert, 1998): *Cromosomas B*, *Cromosomas Supernumerarios*, *Cromosomas Dispensable* y *Minicromosomas*, lo que ha supuesto una gran confusión.

- *Cromosomas B* es un término antiguo, que se ha empleado para designar a cromosomas “extras” en plantas, animales y hongos. Se definieron como cromosomas prescindibles, los cuales no recombinan con ningún cromosoma básico (cromosoma A) y que no presentan una segregación típicamente mendeliana. Únicamente pueden ser detectados por observación directa, debido a que su presencia no se traduce en ningún fenotipo concreto. Este término ha dejado de emplearse por dos razones, i) no todos los hongos filamentosos se reproducen sexualmente, lo que hace imposible determinar si estos cromosomas tienen herencia mendeliana y ii) que en algunos

cromosomas “extras” de hongos, se han detectado genes que codifican para fenotipos cuantificables.

- ***Cromosomas Supernumerarios*** es un término empleado desde 1906 para referirse a una característica concreta de los cromosomas B. Se denominan cromosomas supernumerarios aquellos que están compuestos por ADN que no está presente en todos los aislados de una especie y que además, pueden contener genes funcionales y genes que están implicados en la interacción huésped-patógeno.
- ***Cromosomas Dispensables (CDs)*** se emplea para definir aquellos cromosomas que no están presentes en todos los aislados de la especie, ni traslocados en otro sitio del genoma y cuya presencia no es indispensable para el crecimiento del hongo aunque le confiere algunas ventajas adaptativas a ciertos hábitats.
- ***Minicromosomas*** es el término que se ha empleado para describir a diferentes tipos de elementos genéticos en hongos. En el caso de *S. cerevisiae* se ha utilizado este vocablo para referirse a los plásmidos circulares (Roth & Simpson, 1991). En hongos filamentosos, los minicromosomas se usan para designar a cromosomas lineales y de pequeño tamaño (< 2 Mbp) del cariotipo electroforético. Esta definición implica que la manera de diferenciar a un cromosoma de este tipo de los anteriores, es sólo por el tamaño que posee y no por un criterio biológico. Este criterio de clasificación, ha llevado a que en algunas ocasiones en hongos filamentosos se denomine minicromosomas a cromosomas supernumerarios.

Hoy día se conoce la existencia de cromosomas supernumerarios en numerosos géneros de hongos filamentosos (Covert, 1998), como por ejemplo *Aspergillus nidulans*, *Cochliobolus carbonum*, *Cochliobolus heterosporioides*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Giberella fujikuroi* y *Netria haematococca*, entre otros.

Han *et al.* (2001) descubrieron, en *Nectria haematococca*, que los genes de virulencia que determinan su patogenicidad en plantas se encuentran agrupados en un cromosoma dispensable de 1,6 Mbp. En el fitopatógeno *Alternaria alternata* los genes *AKT* que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de una toxina relacionada con su patogenicidad, se encuentran en un cromosoma dispensable de 1.05 Mbp. Cepas mutantes que carecen de este cromosoma pierden su patogenicidad y conservan la habilidad de subsistir en la naturaleza (Hatta *et al.*, 2002).

En 1996, Faretra & Pollastro demostraron la presencia de minicromosomas en *B. cinerea*, los cuales mostraron una gran variabilidad en cuanto a tamaño. A veces no aparecían y presentaban una segregación anómala durante la meiosis, lo que indica que son cromosomas supernumerarios.

8. 4.- Mapeo de Genes

La combinación de la técnica de electroforesis en campo pulsante con la hibridación con sondas específicas, ha servido para revelar la presencia de cromosomas individuales, además de determinar la ubicación de genes dentro del cromosoma.

Las bandas cromosómicas obtenidas por PFGE incluso se pueden utilizar como sondas específicas. En 1993, van Kan *et al.* resolvieron los cromosomas de 5 cepas de *B. cinerea* mediante CHEF en nueve bandas. Estas se utilizaron entonces como sondas específicas para una sexta cepa del hongo, poniéndose de manifiesto la enorme variabilidad genética de la población.

Santos *et al.* (2001) identificaron dos copias del gen *gdhA*, gen que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa dependientes de NADP, localizadas a nivel cromosómico y mitocondrial. La localización cromosómica del gen en las siete cepas estudiadas de *B. cinerea*, aisladas de diferentes huéspedes y con diferente nivel de patogenicidad, aparece en la banda que presenta un tamaño aproximado de 2 Mbp.

9.- Los Telómeros

Los telómeros son estructuras cromatínicas especializadas que forman los extremos de los cromosomas eucariotas y que representan estructuras esenciales para las células, pues evitan la fusión cromosómica, desempeñan un importante papel en mantener la estabilidad cromosómica (Pommier *et al.*, 1995) y participan tanto en la meiosis como en la mitosis (Kirk *et al.*, 1997).

La estructura de los telómeros fue identificada por H. J. Muller durante la década de los años 30. Desde entonces, se ha profundizado extraordinariamente en su conocimiento, gracias a la introducción de las técnicas de Biología Molecular.

En casi todos los eucariotas estudiados (ciliados, levaduras, hongos filamentosos, plantas y mamíferos), la estructura del telómero no se ajusta a una secuencia consenso específica, sino que consiste en repeticiones en tandem de pequeñas secuencias nucleotídicas con una distribución asimétrica de los pares guanina: citosina, acumulándose la guanina en una de las hebras (hebra G). Esta hebra está orientada del extremo 5' a 3', no estando apareada en la zona más extrema, lo que origina un segmento final monofibrilar, con una longitud que varía según la especie. El extremo monofibrilar puede formar estructuras de tipo secundario y además, puede servir para la unión a proteínas. La longitud del telómero es variable, mostrando cada organismo una longitud media característica. En algunos organismos la longitud promedio responde a cambios genéticos o nutricionales.

Entre las funciones que se le atribuyen a los telómeros, la más notoria es la de servir como un reloj mitótico que mide y regula el número de divisiones celulares. Los telómeros se acortan con cada división celular y el número de divisiones que la célula puede experimentar se correlaciona con la longitud de los telómeros. Este acortamiento daría lugar a la pérdida de información genética e impediría la multiplicación celular, por ello es indispensable que los telómeros sean replicados completamente. Muchos eucariotas han desarrollado un mecanismo basado en la acción de la enzima telomerasa, una ribonucleoproteína, que extiende la hebra monofibrilar mediante la adición de repeticiones de secuencias usando como molde un ARN denominado ARN

telomerástico. La replicación de la otra hebra tiene lugar por el sistema convencional de las polimerasas

Las secuencias de ADN telomérico mejor caracterizadas son las que se muestran en la tabla 3. En general, son secuencias cortas y precisas, aunque hay excepciones como es el caso de *S. cerevisiae* cuyos telómeros presentan secuencias heterogéneas o *Kluyveromyces* quien posee telómeros muy largos. No obstante, aunque las secuencias teloméricas varían entre las especies, la función de los telómeros es muy similar entre los eucariotas. En *B. cinerea* la secuencia telomérica, aisladas por Levis *et al.* (1997b) consiste en repeticiones de la secuencia TTAGGG, al igual que otros hongos filamentosos.

Organismos	Secuencia
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG
<i>Giardia</i>	TAGGG
<i>Physarum</i>	TTAGGG
<i>Kluyveromyces</i>	TCGGATTTGATTAGGTATGTGGTGT
<i>Neurospora</i>	TTAGGG
<i>Caenorhabditis</i>	TTAGGG
Vertebrados	TTAGGG

Tabla 3. Secuencias del ADN telomérico

La técnica de electroforesis en campo pulsante ha permitido obtener el número y tamaño de los cromosomas de numerosos géneros de hongos. Sin embargo, no siempre es posible debido a la dificultad que entraña la obtención de los protoplastos. En estos casos la técnica de *telomeric fingerprinting* permite estimar el número de cromosomas, sin necesidad de formación de los protoplastos. Este método está basado en la detección del número de telómeros presentes en el organismo mediante la hibridación de los RFLP del hongo con una sonda de ADN telomérico. La aplicación de esta técnica ha permitido determinar el número de cromosomas en *Magnaporthe grisea* (Farman & Leong, 1995), *Beauveria bassiana* (Padmavathi *et al.*, 2003; Viaud *et al.*, 1996),

Aspergillus nidulans (Bhattacharyya & Blackburn, 1997), *Colletotrichum lindemuthianum* (O'Sullivan *et al.*, 1998), *Metarhizium flavoviride* (Inglis *et al.*, 1999), *Rosellinia necatrix* (Aimi *et al.*, 2002) y *Helicobasidium mompa* (Aimi *et al.*, 2003). En estos casos la aplicación del *telomeric fingerprinting* ha permitido estimar el número de cromosomas de la especie y la variabilidad existente.

Además, la capacidad de la técnica de *telomeric fingerprinting* para poder asignar a una cepa concreta un patrón o huella exclusiva, hacen de ella una poderosa herramienta para la tipificación de cepas (Inglis *et al.*, 2005a; Padmavathi *et al.*, 2003), el diagnóstico y seguimiento de enfermedades causadas por hongos (Levis *et al.*, 1997b), parásitos (Bishop *et al.*, 1996) e incluso enfermedades proliferativas, especialmente el cáncer.

Objetivos

1.- Objetivos del Trabajo

La importancia de los daños causados por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, su amplia distribución y el elevado número de cultivos al que afecta, han obligado a ir desarrollando numerosos estudios fisiológicos, bioquímicos, epidemiológicos, genéticos, etc., con el fin de conocer los mecanismos que el hongo desarrolla durante el proceso de infección.

Los conidios son las estructuras que más frecuentemente se encuentran en la naturaleza. Tras el aislamiento y crecimiento de éstos en medios sintéticos han mostrado una gran variabilidad fenotípica, tanto en morfología como en producción de enzimas, patogenicidad o resistencia a fungicidas. El aislamiento sucesivo de conidios de *B. cinerea* producidos *in vitro*, ha dado lugar al establecimiento de cepas de laboratorio cuya eficacia biológica, considerada en términos de competitividad con la micobiota presente en la viña es desconocida. Además de esta variabilidad fenotípica, las técnicas moleculares han desvelado la existencia de variabilidad genotípica en *B. cinerea*. No obstante, dada la baja frecuencia con la que se han observado los apotecios en el campo, se ha pensado que la reproducción sexual no es el proceso involucrado en dicha variación.

Por todo ello, los objetivos planteados al comienzo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la competitividad de *Botrytis cinerea* en viñedos del marco vitivinícola de Jerez. Para alcanzar este objetivo fue necesario:
 - 1.1. Determinar la población de hongos filamentosos presentes en la vid
 - 1.2. Inocular la viña con una cepa de laboratorio de *B. cinerea*
 - 1.3. Analizar el efecto que tiene la inoculación de la cepa de laboratorio sobre las cepas silvestres y sobre el resto de la micobiota fúngica.

2. Analizar la patogenicidad de *B. cinerea* así como estudiar el control genético de este carácter. Para ello se tuvo que:
 - 2.1. Realizar diversos cruzamientos sexuales entre cepas de *B. cinerea*, sexualmente compatibles
 - 2.2. Obtener un número elevado de ascosporas
 - 2.3. Estudiar la capacidad infectiva que posee cada una de las cepas monoascospóricas, mediante la realización de bioensayos de patogenicidad.

3. Caracterizar molecularmente un elevado número de cepas de *B. cinerea* y evaluar el efecto de la reproducción sexual en la variabilidad genética del patógeno. Para ello se realizó:
 - 3.1. La determinación del cariotipo electroforético de las cepas de *B. cinerea* aisladas de campo y de los descendientes de dos cruzamientos
 - 3.2. El estudio de la segregación de cada una de las bandas cromosómicas resueltas
 - 3.3. La hibridación de los geles de campo pulsante con una sonda de ADN telomérico
 - 3.4. La localización del ADN ribosómico en los cariotipos electroforéticos

4. Estimar del número de cromosomas y estudiar la variabilidad entre distintas cepas de *B. cinerea*, mediante la hibridación de los RFLP con una sonda de ADN telomérico. Para ello se planteó:
 - 4.1. El aislamiento del ADN genómico de *B. cinerea*
 - 4.2. La digestión del ADN del hongo con diversas enzimas de restricción
 - 4.3. La hibridación de los RFLPs con una sonda de ADN telomérico previamente marcada

Material y Métodos

1.- *Microorganismos Empleados*

1. 1.- *Cepas Fúngicas*

✓ *Botrytis cinerea* UCA991

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) en Málaga (1991), y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cádiz (UCA).

✓ *Botrytis cinerea* UCA992:

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) infectadas en los viñedos de las Bodegas Domecq (Jerez de la Frontera, Cádiz, 1992) y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ *Botrytis cinerea* UCA993:

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) infectadas en viñas de las Bodegas Osborne (Puerto de Santa María, Cádiz, 1993) y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ *Botrytis cinerea* UCA994:

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) en Alicante (1994) y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ *Botrytis cinerea* UCA995:

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) en León (1993) y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ ***Botrytis cinerea* UCA996:**

Cepa aislada de pepino (*Cucumis sativus*) en Almería (1996) y purificada en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ ***Botrytis cinerea* UCA101, *B. cinerea* UCA103, *B. cinerea* UCA105, *B. cinerea* UCA107, *B. cinerea* UCA108, *B. cinerea* UCA109, *B. cinerea* UCA110, *B. cinerea* UCA113, *B. cinerea* UCA114:**

Cepas aisladas de fresa (*Fragaria vesca*) en Huelva (1997) y purificadas en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ ***Botrytis cinerea* UCA102, *B. cinerea* UCA104, *B. cinerea* UCA106, *B. cinerea* UCA111, *B. cinerea* UCA112:**

Cepas aislada de fresa (*Fragaria vesca*) en Huelva (1998) y purificadas en el Laboratorio de Microbiología de la UCA.

✓ ***Botrytis cinerea* 2100:**

Cepa aislada de haba (*Vicia faba*), 1979. Cedida por la Colección Española de Cultivos Tipo.

✓ ***Botrytis cinerea* 2850:**

Cepa aislada del bulbo del azafrán (*Crocus sativa*), 1987. Cedida por la Colección Española de Cultivos Tipo.

✓ ***Botrytis cinerea* SAS56**

Progenie ascospórica de cepas aisladas de uvas (*Vitis* sp.). Cedida por el Dr. Faretra de la Universidad de Bari (Italia, 1987).

✓ ***Botrytis cinerea* SAS405:**

Progenie ascospórica de cepas aisladas de uvas (*Vitis* sp.). Cedida por el Dr. Faretra de la Universidad de Bari (Italia, 1987).

✓ ***Botrytis cinerea* T4:**

Cepa aislada de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en Avignon (Francia). Cedida por la Dra. Kunz de la Universidad Pierre & Marie Curie (Paris, Francia).

✓ ***Botrytis cinerea* Bd90:**

Cepa aislada de uvas (*Vitis vinifera*) en Burdeos (Francia). Cedida por la Dra. Kunz de la Universidad Pierre & Marie Curie (Paris, Francia).

1. 2.- Cepa Bacteriana

✓ ***Escherichia coli* JM109:**

Cepa cuyo plásmido pBR322 contiene a los genes y los espaciadores del ADN ribosómico 18S-5.8S-28S de *Drosophila melanogaster* (Roiha *et al.*, 1981).

2.- Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo empleados para el crecimiento y esporulación del hongo y descritos a continuación, fueron esterilizados en autoclave (Autotester-G. P Selecta) a 126 °C durante 20 minutos. En los casos en que el medio se requería en estado sólido, se empleó como espesante, agar al 2 %.

□ **Medio Agar Malta**

Medio empleado para el crecimiento y esporulación del hongo.

Extracto de malta	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

□ **Medio PDA**

Medio para el mantenimiento y esporulación.

Patata peptona	4 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1 L
pH 5.6	

□ **Medio Agar Agua**

Medio utilizado para el aislamiento de los conidios y la extensión de las ascosporas.

Agar	20 g
Agua destilada	1 L

□ **Medio Czapeck-Dox**

Medio líquido empleado en la obtención de protoplastos y la extracción de ADN.

Glucosa	40 g
Extracto de levadura	1 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01 g
Agua destilada	1 L
pH 6.0-6.5	

□ Medio Vogel

Medio empleado para suspender los conidios utilizados en los bioensayos de patogenicidad. Este medio se suplementó con tampón fosfato 10 mM y sacarosa 10 mM.

Sacarosa	15 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O	3 g
K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.1 g
NH ₄ NO ₃	2 g
Agua destilada	1 L
pH 6.0	

□ Medio LB

Medio para el crecimiento de *E. coli*.

Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	1 g
Agua destilada	1 L
pH 7.0	

3.- Crecimiento de los *Microorganismos*

3. 1.- *Crecimiento de Botrytis cinerea*

Para el crecimiento de las distintas cepas de *B. cinerea* se sembraron en los medios sólidos indicados en el apartado anterior, 20 µL de una suspensión de conidios (1x10⁷ esporas/ mL), o bien, por contacto de un asa de siembra cargada con esporas. A continuación, se extendieron con ayuda de una espátula de vidrio estéril y se incubaron a temperatura constante de 21 ± 1 °C en una cámara durante 7 a 9 días, poniéndose de manifiesto un crecimiento radial que cubría toda la placa. Para que el hongo emitiera sus esporas, en casi todos los casos, fue suficiente con mantener las placas durante un periodo de tiempo de 10 a 15 días.

Para mantener el crecimiento del hongo se pueden seguir dos vías: la transferencia periódica de una porción de agar con micelio crecido a placas con medio fresco o la siembra de conidios. En ambos casos, el cultivo se mantuvo en condiciones de temperatura constante (21 ± 1 °C).

3. 2.- *Crecimiento de Escherichia coli*

Cuando se parte de viales congelados, los cultivos se regeneraron en placas Petri con medio LB sólido sembrando por el método de estrías, con el fin de obtener colonias.

Para conseguir un cultivo con alta densidad de bacterias, se siembran en medio líquido LB, inoculado a partir de colonias aisladas de placa Petri, y se incuba a 37 °C, con agitación orbital suave durante una noche.

4.- *Mantenimiento y Conservación*

4. 1.- *Botrytis cinerea*

La emisión de los conidios es la que permite la conservación del hongo, la cual se realiza siguiendo los siguientes pasos:

1. Se vierte NaCl al 0.9 % sobre la placa con conidios y con ayuda de una espátula de vidrio, previamente estéril, que es arrastrada sobre la superficie de la misma, se liberan de los conidióforos
2. La suspensión obtenida, se filtra a través de un filtro de nylon de 30 µm de diámetro de poro (Nytal, Maissa, Barcelona)
3. El filtrado se centrifuga a 5000 r.p.m. (Centrífuga de baja velocidad. Sigma2-15) durante 5 minutos
4. Se resuspende el precipitado en glicerol al 10 % y se almacenan a -80 °C

Otras estructuras que interesa conservar son los apotecios y los esclerocios, las cuales se mantienen en glicerol al 10 % y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. 2.- *Escherichia coli*

La cepa pudo conservarse, manteniendo las placas de Petri selladas con ParafilmTM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de un mes, o bien en una solución de glicerol al 35 % y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando fue necesaria la siembra de nuevas placas, ésta se realizó preferentemente a partir de los viales congelados con glicerol, evitando realizar subcultivos en medio sólido.

5.- Procedimiento Seguido para la Realización de Cruzamientos entre Cepas de *B. cinerea*

Se realizaron cruzamientos recíprocos entre cepas de grupo de compatibilidad sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*), siguiendo la técnica propuesta por Faretra *et al.* (1988b).

Los pasos seguidos fueron los siguientes:

5. 1.- Producción de Esclerocios y Microconidios

1. Se transfieren pequeñas porciones de agar con micelio en crecimiento a placas Petri con medio fresco agar malta y se incuban a $21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 ó 4 días
2. Las placas se incuban en oscuridad durante 30 días, a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. A continuación, se incuban a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un período de 30 días, tiempo requerido para romper la dormancia de los esclerocios
4. Los esclerocios se transfieren asépticamente a tubos de vidrio que contienen 9 mL de agua destilada estéril y éstos se taponan con algodón

graso. Los tubos se mantienen en hielo hasta el momento de espermatar los esclerocios. En cada tubo se introducen de 15 a 20 esclerocios, dependiendo del tamaño de los mismos.

5. 2.- *Espermatización*

1. Sobre placas Petri donde crece *B. cinerea*, se vierten 5 mL de agua destilada estéril.
2. Con la ayuda de un asa de cultivo estéril, que es arrastrada sobre la superficie de la placa, se liberan los microconidios.
3. La suspensión de microconidios se filtra a través de un filtro de nylon de 10 μm de diámetro de poro (Nytal, Maissa, Barcelona) y se recogen en un matraz.
4. Se toman alícuotas de 3 mL y se reparten en los tubos donde se encuentran los esclerocios.

5. 3.- *Germinación Carpogenética*

Los tubos se colocan horizontalmente, para cuyo efecto tienen una constricción de aproximadamente 1 cm de alto y a 5 cm de la boca, que permite mantenerlos en posición horizontal sin que el agua alcance el tapón. Estos se mantienen en una cámara refrigeradora a 11 ± 1 °C y se someten a un fotoperiodo de 12 horas.

Los esclerocios deben quedar esparcidos por el tubo, formando una capa, de manera que todos tengan acceso a la luz de igual manera. En estas condiciones se mantienen como mínimo 2 meses y como máximo 7 meses.

6.- Protocolo para la Obtención de las *Ascosporas*

Si la fecundación ha sido fructífera se habrán formado los apotecios y por consiguiente, se podrán obtener las ascosporas, objeto de nuestro estudio. Para la producción de las ascosporas se sigue el método descrito por Faretra y Pollastro (1992):

1. En una placa estéril vacía, se coloca un apotecio y con ayuda de una hoja de bisturí estéril se corta una pequeña porción del tecio. Esta sección se introduce en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Alemania), donde se añade agua destilada estéril
2. Con ayuda de un asa de cultivo y del vórtex se lleva a cabo la rotura de las ascas y consecuente salida de las ascosporas
3. En una placa con Agar Agua se realiza una extensión de las ascosporas, tal que la distancia entre las mismas sea lo suficientemente lejana como para que puedan germinar y no haya cruzamiento entre sus tubos germinativos
4. Se incuban las placas a 21 °C durante 24 horas, para permitir la germinación de las ascosporas
5. Se observa al microscopio óptico si el tubo germinativo de cada ascospora ha alcanzado la longitud adecuada para poder aislarlas.
6. Se procede a la extracción de las ascosporas con su tubo germinativo utilizando una lanceta y bajo la luz de la lupa binocular. Se transfieren a placas Petri con medio fresco de Agar malta, traspasándose una ascospora por cada placa, de manera que se obtienen cultivos monoascospóricos.

En la presente memoria se han empleado individuos descendientes de los cruzamientos ♀(SAS405) × ♂(UCA993) y ♀(SAS56) × ♂(UCA992), y no de los cruzamientos recíprocos debido a la imposibilidad de las cepas *B. cinerea* UCA992 y *B. cinerea* UCA993 de producir esclerocios. La nomenclatura seguida para diferenciarlos ha sido: UCA992- X y UCA993- X para los cruzamientos SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993, respectivamente.

7.- Seguimiento de las Poblaciones de Hongos Filamentosos en la Vid

Para realizar el estudio de la poblaciones de hongos en vid, se seleccionaron dos parcelas de vid, *Vitis vinifera*, variedad Palomino pertenecientes a dos bodegas del marco de Jerez, a las que denominamos Parcela A y Parcela B. Cada parcela de trabajo constaba de 31 liños y cada liño de 50 cepas de vid. Los liños se dividen en dos grupos (Fig. 11): i) liños sanos empleados como control (Lc), ii) liños pinchados, para favorecer la infección, e inoculados (Li), y un liño barrera (B) intercalado entre ambos para evitar la propagación del inóculo desde el liño inoculado al control.

7. 1.- Toma de Muestra

El muestreo se realizó durante el mes de agosto de los años 2000 y 2001, tomándose muestras en dos tiempos: antes de la inoculación (to), recolectándose aleatoriamente dos racimos de uva completos en cada liño control [Lc (to)]; y al final del experimento (tf), una vez transcurridos 15 días post-inoculación (dpi), recogiendo dos racimos de uva completos en cada liño control [Lc(tf)] y otros dos racimos de uva completos en cada liño inoculado [Li(tf)].

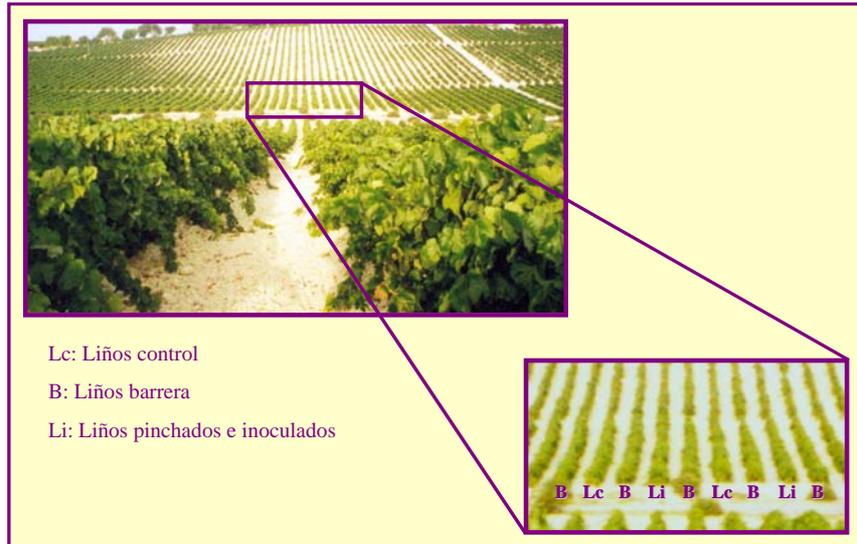


Figura 11. Esquema de la distribución de los liños de vid en las dos parcelas de trabajo

7. 2.- Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio, se pesaron los racimos de uva y se lavó la superficie de cada grano con una solución de NaCl (0.9 %) estéril. A continuación, el volumen total de lavado se concentró por centrifugación a 5000 r.p.m. (Centrífuga de baja velocidad. Sigma2-15) durante 5 minutos.

A continuación, se realizó la siembra de una serie de diluciones sucesivas de la solución concentrada en placas Petri con medio Agar Agua y se incubaron a 21 ± 1 °C durante 24 horas.

Transcurridas 24 horas, cada colonia de hongo filamentoso se transfirió a una placa Petri con medio agar malta y se incubó a 21 ± 1 °C entre 7 y 15 días. La identificación taxonómica se realizó mediante la observación de las características macro y microscópicas de las colonias de hongos.

7. 3.- Inoculación de la Vid con *B. cinerea*

La cepa empleada para la inoculación fue *B. cinerea* UCA992, por ser un aislado de vid de una bodega de Jerez de la Frontera, realizado en el año 1992.

Para realizar la inoculación se preparó una suspensión de 1×10^6 conidios/ mL en 5 L de agua, la cual se roció, empleando un pulverizador, sobre cada una de las vides de los liños (Li) que previamente se habían pinchado.

8.- Bioensayos de Patogenicidad

Los bioensayos nos permiten estudiar el efecto que produce la infección del patógeno sobre un órgano o tejido vegetal. En este trabajo, los análisis se realizaron sobre hojas de judía *Phaseolus vulgaris* (genotipo N90598).

8. 1.- Preparación del Material Vegetal

1. Una vez seleccionadas las hojas de judía, las cuales deben estar en la misma fase de crecimiento, se desinfectan con una solución de etanol al 10 %
2. Para eliminar los posibles restos de etanol que puedan quedar en las hojas, se lavan 3-4 veces con agua destilada estéril y seguidamente, se secan cuidadosamente entre papel de filtro estéril
3. Una vez secas, las hojas se colocan en placas de Petri, que contienen filtros de papel Whatman humedecido con agua destilada estéril
4. Se adicionan 20 μ L de medio Vogel suplementado a un lado de la hoja para emplearlo como control

8. 2.- *Preparación de la Suspensión de Conidios*

La suspensión de conidios se preparó siguiendo al metodología descrita por Weed *et al.*, (1999):

1. Sobre una placa de *B. cinerea* esporulada, se vierten 5 mL de medio Vogel suplementado. Con ayuda de una espátula de vidrio, que es arrastrada sobre la superficie de la placa, se liberan los conidios
2. Se centrifuga la suspensión a 5000 r.p.m. (Centrífuga de baja velocidad. Sigma2-15) durante 5 minutos
3. Se resuspende el precipitado en medio Vogel suplementado y se prepara una suspensión de 1×10^6 conidios/ mL
4. Se inocula la superficie del la hoja con 20 μ L de la suspensión de conidios

Las placas se cierran, manteniéndolas a temperatura constante (21 ± 1 °C), y se evita que se resequen mediante la adición periódica de agua destilada estéril.

8. 3.- *Lectura del Bioensayo*

Diariamente se siguió la evolución del bioensayo, analizando los daños que se producen en el material vegetal y el desarrollo del hongo. Además, transcurridos 7 días post-inoculación se midió el diámetro de la lesión que ha producido la cepa en estudio.

8. 4.- *Tratamiento Estadístico de los Datos*

Se aplicó un tratamiento de estadística básica a los resultados experimentales obteniéndose los parámetros: media, desviación típica y error estándar de la media, empleando el programa SPSS 11.5.1 (*Statistical Product and Service Solution*).

Para agrupar los descendientes según el parecido entre ellos y sus parentales se realizó el análisis de conglomerados jerárquico mediante el programa SPSS 11.5.1. Para ello se realizó el cálculo de la matriz de distancias utilizando la distancia euclídea al cuadrado. La matriz de distancia se sometió al método de conglomeración de

vinculación inter-grupo, por ser el que se ajusta mejor al estudio. En base a la distancia de los nuevos conglomerados se obtuvo el dendrograma, donde se representan las etapas del proceso de fusión y también, las distancias existentes entre los elementos fundidos. Aunque, las distancias no están representadas en su escala original sino en una escala estandarizada de 25 puntos. Las líneas verticales identifican a los elementos fundidos (conglomerados); y la posición de las líneas verticales indica la distancia existente entre ellos.

Por último, para comprobar si existen diferencias significativas entre los conglomerados obtenidos, se empleó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se calculó la razón F-Fischer.

9.- *Aislamiento del ADN*

9. 1.- *Aislamiento del ADN Plasmídico de E. coli*

El método que se siguió para la obtención del ADN plasmídico fue el de lisis alcalina. El protocolo empleado es una modificación de los métodos de Birnboim & Doly (1979):

1. Se inoculan 100 mL de medio LB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende aislar y se cultivan las células bacterianas durante 12-14 horas a 37 °C con agitación orbital (Gallenkamp, modelo IMR250. Reino Unido)
2. Se toma 1 mL de cultivo y se recogen las células por centrifugación a 3500 r.p.m. (Sorvall, modelo RC-5B. Newtown, USA) durante 5 minutos
3. Se resuspende el precipitado de células en 100 µL de solución de lisis fría, con RNasa a una concentración de 10 µg/ mL. Se mezcla bien y se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente

4. Se añaden 200 μL de solución NaOH/SDS preparada en el momento. Se mezcla suavemente y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente
5. Posteriormente, se adicionan 150 μL de solución de acetato potásico 3M previamente enfriada a 4 °C. Se mezcla vigorosamente y se mantiene durante 10 minutos en hielo
6. Se centrifuga a 15000 .r.p.m., a 4 °C durante 20 minutos
7. Se recuperan 400 μL del sobrenadante y se le añade 1 mL de EtOH al 96 %, se mezcla bien la muestra y se incuba durante 15 minutos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
8. La muestra se centrifuga a 15000 r.p.m. a 4 °C y durante 5 minutos
9. El sobrenadante se elimina y el precipitado de células se lava con 500 μL de EtOH al 70 % frío
10. A continuación, se centrifuga a 15000 r.p.m. a 4 °C durante 5 minutos
11. El precipitado se seca y se resuspende en 40-50 μL de solución TE, lo que permite conservarlo a 4 °C ó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de usarlo

-
- Solución de lisis: glucosa 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0; Tris-HCl 25 mM, pH 8.0
 - Solución NaOH/SDS: NaOH 0.2 N; SDS 1 % (p/v)
 - Solución acetato potásico 3 M: se mezclan 60 mL de acetato potásico 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua destilada
 - Solución TE: EDTA 1 mM, pH 8.0; Tris-HCl 10 mM, pH 8.0
-

9. 2.- *Extracción de ADN Fúngico*

El ADN de las distintas cepas de *B. cinerea* se aisló empleando el kit “FastDNA[®]” (Q-BIOgene), el cual permite la obtención de ADN de elevada pureza, sin necesidad de realizar una extracción fenólica con fenol-cloroformo-isoamílico. El procedimiento a seguir es:

1. Se inoculan 200 mL de medio líquido Czapeck-Dox con una suspensión de 1×10^6 conidios y se incuba a 23 °C y 180 r.p.m. de agitación (Incubador orbital Gallenkamp, modelo IMR 250) durante 24 horas
2. Se recupera el micelio por filtración a través de un filtro de nylon de 30 μm de poro (Nytal, Maissa, Barcelona) y se lava con abundante NaCl al 0.9 %
3. El micelio seco se congela con nitrógeno líquido y se liofiliza (Liofilizador VirTis. Gardiner, USA) durante 24 - 48 horas
4. Utilizando un mortero, el micelio congelado y liofilizado se reduce a polvo muy fino, siempre inmerso en nitrógeno líquido
5. Se pesan 80 - 100 mg de polvo de micelio y se introducen en el tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) que contiene la matriz de lisis (2 esferas $\frac{1}{4}$ " + matriz granulada)
6. Se adiciona 1 mL de solución CLS-Y (Q-BIOgene) y se introduce el tubo en el aparato Fast-Prep® (Fig. 12) a velocidad 4.0, durante 30 segundos
7. Se recogen 600 μL del sobrenadante y se transfieren a un nuevo tubo de microcentrífuga y se le añade otros 600 μL de la solución Binding Matriz (Q-BIOgene). Se mezcla suavemente y se deja reposa durante 5 minutos a temperatura ambiente
8. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 5 segundos y se elimina el sobrenadante
9. Sobre el precipitado se adicionan 500 μL de la solución SEW-M (Q-BIOgene), se mezcla bien y se pasa la solución sobre el filtro que se ha preparado en un nuevo tubo de microcentrífuga
10. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 1 minuto, se elimina el sobrenadante y de nuevo se centrifuga el tubo de microcentrífuga con el filtro a la misma velocidad durante 2 minutos, con el objetivo de secar la membrana
11. El filtro una vez seco se introduce en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 100 μL de agua destilada estéril. Se deja en reposo durante 2 - 3 minutos a temperatura ambiente

12. Se centrifuga la muestra a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se retira el filtro, quedando la muestra de ADN recogida en el tubo y lista para que se use inmediatamente o se conserve a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

9. 2. 1.- Eliminación del ARN

En aquellos ensayos donde sea necesario que la muestra de ADN esté libre de ARN, se sigue el siguiente protocolo:

1. El volumen de muestra se trata con RNasa (Sigma), a una concentración final de $100\text{ }\mu\text{g/ mL}$ y se incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos
2. A continuación, se precipita a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío
3. Se centrifuga a 13000 r.p.m. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos
4. El precipitado se resuspende en agua destilada estéril o en solución TE1x y queda listo para su uso o conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$



Figura 12. Sistema FastPrep® para la extracción de ADN

10.- Digestión con Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción fueron empleadas siguiendo las indicaciones de los proveedores (Amersham, Fermentas). Las condiciones óptimas de digestión, temperatura de incubación, concentración de sales y pH, son unas concretas dependiendo de cada enzima. Como norma general, el volumen añadido de enzima a la mezcla de digestión no debe superar 1/10 del volumen total, debido a la alta concentración de glicerol de las soluciones de almacenamiento, las cuales podrían llegar a inhibir la actividad enzimática, si el volumen añadido es elevado. Asimismo, es muy conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de la reacción.

El esquema general de una digestión con las enzimas de restricción fue:

1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga:
 - a. Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión (50 μ L)
 - b. 1/ 10 del volumen final de reacción del tampón de digestión
 - c. 1.5 μ g de ADN disuelto en agua destilada
 - d. 1 μ L de la enzima de restricción (10 a 15 U de enzima/ reacción)
2. Se incuba la reacción a la temperatura adecuada según la enzima durante 14 - 16 horas
3. Para analizar las muestras, se cargan en un gel de agarosa al 0.6 - 0.7 % en TBE 1x con bromuro de etidio (0.5 μ g/ mL) y se corre una electroforesis a 70 V. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se une a la doble hélice de ADN y produce una luz anaranjada cuando el gel se ilumina con luz ultravioleta. La fuente de luz empleada fue un transiluminador Spectroline TVC-312A (Bio-Rad). El tamaño de las bandas se determinaron por comparación con un patrón conocido mediante el uso de los marcadores de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Mannheim) y λ HindIII.

11.- Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa

La electroforesis se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para moverse a través de un campo eléctrico en función de su tamaño.

11. 1.- Condiciones y Marcadores de Tamaño

La electroforesis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (1989):

1. Se prepara el gel de agarosa a concentración entre 0.6 % - 1.5 %, dependiendo del rango de tamaños que se desee resolver (Tabla 4). La agarosa se disuelve en TBE 1x calentando en un microondas, y tras dejarla enfriar, se vierte en un molde adecuado y se deja solidificar
2. A continuación, el gel se introduce en la cubeta de electroforesis y se cubre con tampón TBE 1x
3. Las muestras de ADN se mezclan con tampón de carga, tras lo cual se cargan en el gel
4. La electroforesis se realiza en el tampón TBE 1x mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre 1 y 5 V/ cm durante el tiempo necesario para que el azul de bromofenol alcance aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes de la longitud total del gel
5. Terminada la electroforesis, se tiñe el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los **marcadores de peso molecular** que se emplearon en las electroforesis fueron:

- *Hansenula wingeii* (Bio-Rad)
- *Schizosaccharomyces pombe* (Bio-Rad)
- Marcador XIV (Roche Diagnostics, Mannheim)

- ADN del bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII*

Concentración agarosa	Tamaño de los fragmentos ADN
0.3 %	5-60 Kbp
0.5 %	1-30 Kbp
0.7 %	0.8-12 Kbp
1.0 %	0.5-10 Kbp
1.2 %	0.4-7 Kbp
1.5 %	0.2-3 Kbp
2.0 %	0.05-2 Kbp

Tabla 4. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles

-
- TBE 10x: 108 g Tris base; 11 mL de ácido acético glacial; 8 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0
 - Tampón de carga: 0.01 % de azul de bromofenol; 25 % sacarosa; 10 mM EDTA
-

11. 2.- *Extracción del ADN de Geles de Agarosa*

Para extraer el ADN de los geles de agarosa se ha seguido el método descrito por Polman *et al.* (1989), el cual se basa en la congelación del fragmento de agarosa y posterior centrifugación a través de lana de vidrio. Este método es rápido y sencillo y no requiere del uso de agarosa de bajo punto de fusión, aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70 % del ADN cargado en el gel. En esencia, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se corta la banda seleccionada del gel lo más ajustada posible en tamaño y se trata con 1 mL de solución 1 durante 30 minutos
2. Se introduce en la muestras un tubo de microcentrífuga al cual se le ha practicado un orificio en su base y que se ha bloqueado con lana de vidrio esterilizada desde el interior

3. Se congela la banda en el interior del tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) con nitrógeno líquido, se introduce en otro tubo de tamaño superior y se centrifuga durante 4 minutos a 7000 r.p.m. y 4 °C. El tampón (con el ADN disuelto) que atraviesa la lana de vidrio se recoge en el tubo de mayor tamaño, quedando retenida la agarosa en la lana de vidrio. Este paso de centrifugación se repite 2 o 3 veces, hasta que el volumen de tampón recogido sea mínimo.
4. Se elimina la solución TAE 1x precipitando el ADN a -20 °C con 2.5 V de ETOH 100 % y 1/10 V de acetato sódico 3 M, pH 5.2, durante toda la noche

-
- Solución 1: acetato sódico 0.3 M, pH 7.0; EDTA 1 mM, pH 8.0
-

12.- Cariotipo Electroforético

Las muestras de ADN para la obtención del cariotipo electroforético deben prepararse por un procedimiento que libere el ADN del resto de los componentes celulares del hongo sin que se produzca rotura física o degradación enzimática de los cromosomas. Con este propósito se sigue un protocolo de obtención de protoplastos a partir del micelio del hongo y un tratamiento enzimático y químico de éstos para obtener el ADN libre e intacto. Dicho protocolo se basa en el procedimiento descrito por Schawrtz y Cantor (1984) para la obtención de muestras de levaduras, parcialmente modificado por Vallejo *et al.* (1996).

12. 1.- Obtención de Protoplastos

1. Se inoculan 200 mL de medio líquido Czapeck-Dox con una suspensión de 1×10^5 conidios y se incuba a 23 °C y 180 r.p.m. de agitación (Incubador orbital Gallenkamp, modelo IMR 250), durante 18 - 20 horas

2. Se recupera el micelio por filtración a través de un filtro de nylon de 30 μm de poro (Nytal, Maissa, Barcelona) y se lava con abundante NaCl al 0.9 %
3. El micelio, una vez seco, se resuspende en tampón TPP, a razón de 1 mL de tampón por cada 100 mg de micelio
4. A la suspensión micelial, se le añade el mismo volumen del tampón suplementado con Enzima Lítico (Sigma) a razón de 1 mg/ mL y se homogeneiza
5. La mezcla se incuba a 23 °C con agitación orbital suave de 70 - 90 r.p.m. (Incubador orbital Gallenkamp, modelo IMR 250) durante 3-5 horas, para facilitar la liberación de los protoplastos. Dicha liberación se va siguiendo mediante el recuento al microscopio óptico del número de protoplastos que hay en la muestra
6. Una vez se observa un número adecuado de protoplastos, la solución se filtra a través de un filtro de nylon de 30 μm de diámetro de poro (Nytal, Maissa, Barcelona) para eliminar los restos de micelio
7. Para concentrar los protoplastos, se centrifuga a 3000 r.p.m. (Centrífuga de baja velocidad. Sigma2-15) durante 5 minutos y se lava dos veces en tampón TCE, efectuándose tras el último lavado un recuento en cámara Neubauer
8. Finalmente, se resuspenden los protoplastos en tampón TCE, a una concentración de 2×10^8 protoplastos/ mL

-
- Tampón TPP: tampón fosfato potásico 50 mM, pH 5.8; KCl 0.7 M
 - Tampón TCE: KCl 0.7 M; EDTA 50 mM, pH 8.0
-

12. 2.- Preparación de los Bloques de Agarosa

1. A la suspensión de protoplastos se le añade el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión fundida y enfriada a 40 °C, preparada a una concentración del 1 % en el tampón TCE. Las cantidades se ajustan

de tal forma que la concentración final de protoplastos es de 1×10^8 protoplastos/ mL

2. La mezcla se homogeneiza y se reparte en moldes rectangulares de 100 μ L de volumen y se deja enfriar a 4 °C
3. Una vez solidificados, los bloques se extraen de los moldes y se tratan con ESP durante 30 - 40 h a 50 °C
4. Completado este tratamiento que provoca la lisis celular así como la degradación de los componentes proteicos asociados al ADN, los bloques se lavan tres veces con EDTA 50 mM a pH 8.0 y se guardan a 4 °C en esta misma solución hasta el momento de su utilización

-
- Solución ESP: EDTA 0.5 M, pH 9.0; lauroilsarcosina 1 % (Sigma); proteinasa K 1mg/ mL (Sigma)
-

12. 3.- *Preparación del Gel de Electroforesis*

1. El gel se prepara disolviendo la agarosa (0.7 % Grado cromosómico, Bio-Rad) en el tampón que se emplea como electrolito para la electroforesis (TAE 1x) por calentamiento en el microondas
2. La agarosa se vierte en un molde de 14 \times 12 cm con un peine de 10 pocillos y se deja enfriar
3. Una vez solidificada la agarosa se retira el peine y se cargan los pocillos con los bloques de agarosa con los protoplastos embebidos

-
- Tampón TAE 10x: Tris-base 48.4 g; 11.42 mL ácido acético glacial; 20 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0 M
-

12. 4.- *Electroforesis*

Para realizar la electroforesis en campo pulsante se empleó el sistema CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field), en un equipo CHEF DR-II (Bio-Rad).

Este aparato posee 24 electrodos dispuestos de forma hexagonal, una cubeta de electroforesis y un Módulo de Control.

El procedimiento que se siguió es:

1. Se separa el soporte de la plataforma que sostiene el gel y ésta se coloca en la cubeta electroforética, sujetándola por un armazón de dimensiones adecuadas. Este está colocado en posición central con respecto a los electrodos
2. Se vierte cuidadosamente el tampón de electroforesis (TAE 1X) hasta cubrir el gel
3. En el Módulo de Control se introducen los valores de los parámetros necesarios para la electroforesis:
 - Voltaje: 3 V/ cm
 - Tiempo inicial de pulso: 250 segundos
 - Tiempo final: 900 segundos
 - Tiempo total: 52 horas
 - Temperatura: 14 °C

Durante el tiempo que transcurre la electroforesis, el tampón de electroforesis recircular a través de la unidad mediante un sistema de bombeo, que mantiene un caudal de 0.70 L/ min.

12. 5.- Visualización del ADN Cromosómico

Terminada la electroforesis, el gel se tiñe con una solución del agente intercalante bromuro de etidio (0.5 µg/ mL de EtBr en tampón TAE 1X) durante 15-30 minutos con agitación suave. Seguidamente, se procede a la visualización de las bandas exponiendo el gel a la luz ultravioleta de un transiluminador y se digitaliza con un sistema de detección de geles (Gel Doc 1000. Bio-Rad). La imagen digitalizada se analiza mediante un programa informático denominado Molecular Analyst (Bio-Rad), el cual permite la determinación del número y tamaño de las bandas una vez separadas.

13.- *Transferencia del ADN de los Geles de Agarosa a Filtros*

La transferencia de las moléculas de ADN separadas en una electroforesis en gel de agarosa a un soporte sólido es lo que se denomina “Southern blotting” o “transferencia de Southern” (Southern, 1975). En la actualidad los soportes sólidos más comunes, por ser más resistentes, son de nitrocelulosa o de nylon. El Southern blotting es el paso previo a la hibridación de todo ácido nucleico.

El protocolo seguido para la transferencia de ADN a filtros de nylon (Hybond-NX, Amersham Biosciences. Reino Unido) es el siguiente:

1. Tras fotografiar el gel, este se mantiene 5 minutos en agua destilada con agitación moderada. A continuación se trata sucesivamente con las siguientes soluciones:
 - 20 minutos en HCl 0.2 N, para depurinizar parcialmente el ADN
 - 45 minutos en solución desnaturalizante, para desnaturalizar la doble hélice de ADN y
 - 45 minutos en solución neutralizante, para mantener el ADN desnaturalizado bajando el pH a un valor adecuado para los siguientes pasos
2. La transferencia se lleva a cabo en una bandeja que contiene SSC 20x, sobre la que se coloca un soporte y encima de éste, dos láminas de papel Whatman 3MM donde se sitúa el gel. Encima del gel se dispone, por orden, el filtro de nylon y dos láminas de papel Whatman 3MM, que previamente se humedecieron en agua destilada y SSC 2x durante 5 minutos. A continuación, se coloca un taco de papel de filtro de unos 10 a 15 cm de grosor y encima de esta estructura un peso de 500 g. La transferencia se deja entre 16 - 24 horas, manteniendo siempre la bandeja con solución SSC 20x

3. Terminada la transferencia se marca la posición de los pocillos sobre el filtro y se fija el ADN al filtro mediante calentamiento del filtro a 80 °C durante 2 horas o con luz ultravioleta en un transiluminador durante 10 minutos. De esta manera, el filtro puede ser usado inmediatamente o bien se guarda a 4 °C

-
- Solución desnaturalizante: NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M
 - Solución neutralizante: NaCl 3 M; Tris-HCl 1 M, pH 7.5
 - SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M, pH 7
-

14.- *Hibridación de los Ácidos Nucleicos*

La posibilidad de desnaturalizar y renaturalizar el ADN permite la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos que son complementarias, dando lugar a segmentos de doble hélice denominados heteroduplex. La detección de los heterodúplex formados se efectúa mediante la utilización de una sonda de ADN marcada. Actualmente los métodos empleados para el marcaje de la sonda se basan en el uso de moléculas de biotina o digoxigenina, lo que elimina los problemas del empleo de isótopos radiactivos.

14. 1.- *Descripción y Obtención de las Sondas*

14. 1. 1.- *Sonda ribosómica ADN_r 18S-5.8S-28S*

La sonda ribosómica usada fue pDM238 (Roiha *et al.*, 1981) insertada en el plásmido pBR322, que se encuentra clonado en la cepa JM109 de *E. coli*. La sonda tiene una extensión de aproximadamente 12 kb y contiene los genes y espaciadores del ADN_r 18S-5.8S-28S de *Drosophila melanogaster*.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el método de la lisis alcalina (ver apartado 9.1). El inserto se obtuvo mediante la digestión del plásmido con la enzima de restricción *EcoRI* (ver apartado 10) y posterior extracción del fragmento del gel de agarosa (ver apartado 11.2).

14. 1. 2.- Sonda telomérica (TTAGGG)_n

La sonda telomérica se obtuvo por el método descrito por Ijdo *et al.* (1991). El fundamento básico consiste en generar mediante PCR la sonda deseada, en ausencia del ADN molde, mediante el uso de cebadores específicos y complementarios: (TTAGGG)₅ y (CCCTAA)₅. Los cebadores sirven como molde en los primeros ciclos de la PCR mientras que los productos que se van formando sirven como cebadores y moldes en los siguientes ciclos de la PCR, dando lugar a una población heterogénea de moléculas de amplio rango de tamaño.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0.4 µM de cada cebador, 2 U de la enzima polimerasa *Taq* (Roche Molecular Biochemicals) y el tampón apropiado para la enzima. Tras 5 minutos a 94 °C de desnaturalización se realizaron 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C. A continuación se realizan 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 90 segundos a 72 °C. El resultado se confirma en un gel de agarosa al 1 % en TBE 1x con bromuro de etidio (0.5 µg/ mL) tras una electroforesis de 1.5 horas a 70 V. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y el tamaño de las bandas se determina por comparación con un patrón conocido mediante el uso del marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Mannheim).

14. 2.- *Marcaje de las Sondas*

El objetivo es conseguir ADN marcado con una molécula que posteriormente sea fácilmente detectable tras la hibridación. En los trabajos realizados durante esta investigación se ha usado el marcaje con digoxigenina (DIG), un esteroide obtenido de *Digitalis purpurea* y *D. lanata*. Para ello se ha usado el método *Random-primed* y el marcaje mediante PCR.

14. 2. 1.- Sonda ADN_r 18S-5.8S-28S

El método empleado para el marcaje fue el *Random-primed*, el cual se basa en el anillamiento de oligonucleótidos al azar en el ADN desnaturalizado. La cadena de ADN complementaria se sintetiza a partir de los extremos 3'-OH de los oligonucleótidos, utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Al sintetizarse la nueva hebra se introducen moléculas de digoxigenina en forma de DIG-11-dUTP cada 20-25 posiciones. En este caso se usó el kit *DIG High Primed DNA Labeling and Detecting Starter II* (Roche Diagnostics, Mannheim).

La reacción de marcaje se lleva a cabo en un volumen total de 16 µL de agua estéril donde se resuspende 1 µg del ADN sonda. Se hierve durante 10 minutos para desnaturalizar la sonda y a continuación se pone en hielo durante 2 - 4 minutos. Transcurrido este tiempo, se añade 4 µL de la mezcla de DIG-High Prime, se mezcla bien y se incuba a 37 °C durante 20 horas. Para parar la reacción se adicionan 2 µL de EDTA 0.2 M pH 8.0 y se calienta a 65 °C durante 10 minutos. Una vez marcada la sonda se puede guardar a -20 °C hasta el momento de su uso.

14. 2. 2.- Sonda telomérica (TTAGGG)_n

Para marcar esta sonda se empleó el método de marcaje mediante PCR, utilizando como cebadores los descritos anteriormente, (TTAGGG)₅ y (CCCTAA)₅. La reacción de amplificación y los ciclos se mantuvieron en las mismas condiciones descritas, con la diferencia de que la mezcla de dNTP usada es la siguiente: 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 150 µM dTTP y 50 µM DIG-11-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim). Una vez finalizados los ciclos de la PCR se confirma el producto de reacción mediante un gel de agarosa al 1 % en TBE 1x con bromuro de etidio (0.5 µg/ mL) tras una electroforesis de 1.5 horas a 70 V. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y el tamaño de las bandas se determinó por comparación con un patrón conocido mediante el uso del marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Mannheim).

14. 3.- *Prehibridación*

1. Se calienta un volumen apropiado de solución DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim) a la temperatura de hibridación
2. Se equilibra el filtro en solución DIG Easy Hyb precalentada durante 30 minutos a la temperatura de hibridación

14. 4.- *Hibridación*

1. La sonda marcada anteriormente se hierve para su desnaturalización durante 5 minutos y rápidamente se pone en hielo durante unos minutos
2. La sonda marcada desnaturalizada se mezcla con un volumen apropiado de la solución DIG Easy Hyb precalentada (3.5 mL/ 100 cm²) y se mezcla sin llegar a formar burbujas
3. Se elimina la solución DIG Easy Hyb en la que está el filtro y se añade la solución de la sonda marcada desnaturalizada. Se incuba a la temperatura de hibridación de 40 °C durante toda la noche
4. Al final de la hibridación, la sonda se recoge y se guarda a -20 °C

14. 5.- *Lavados Post-hibridación*

1. Se lava el filtro dos veces con solución de lavado 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación suave
2. A continuación, se lava dos veces el filtro con la solución de lavado 0.5x durante 15 minutos a la temperatura de 65 °C y agitación suave

-
- Solución de lavado 2x: SSC 2x; SDS 0.1 %
 - Solución de lavado 0.5x: SSC 0.5x; SDS 0.1 %
 - SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M, pH 7.0
-

14. 6.- *Detección*

El método elegido para detectar la señal de los filtros ha sido la detección quimioluminiscente, en el que la señal lumínica se recoge en el film de rayos X con un tiempo corto de exposición. El sustrato quimioluminiscente empleado fue el CSPD ready-to-use (Roche Diagnostics, Mannheim). Este sustrato es desfosforilado mediante la enzima fosfatasa alcalina, y como consecuencia se emite una radiación de 477 nm de longitud de onda, la cual se recoge en un film de rayos X con tan sólo de 5 a 30 minutos de exposición. Todos los pasos del proceso de detección quimioluminiscente se realizan en agitación y a temperatura de 25 – 50 °C.

1. El filtro se lava dos veces en el tampón de lavado durante 5 minutos
2. Se incuba durante 30 minutos en la solución bloqueante
3. Seguidamente, se trata el filtro con la solución del anticuerpo durante 30 minutos
4. Se lava dos veces durante 15 minutos en el tampón de lavado para eliminar el exceso del anticuerpo
5. Se sumerge el filtro en la solución de detección durante 2 minutos
6. Se introduce el filtro en una bolsa y se añade 1 mL de la solución CSPD ready-to-use (Roche Diagnostics, Mannheim) sobre la cara del filtro donde se encuentran la sonda unida. Inmediatamente, el filtro se incuba 5 minutos a temperatura ambiente
7. Se elimina el exceso de solución CSPD ready-to-use y se sella la bolsa
8. Se incuba la bolsa a 37 °C durante 10 minutos para potenciar la reacción de quimioluminiscencia
9. Se expone el filtro a un film de rayos X (Hiperfilm-MP, Amersham Biosciences. Reino Unido) durante 30 minutos y en oscuridad. Una vez obtenido el resultado, si el filtro se va a reutilizar en nuevos experimentos de hibridación con otras sondas, es importante que no se seque

-
- Tampón de lavado: ácido maleico 0.1 M; NaCl 0.15 M, pH 7.5; Tween 20 0.3 % (v/v)
 - Solución bloqueante: dilución 1:10 de la solución blocking (Roche Diagnostics, Mannheim) en tampón ácido maleico
 - Solución anticuerpo: dilución 1:10000 del anti-digoxigenin.AP (Roche Diagnostics, Mannheim) en la solución bloqueante
 - Solución de detección: Tris-HCl 0.1 M; NaCl 0.1 M, pH 9.5
 - Tampón ácido maleico: ácido maleico 0.1 M; NaCl 0.15 M, pH 9.5
-

14. 7.- *Tratamiento de los datos*

Cada film se digitaliza empleando el densitómetro Gel Doc 800 (Bio-Rad) y se analizan mediante el software Fingerprinting II (Bio-Rad).

La asignación de las bandas en cada uno de los patrones de restricción, se realiza en base a la curva densitométrica. La información, obtenida de esta manera, se transforma en una base binaria de presencia (1) y ausencia (0) de bandas, la cual permite determinar los valores de similitud entre cada par de individuos utilizando el coeficiente de Jaccard. Esta matriz de similitud fue sometida a análisis de cluster aplicando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages) incluido en el programa informático Fingerprinting II (Bio Rad).

14. 8.- *Reutilización de los Filtros*

Para poder emplear los filtros en posteriores hibridaciones es necesario eliminar la unión de la sonda al filtro, para lo que se deben seguir los siguientes pasos:

1. Se sumerge el filtro en agua bidestilada estéril y se agita vigorosamente

2. Para eliminar la sonda, se lava dos veces el filtro en solución NaOH 0.2 M y SDS 0.1 % SDS durante 15 minutos a 37 °C
3. Se lava varias veces el filtro con SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras estos lavados, el filtro queda listo para los siguientes experimentos de hibridación
4. Si se quiere conservar el filtro, este se almacena en el tampón ácido maleico o en SSC 2x hasta el momento de su uso

- SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M, pH 7.0

Resultados

1.- *Estudio de la Competitividad de B. cinerea en Viñedos de Jerez*

Con el fin de abordar el estudio de la eficacia biológica de la cepa de laboratorio *B. cinerea* UCA992, fue necesario determinar tanto cualitativa como cuantitativamente la población de hongos filamentosos presentes en la viña. Seguidamente se realizó la inoculación de una suspensión de conidios de dicha cepa y se analizó el impacto que tuvo la inoculación de dicha cepa sobre las cepas silvestres y sobre el resto de la micobiota. La cepa UCA992 fue seleccionada para realizar la inoculación por tratarse de un aislado monoconidial de vid *Vitis vinifera* var. Palomino, realizado en el año 1992 de un viñedo del Marco de Jerez.

1. 1.- *Estudio de la Micobiota Presente en la Viña antes de la Inoculación (to)*

La determinación de los géneros fúngicos que existían en la viña, se realizó mediante el lavado de la superficie de la uva con solución salina y posterior aislamiento de las unidades formadoras de colonias, las cuales se identificaron mediante el estudio de: i) las características morfológicas de las colonias creciendo en placas de Petri con medio Agar malta y ii) la observación al microscopio óptico de las hifas, el micelio, los conidióforos y los conidios.

Los géneros de hongos filamentosos que se aislaron en la viña fueron cuatro: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium* (Tabla 5). Los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium* mostraron comportamientos diferentes cada año, en relación a *Botrytis* y *Penicillium*, los cuales fueron más constantes a lo largo de los dos años de estudio. *Aspergillus* fue el género mayoritario en el año 2001, en ambas parcelas, mientras que en el año 2000, sólo lo fue en la parcela B. El género *Cladosporium* sólo se presentó como mayoritario en la parcela A en el año 2000. En todos los casos, la frecuencia con

que se detectó el género *Penicillium* fue muy baja (< 5%) excepto, durante el año 2001, en la parcela B donde supuso el 22% de la micobiota total. *Botrytis* fue el género que se detectó con menor frecuencia en el estudio, no llegando a alcanzar ni el 10% del total de la micobiota presente en la vid.

Al comparar la micobiota total existente en la uva, se puede observar que en el año 2001, en ambas parcelas, el número de colonias fúngicas/ Kg de uva fue superior, siendo el aumento de tres órdenes de magnitud con respecto al año 2000. Como se puede observar en la tabla 6, las condiciones climáticas fueron muy similares en los años de estudio. Por tanto, las diferencias en el número de colonias fúngicas entre ambos años no pudieron deberse a diferencias climatológicas.

Hongos	Año 2000		Año 2001	
	Parcela A	Parcela B	Parcela A	Parcela B
<i>Aspegillus</i>	6,5×10 ³ (13%)	43,6×10 ³ (92%)	507,2×10 ⁵ (70%)	209,7×10 ⁵ (49%)
<i>Botrytis</i>	1,3×10 ³ (3%)	1,1×10 ³ (2%)	43,2×10 ⁵ (6%)	32,3×10 ⁵ (8%)
<i>Cladosporium</i>	40,3×10 ³ (81%)	1,1×10 ³ (2%)	169×10 ⁵ (23%)	90,3×10 ⁵ (21%)
<i>Penicillium</i>	1,3×10 ³ (3%)	1,7×10 ³ (4%)	7,2×10 ⁵ (1%)	94,6×10 ⁵ (22%)
Total	49,4×10 ³	47,5×10 ³	726,6×10 ⁵	426,9×10 ⁵

Tabla 5. Número de colonias fúngicas aisladas/ Kg de uva muestreada a tiempo inicial (to).
(%): porcentaje que representa cada género sobre el total

	Año 2000	Año 2001
T^a máxima (° C)	28.1±0.80	28.91±0.98
T^a media (° C)	22.03±0.50	22.57±0.50
T^a mínima (° C)	15.02±0.77	19.54±0.74
Humedad relativa (%)	53,23 ± 0.46	60,94 ± 2,38
Precipitación (mm/min)	0 ± 0	0,0067 ± 0,0066

Tabla 6. Valores medios de los parámetros climáticos durante los dos años de estudio

1. 2.- Estudio de la Micobiota a Tiempo Final (tf)

Transcurridos 15 días desde que se realizó la inoculación, se determinó el número total de colonias de hongos filamentosos presentes en los liños control [Lc (tf)] y en los liños inoculados [Li (tf)] (Tabla 7). Los géneros fúngicos identificados en los liños control [Li(tf)] fueron *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Según los datos obtenidos, el número total de colonias aumentó en todos los casos, a excepción de la parcela A en el año 2001, donde el número total de colonias se redujo en un 78 % (Tabla 7). Además, se observó que el número total de colonias/ Kg de uva en los liños control [Lc(tf)] sigue siendo superior en el año 2001, en las 2 parcelas, aunque en menor orden de magnitud que inicialmente (to).

Al analizar la evolución de *B. cinerea* en los liños control (Tabla 8) se observó un incremento del número de colonias del patógeno, exceptuando la parcela A durante el año 2001, donde no se logró determinar la presencia de *B. cinerea* en las muestras. El incremento de las colonias fue de dos órdenes de magnitud en el año 2000, muy superior al del año 2001.

Al determinar el número de colonias totales en los liños a los 15 dpi [Li(tf)] (Tabla 7), se observó una disminución de la micobiota presente en los liños inoculados con respecto a los liños control [Lc(tf)], en todos los casos, excepto en la parcela A en el año 2000.

	2000			2001		
	Lc (to)	Lc (tf)	Li (tf)	Lc (to)	Lc (tf)	Li (tf)
Parcela A	$49,4 \times 10^3$	$72,3 \times 10^5$	$219,2 \times 10^5$	$726,6 \times 10^5$	$162,5 \times 10^5$	$30,9 \times 10^5$
Parcela B	$47,5 \times 10^3$	$29,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$426,9 \times 10^5$	$2113,5 \times 10^5$	$98,7 \times 10^5$

Tabla 7. Número total de colonias fúngicas aisladas/ Kg de uva muestreada.

Lc(to): liño control a tiempo inicial. Lc(tf): liño control 15 dpi

Li(tf): liño inoculado 15 dpi

	2000			2001		
	Lc(to)	Lc(tf)	Li(tf)	Lc(to)	Lc(tf)	Li(tf)
Parcela A	$1,3 \times 10^3$	$59,3 \times 10^5$	$22,7 \times 10^5$	$43,2 \times 10^5$	n.d.	$1,9 \times 10^5$
Parcela B	$1,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$	$32,3 \times 10^5$	$58,7 \times 10^5$	$10,6 \times 10^5$

Tabla 8. Número de colonias de *B. cinerea*/ Kg de uva muestreada.

Lc(to): liño control en el primer muestreo.

Lc(tf): liño control 15 dpi. Li(tf): liño inoculado 15 dpi.

n.d.: no detectado

La inoculación con *B. cinerea* en la viña tuvo un efecto diferente sobre cada uno de los géneros detectados en la viña, como se puede observar en la figura 13. El número de colonias del género *Aspergillus* desciende durante los dos años de estudio en la parcela B y mientras que el descenso en la parcela A se registró sólo en el año 2001. De todas las disminuciones observadas, la más acusada corresponde a la parcela B en el año 2001. A diferencia de lo acontecido en la parcela B se produce un aumento de dos órdenes de magnitud en la población de *Aspergillus* en la parcela A durante el primer año de estudio.

En cuanto a *Cladosporium*, el aumento apreciado en el número de colonias en el año 2000 contrasta con la disminución ocurrida al año siguiente (Fig. 13). Dicho aumento fue mayor en la parcela B, donde no se detectaron colonias de este género al inicio del estudio. También fue en esta parcela donde se presentó la disminución de mayor magnitud.

Para el género *Penicillium* (Fig. 13), el número de colonias disminuyó en todos los casos, siendo más acusado el cambio en la parcela A en el año 2000, donde no se detectaron colonias de este patógeno a los 15 dpi.

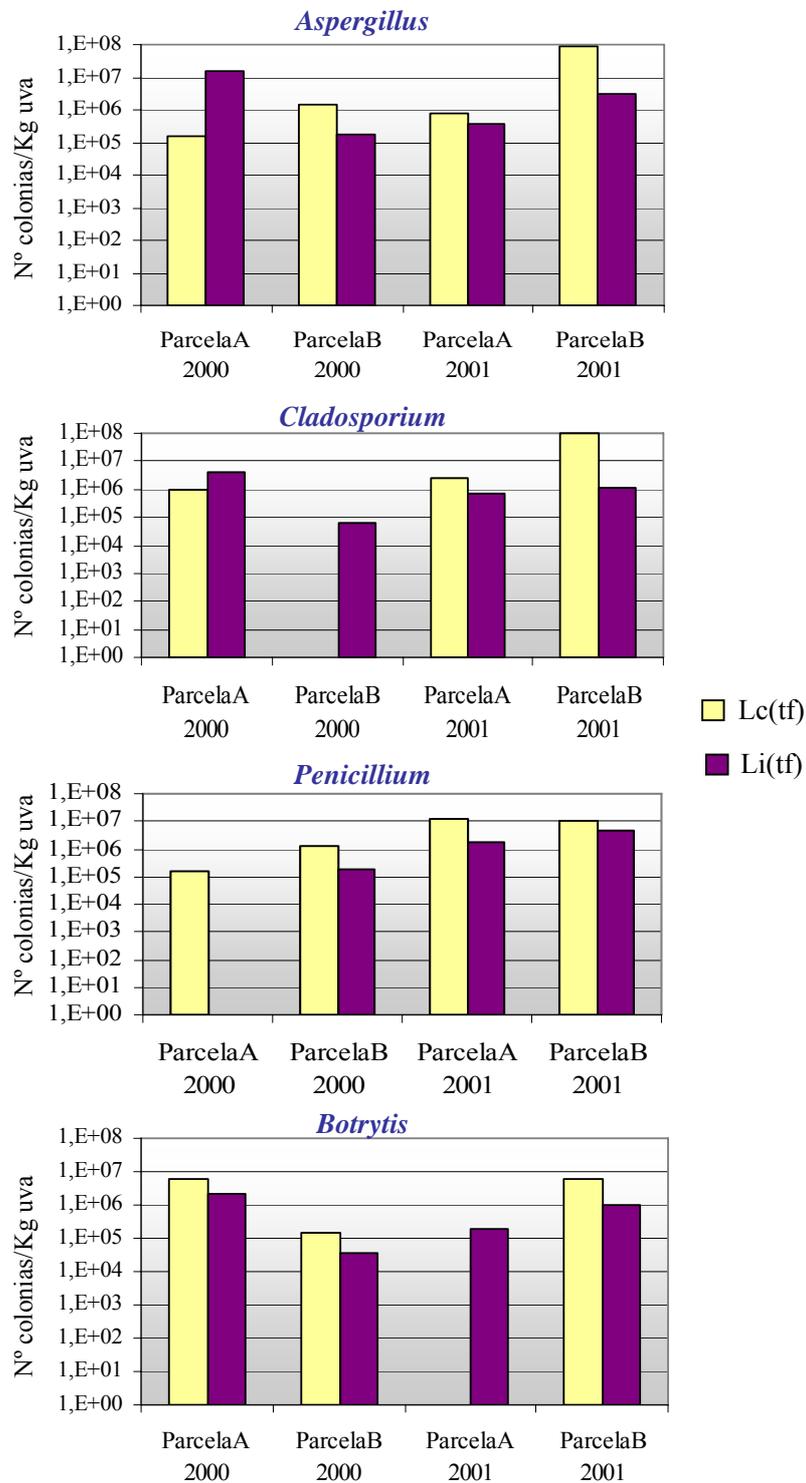


Figura 13. Evolución del número de colonias de cada género de hongos a los 15 dpi.
Lc(tf): liño control 15 dpi. Li(tf): liño inoculado 15 dpi.

Al analizar el efecto que ocasiona la inoculación con la cepa de laboratorio sobre las cepas de *Botrytis* (Tabla 8, Fig. 13), se detectó un descenso del número de colonias del patógeno en ambas parcelas durante el año 2000 y en la parcela B durante el año 2001, caso donde se registró la mayor disminución. En el año 2001, en los liños control de la parcela A no se detectó ninguna colonia de *B. cinerea* mientras que, el número de colonias, en los liños inoculados, fue de 2×10^5 colonias/ kg de uva muestreada.

2.- Cruzamiento entre Cepas de *B. cinerea*

Con el objetivo de realizar estudios genéticos se sometieron a cruzamientos un total de 7 cepas de *B. cinerea*, cuyos grupos de compatibilidad sexual eran conocidos (Tabla 9). En total, se llevaron a cabo 7 cruzamientos entre aquellas cepas que presentaban diferencias en sus características fenotípicas y cariotipos electroforéticos, y 2 cruzamientos recíprocos entre las cepas de referencia SAS56 y SAS405 (Tabla 10).

En la tabla 10 se muestran los resultados de los distintos cruzamientos, indicando con un signo “+” aquellos que fueron fructíferos y con el signo “-” los que no lo fueron. Cuando la fecundación entre cepas sexualmente compatibles fue positiva, se formaron los primordios apoteciales, los cuales continuaron su desarrollo para formar los correspondientes apotecios. Sin embargo, en el cruzamiento UCA996 × UCA993 el crecimiento de los primordios no fue acompañado de la producción del apotecio.

En general, cuando los cruzamientos fueron prolíficos, el número de esclerocios fecundados fue elevado (75 % de media). Sin embargo, la germinación no fue un proceso sincronizado, de manera que se observaron apotecios de diferentes tamaños coexistiendo en un mismo esclerocio (Fig. 14). El número de apotecios formados por esclerocio osciló de 1 a 12 y el tiempo requerido en su producción varió, entre 1 y 6 meses.

	UCA992	UCA993	UCA994	UCA996	2850	SAS56	SAS405
<i>MATI-1</i>							
<i>MATI-2</i>							
<i>MATI-1/2</i>							

Tabla 9. Alelos de compatibilidad sexual de las 10 cepas de *B. cinerea*

♀ \ ♂	SAS56	SAS405	UCA992	UCA993	UCA994	2850
SAS56	-	+	+	-		
SAS405	+	-	-	+		
UCA996				+		
UCA994						
2850					-	-

Tabla 10. Resultados de los cruzamientos entre cepas de *B. cinerea*.

+: cruzamiento fructífero; -: no ha habido fecundación;
 ♀: cepa que actúa como gameto femenino; ♂: cepa que actúa como gameto masculino

Los cruzamientos UCA996 × UCA993, 2850 × UCA994 y UCA994 × 2850 no dieron lugar a apotecios. En el caso de UCA996 × UCA993 el cruce fue fructífero pero no se llegaron a formar los apotecios. Sin embargo, los cruzamientos recíprocos entre las cepas UCA994 y 2850, no fueron fructíferos, lo que pudo estar relacionado: i) con el pequeño tamaño que poseen los esclerocios de la cepa 2850 y/ o, ii) con algún tipo de incapacidad de la cepa UCA994 para formar los apotecios.



Figura 14. Apotecios de *B. cinerea*

Una vez formados los apotecios se aislaron 32 ascosporas del cruzamiento SAS405 × UCA993 y 100 del cruzamiento SAS56 × UCA992 (ver Material y Métodos, apartado 6). Cada una de las ascosporas fue transferida a una placa Petri con medio Agar Malta, obteniéndose cultivos monoascospóricos.

3.- Bioensayos de Patogenicidad

Los bioensayos de patogenicidad se realizaron para determinar la virulencia de cada aislado así como, la heredabilidad de este carácter en *B. cinerea*. Se sometieron a estudio las cepas SAS56 y UCA992, así como 73 ascosporas aisladas del cruzamiento SAS56 × UCA992. Para ello, se adicionaron 20 μL de una suspensión de 1×10^6 conidios/ mL sobre las hojas de judía, *Phaseolus vulgaris*, y se realizó el seguimiento diario de los síntomas, así como la medición del diámetro de las lesiones a los 7 dpi.

El material vegetal seleccionado para la realización de los bioensayos fue hojas de judía, *Phaseolus vulgaris*, por ser fácil de cultivar en el laboratorio, así como por la creciente necesidad de estandarizar las condiciones de ensayo entre la comunidad científica, ya que la judía es el material vegetal más comúnmente empleado en los últimos años. Para que las características de las hojas empleadas en el estudio fueran lo más similares posible, se adoptó como criterio seleccionar las hojas de aquellas plantas en las que hubiera transcurrido 1 mes desde la germinación de la semilla de judía y 15 días desde que la hoja comenzase a brotar. Para cada cepa se realizaron 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno.

Los primeros síntomas que se observaron fueron las características lesiones necróticas sobre las hojas, las cuales aparecieron a las 48 horas de la inoculación (Fig. 15 A). A partir de este momento, las lesiones evolucionaron de diferente manera, pudiéndose describir dos sintomatologías (Fig. 15 B):

- i. Lesiones necróticas cubiertas de conidióforos, sin colonizar la hoja. Esta sintomatología fue presentada por la cepa UCA992 (Fig. 15 B₁)
- ii. Lesiones necróticas que colonizaban el material vegetal, cubriéndose de micelio y conidióforos. Además, en algunas ocasiones, se observó clorosis de la hoja en los límites del crecimiento del hongo. Este comportamiento fue típico de la cepa SAS56 (Fig. 15 B₂).

Transcurridos 7 días desde la inoculación, se midió el tamaño de las lesiones producidas por cada cepa (Tabla 11). El tamaño de las lesiones originadas por los parentales fue de 22.89 ± 1.49 mm en el caso de la cepa SAS56 y 14.33 ± 1.26 mm en la cepa UCA992, por lo que SAS56 fue el parental más virulento y UCA992 el menos virulento.

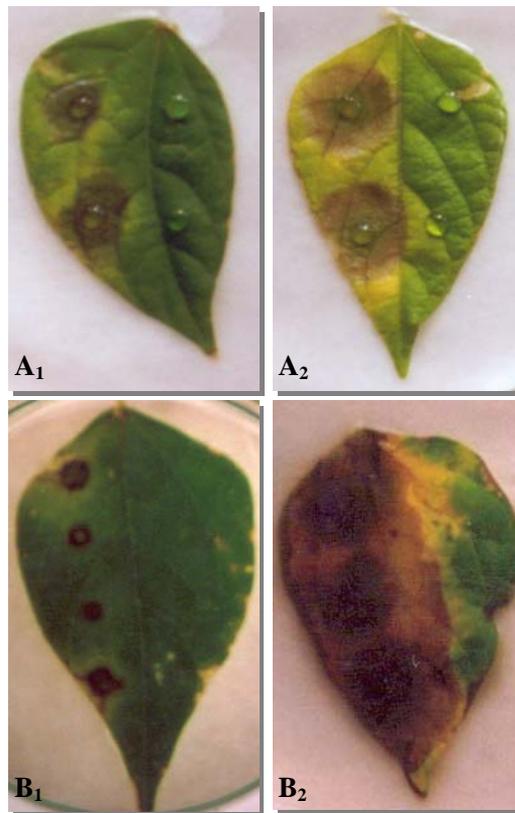


Figura 15. Bioensayos de patogenicidad en *B. cinerea*
A: 48 hpi; B: 7 dpi; 1: Ceba UCA992;
2: Ceba SAS56

En relación a las lesiones producidas por los descendientes (Tabla 11, Fig. 16), se observaron cepas que produjeron lesiones de menor tamaño que el parental UCA992, otros que provocaron lesiones mayores a SAS56 y por último, los que causaron lesiones que eran de dimensiones intermedias a la de ambos parentales. Tan sólo un descendiente (UCA992-9) (Tabla 11, Fig. 16) originó lesiones similares al parental UCA992. Sin embargo, 7 cepas (UCA992-5, UCA992-7, UCA992-11, UCA992-16, UCA992-38, UCA992-58 y UCA992-63) (Tabla 11, Fig. 16), provocaron lesiones de igual tamaño que el parental SAS56, siendo éste el grupo más numeroso. El descendiente UCA992-54 produjo la lesión de mayor tamaño (33.00 ± 2.18 mm) mientras que, UCA992-32 la de menor (5.86 ± 0.40 mm) (Tabla 11).

Cepas	Media	N	Error Estándar	Desviación Típica
UCA992	14,33	9	1,26	3,775
SAS56	22,89	9	1,49	4,485
UCA992-1	6,33	9	0,24	0,707
UCA992-2	19,67	9	0,44	1,323
UCA992-3	15,12	8	0,93	2,642
UCA992-4	17,22	9	0,85	2,539
UCA992-5	22,89	9	1,20	3,586
UCA992-6	22,38	8	1,15	3,249
UCA992-7	22,57	7	1,04	2,760
UCA992-8	10,78	9	1,42	4,265
UCA992-9	14,22	9	1,05	3,153
UCA992-10	21,00	9	1,20	3,606
UCA992-11	22,88	8	1,48	4,190
UCA992-12	20,13	8	1,16	3,271
UCA992-13	28,14	7	0,91	2,410
UCA992-14	27,43	7	0,95	2,507
UCA992-15	26,00	7	1,46	3,873
UCA992-16	22,88	8	0,85	2,416
UCA992-17	26,00	7	2,11	5,177
UCA992-18	30,11	9	0,96	2,892
UCA992-19	21,86	8	1,35	3,579
UCA992-20	12,86	8	1,28	3,388
UCA992-21	10,57	8	1,07	2,820
UCA992-22	9,00	8	0,65	1,732
UCA992-23	11,86	8	1,72	4,562
UCA992-24	7,67	9	0,65	1,936
UCA992-25	12,44	9	1,08	3,245
UCA992-26	7,33	7	1,20	2,944
UCA992-27	22,22	9	1,21	3,632
UCA992-28	15,11	9	1,27	3,822
UCA992-29	17,40	10	0,70	2,221
UCA992-30	24,20	10	1,37	4,341
UCA992-31	18,22	9	0,94	2,819
UCA992-32	5,86	8	0,40	1,069
UCA992-33	6,43	8	0,81	2,149
UCA992-34	17,71	8	0,64	1,704
UCA992-35	14,71	8	1,57	4,152
UCA992-36	9,29	8	1,64	4,348

Tabla 11. Datos del diámetro de la lesión a los 7 dpi (mm). N: n° de datos

Cepas	Media	N	Error Estándar	Desviación Típica
UCA992-38	23,43	8	1,70	4,504
UCA992-39	11,00	8	0,72	1,915
UCA992-41	10,88	9	1,51	4,257
UCA992-47	23,86	8	1,03	2,734
UCA992-48	8,14	7	1,16	3,078
UCA992-49	24,75	8	0,90	2,550
UCA992-50	12,86	7	1,28	3,388
UCA992-52	21,43	7	1,17	3,101
UCA992-53	26,33	7	1,23	3,011
UCA992-54	33,00	8	2,18	6,164
UCA992-55	30,11	9	1,63	4,885
UCA992-56	24,22	9	1,06	3,193
UCA992-57	26,25	8	0,62	1,753
UCA992-58	22,63	8	1,64	4,627
UCA992-59	31,63	8	1,22	3,462
UCA992-60	20,50	8	0,96	2,345
UCA992-62	30,33	8	0,61	1,506
UCA992-63	22,88	8	1,69	4,794
UCA992-65	27,11	9	0,81	2,421
UCA992-66	27,90	10	0,91	2,885
UCA992-68	32,30	10	1,13	3,561
UCA992-70	26,50	8	1,54	4,342
UCA992-71	32,43	8	1,45	3,823
UCA992-73	24,89	9	1,27	3,822
UCA992-74	29,29	8	0,71	1,890
UCA992-75	29,10	10	0,55	1,729
UCA992-76	26,00	8	1,10	2,683
UCA992-77	28,75	8	0,84	2,375
UCA992-78	28,33	8	1,05	2,582
UCA992-79	14,50	8	1,28	3,146
UCA992-83	30,25	8	0,25	0,707
UCA992-86	27,38	8	1,21	3,420
UCA992-88	31,33	8	0,42	1,033
UCA992-89	30,00	8	0,00	0,000
UCA992-94	28,43	7	0,78	2,070
UCA992-97	30,00	8	0,00	0,000

Tabla 11 (Continuación). Datos del diámetro de la lesión a los 7 dpi (mm). N: n° de datos

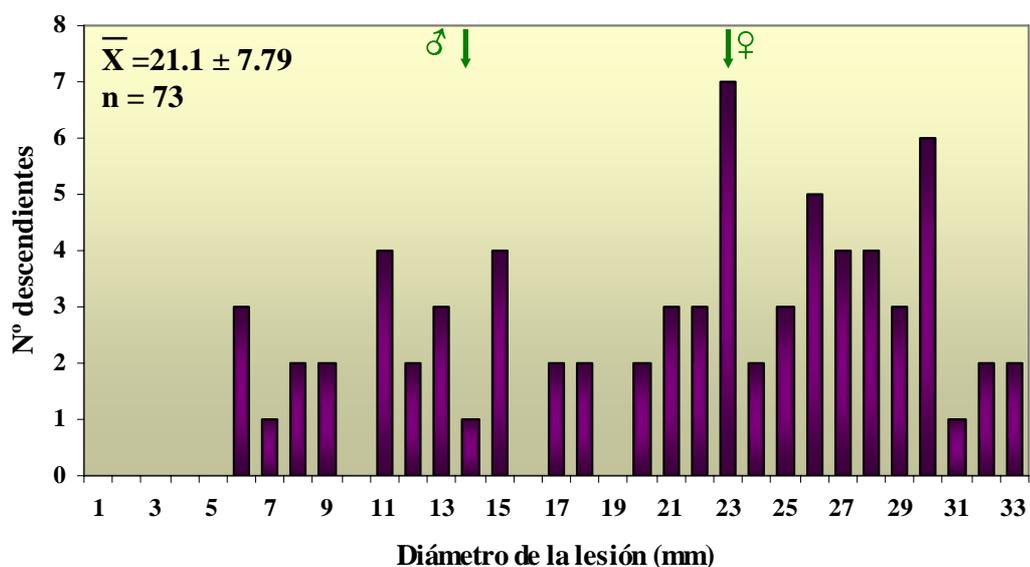


Figura 16. Número de descendientes que presentan cada valor del diámetro de la lesión.

♀: indica el diámetro de lesión producido por el parental SAS56; ♂: indica el diámetro de lesión producido por el parental UCA992; X: valor medio del diámetro de la lesión de los 73 individuos; n: número de descendientes analizados

Para analizar la similitud que existe entre los valores de las lesiones producidas por los parentales y los descendientes, se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos, con el que se obtuvo el dendrograma que se muestra en la figura 17. El dendrograma muestra el agrupamiento de los datos en cuatro grupos o conglomerados, en dos de ellos se agrupan los descendientes con el parental con el que tienen más similitud y en los otros dos, aquellos descendientes que no presentan similitud con ninguno de los parentales, ni con los descendientes agrupados en los otros grupos. Los grupos con diámetro de lesión similares a los parentales SAS56 y UCA992, se denominan II y IV, con 19 y 15 descendientes, respectivamente. El conglomerado I agrupa a 28 descendientes que producen lesiones de tamaño superior al parental más virulento. Y por último, el grupo III formado por 11 descendientes cuyas lesiones son inferiores a las causadas por el parental menos virulento.

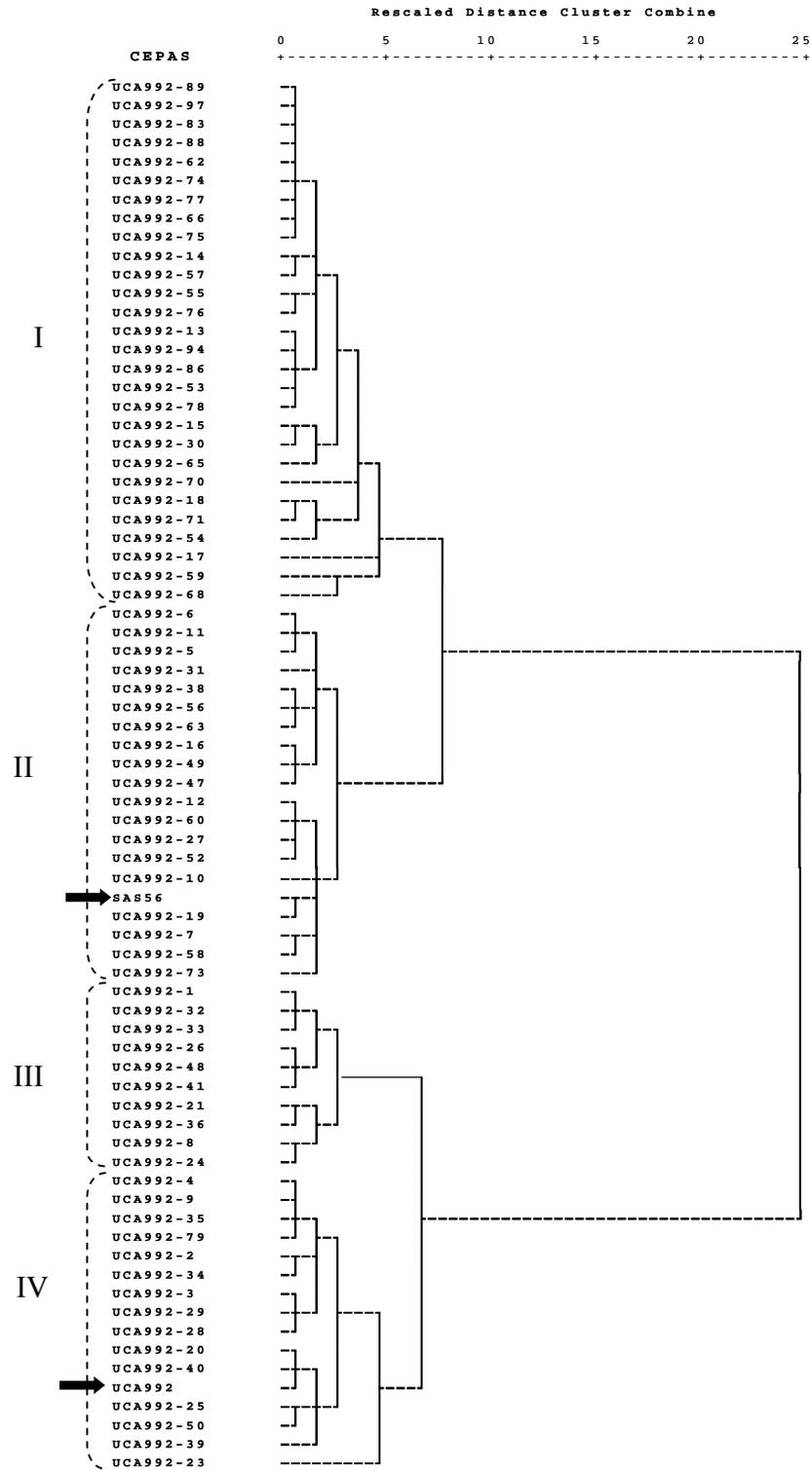


Figura 17. Dendrograma de las cepas de *B. cinerea* a partir de los datos de diámetro de las lesiones, utilizando la distancia euclídea al cuadrado y el método de vinculación inter-grupo. Las flechas indican la situación de los parentales. N° romanos: n° de conglomerados

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los cuatro conglomerados seleccionados, se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) (Tabla 12), el cual descompone la varianza del diámetro de la lesión en dos componentes: un componente entre conglomerados (grupos) y un componente dentro de los conglomerados. El estadístico F, que en este caso es igual a 783.674, es el cociente de la estimación entre conglomerados y la estimación dentro de los conglomerados. Dado que el valor del nivel de significancia (Sig.) es inferior a 0.05, hay diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro conglomerados para un nivel de confianza del 95 %.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	31242,986	3	10414,329	783,674	0,000
Intra-grupos	7654,522	576	13,289		
Total	38897,509	579			

Tabla 12. ANOVA para los conglomerados. gl: grados de libertad; F: estadístico F; Sig.: nivel de significación

4.- Cariotipo Electroforético de *B. cinerea*

La técnica de electroforesis en campo pulsante es una poderosa herramienta para la caracterización molecular de numerosos microorganismos, permitiendo conocer el número y tamaño de sus cromosomas. En la presente tesis doctoral se realizó la caracterización molecular de 26 cepas de *B. cinerea*, así como la descendencia aislada de los cruzamientos SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993.

Para el desarrollo de la técnica es indispensable la formación de los protoplastos (ver Material y Métodos, apartado 12). Una vez se tienen los protoplastos, son embebidos en agarosa, tratados enzimáticamente y finalmente, sometidos a la electroforesis. El cálculo del tamaño molecular de las bandas cromosómicas se efectuó mediante el programa Molecular Analysttm (Bio-Rad), empleando como marcadores

Resultados...

moleculares los cromosomas de *Hansenula wingeii* y *Schizosaccharomyces pombe*, levaduras con 7 y 3 grupos de ligamiento respectivamente.

Las condiciones electroforéticas empleadas en este trabajo suponen una modificación de las condiciones descritas en el protocolo de Vallejo *et al.* (1996). Estos autores describieron el cariotipo electroforético de 5 cepas (UCA994, UCA992, UCA993, 2100 y 2850), realizando la electroforesis a 11 °C. La variación de la temperatura de los 11 °C a los 14 °C empleados en el presente trabajo de tesis doctoral, supuso una mejor resolución del número de bandas detectadas por cepas. Al comparar los cariotipos electroforéticos obtenidos con los anteriormente descritos, se observó que en las cepas 2850 y UCA993, se lograba resolver 1 y 3 nuevas bandas respectivamente. No obstante, el empleo de estas nuevas condiciones también implicó un detrimento del número de bandas resueltas en una de las cepas (UCA992).

El estudio del cariotipo electroforético de 24 cepas de *B. cinerea*, aisladas de diferentes huéspedes y distinto origen geográfico, puso de manifiesto la existencia de diferencias tanto en el número como en el tamaño de las bandas cromosómicas que presentaba cada cepa (Fig. 18). No obstante, existen cepas que presentaron el mismo cariotipo electroforético. Todos los cariotipos electroforéticos obtenidos resultaron altamente reproducibles en todas las cepas, no observándose cambio en el número de bandas por aislado, a pesar de que las cepas se hubieran subcultivado varias veces.

Bajo las condiciones del ensayo, el estudio de los cariotipos electroforéticos de las 24 cepas de *B. cinerea*, permitió establecer 9 patrones cromosómicos diferentes, los cuales se han designado con números romanos (Fig. 19). En la tabla 13 se recogen los patrones electroforéticos definidos en las 24 cepas analizadas, pudiéndose observar la presencia de un patrón muy frecuente, P III, con sólo 6 bandas cromosómicas, que lo presentaron 13 cepas de las 24 cepas. No obstante, también existen patrones exclusivos de una única cepa, como son el caso de los patrones P I, P II, P IV, P V, P VI y P IX, presentados por las cepas UCA110, UCA106, SAS56, UCA991, UCA113 y SAS405, respectivamente.

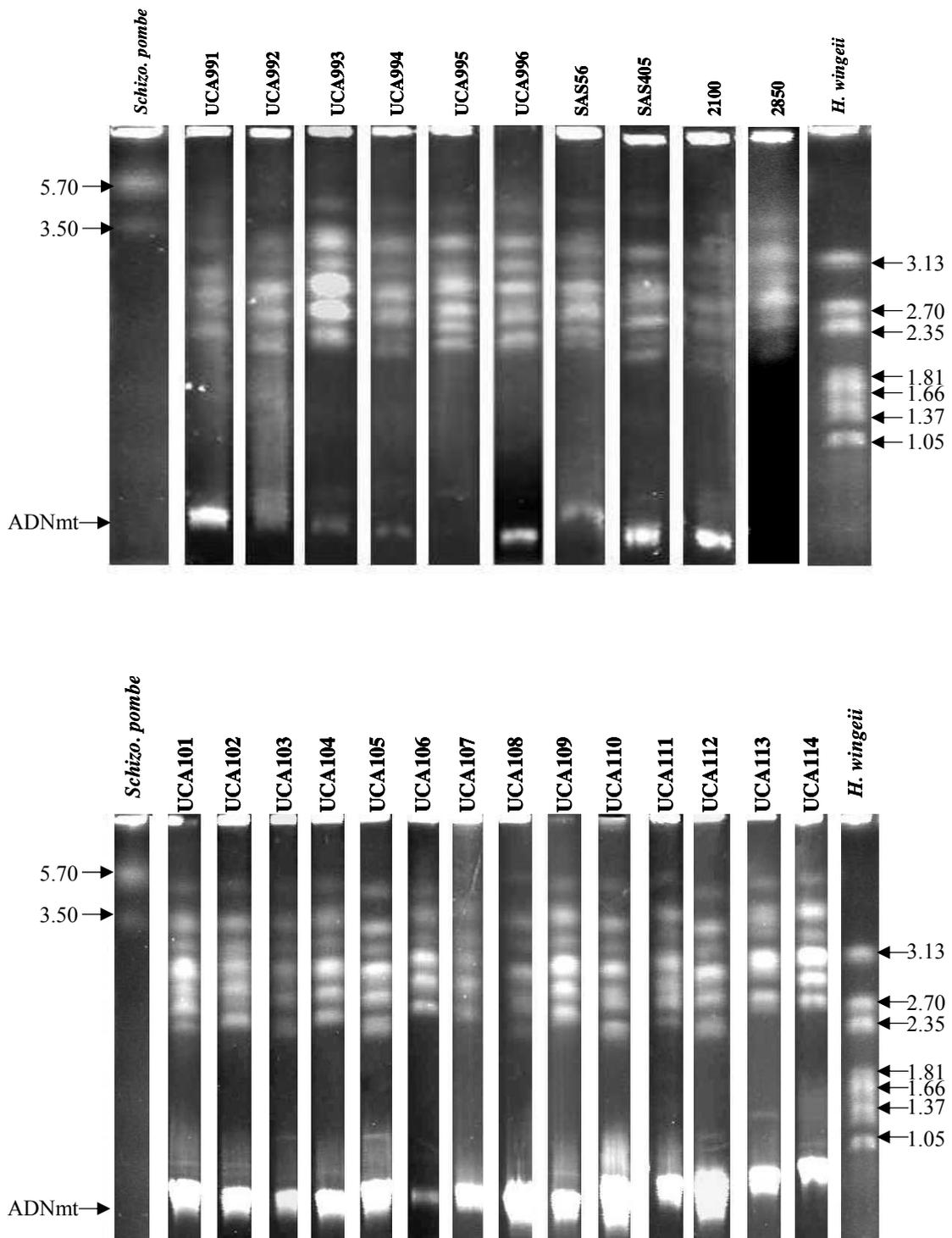


Figura 18. Cariotipo electroforético de las 24 cepas de *B. cinerea* obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la izquierda y derecha corresponden con los pesos moleculares de los marcadores en Mbp

Resultados...

El número de bandas resueltas osciló entre 5 y 8, siendo 6 el número medio de bandas cromosómicas (Fig. 18 y 19). No obstante, es importante ser cuidadosos cuando se comparan los cariotipos electroforéticos de distintas cepas, obtenidos en diferentes geles de electroforesis, porque aquellas bandas que presentan el mismo tamaño en diferentes cepas no tienen que representar a cromosomas iguales y por el contrario, cromosomas con diferentes tamaños en distintas cepas podrían ser homólogos. Por tanto, cuando se comparan cariotipos electroforéticos de distintas cepas, no es apropiado identificar bandas del mismo tamaño como el mismo cromosoma.

Del análisis detallado de los patrones cromosómicos se derivan las siguientes observaciones:

- a. La banda de 3.17 Mbp es una banda común en todas las cepas
- b. Las bandas de 2.90 y 3.72 Mbp aparecieron en todas las cepas a excepción de la cepa UCA991 (PV)
- c. Las bandas de tamaño de 2.66 Mbp y 2.16 Mbp fueron también muy frecuentes dado que la presentaron 21 de las 24 cepas analizadas
- d. La banda de 2.42 Mbp sólo la presentaron el 67 % de las cepas
- e. La banda de 2.52 Mbp, se presentó únicamente en el 29 % de las cepas, porcentaje muy similar en el que se observaron las bandas de 2.29 y 2.21 Mbp (25 %)
- f. La banda de 2.70 Mbp la presentaron 3 cepas
- g. Las bandas que aparecen con menor frecuencia son las de tamaño 3.30, 2.58, 2.05 y 1.87 Mbp, que aparecieron en 1 ó 2 cepas. La banda de 3.30 Mbp se visualizó en las cepas SAS56 y UCA113. La banda de 2.58 Mbp se observó en las cepas UCA991 y SAS405, mientras que las bandas de 2.05 y 1.87 se detectaron en las cepas UCA110 y UCA106, respectivamente.

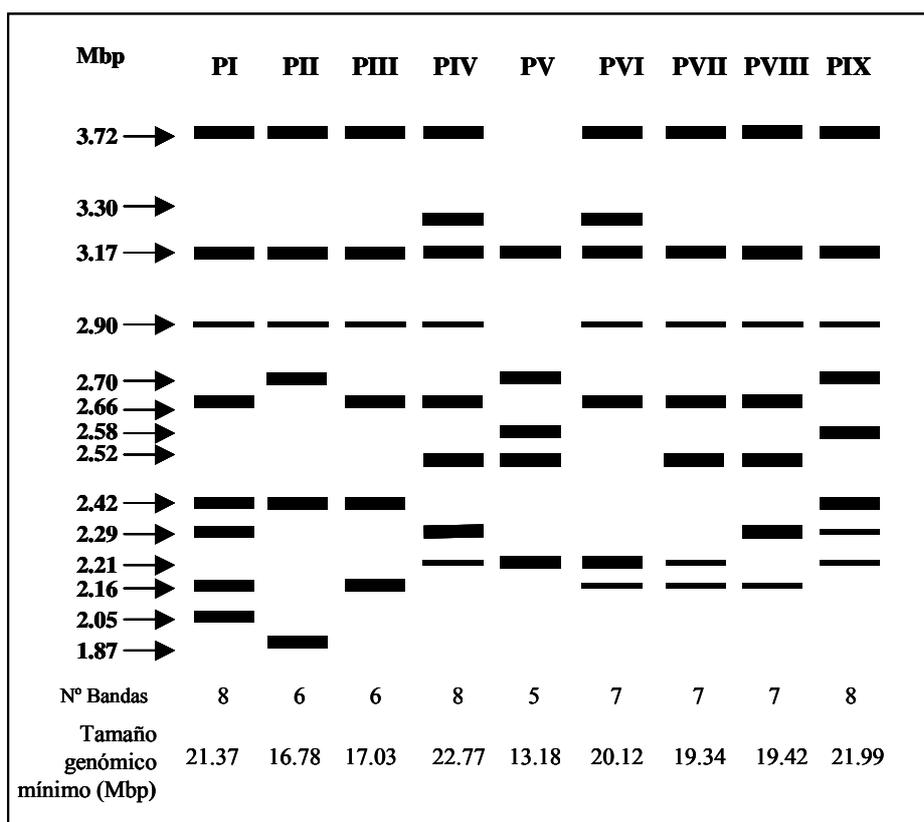


Figura 19. Esquema de los 9 patrones cromosómicos (en números romanos) obtenidos mediante PFGE de 24 cepas de *B. cinerea*

CEPA	PATRÓN CROMOSÓMICO	CEPA	PATRÓN CROMOSÓMICO
UCA991	V	UCA107	III
UCA992	III	UCA108	III
UCA993	III	UCA109	III
UCA994	VII	UCA110	I
UCA995	VIII	UCA111	VIII
UCA996	III	UCA112	III
UCA101	VIII	UCA113	VI
UCA102	III	UCA114	III
UCA103	III	2100	VII
UCA104	III	2850	III
UCA105	III	SAS56	IV
UCA106	II	SAS405	IX

Tabla 13. Patrones cromosómicos definidos en las 24 cepas de *B. cinerea*

Resultados...

En relación a las intensidades relativas de las bandas, se puede ver que existen bandas con una intensidad superior a otras (Fig. 18 y 19). Este resultado nos hace pensar que estas bandas podrían contener más de un cromosoma. Para lograr resolverlas, se han probado diferentes condiciones electroforéticas; sin embargo, en ningún caso se consiguieron resultados satisfactorios.

Considerando cada banda como un único cromosoma, el tamaño mínimo del genoma de *B. cinerea* se pudo establecer entre 13.18 Mbp en el patrón V y 22.77 Mbp para el patrón IV (Fig. 19) con un valor medio de 18.38 ± 0.48 Mbp (media \pm error estándar). Debido a que estos cálculos se realizaron asignando un único cromosoma a una banda, es posible que estos datos contengan un error de algunas Mbp.

Los cariotipos electroforéticos de la mayoría de las cepas aisladas de fresa en Huelva (UCA101, UCA102, UCA103, UCA104, UCA105, UCA109, UCA112, UCA113 y UCA114) presentaron de 1 a 2 bandas adicionales con muy baja intensidad y con un tamaño que osciló entre los 200 Kbp a 570 Kbp (Fig. 18). El pequeño tamaño de estas bandas y la ausencia de las mismas en algunos individuos, apuntan a que podrían corresponder a cromosomas supernumerarios, los cuales han sido ya descritos en otros hongos filamentosos, o incluso podría tratarse de fragmentos de cromosomas más grandes que se hubieran roto durante la preparación de las muestras.

Además, en todos los geles se visualizó una banda de mayor movilidad electroforética (Fig. 18), la cual fue previamente descrita por Vallejo *et al.* (1996), como ADN mitocondrial (ADNmt). Dicha banda no presentó en todas las cepas la misma intensidad, lo que podría estar relacionado con la comigración de algún cromosoma o fragmento de cromosoma junto al ADN mitocondrial.

4. 1.- Segregación de las Bandas Cromosómicas

Siguiendo los mismos pasos que con las cepas aisladas de campo, se analizó el cariotipo electroforético de los descendientes de los cruzamientos SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993, con el objetivo de determinar si la meiosis provoca variabilidad en el cariotipo electroforético de *B. cinerea*. Con tal propósito, se seleccionaron 30 muestras por cada cruzamiento, si bien la imposibilidad de conseguir protoplastos de algunos cultivos, a pesar de haber realizado modificaciones del protocolo (aumento de la concentración de enzima lítica, tiempo de tratamiento, etc.), permitió obtener el cariotipo de sólo 20 cultivos monoascospóricos de SAS56 × UCA992 (Fig. 20) y 28 de SAS405 × UCA993 (Fig. 21). Al igual que ocurrió con las 24 cepas descritas en el apartado anterior, los cariotipos electroforéticos de los 48 descendientes fueron altamente reproducibles.

Tras analizar los cariotipos electroforéticos de los descendientes de ambos cruzamientos (Fig. 20 y 21), se observó que las bandas que aparecen en cada individuo son la combinación de las que presentan sus correspondientes parentales y algunas otras nuevas bandas, que no estaban presentes en alguno de sus parentales. En cada caso, se comparó el perfil electroforético que presentaban dichas cepas con los descritos en las cepas aisladas de campo, asignándoles el correspondiente patrón a aquellos que coincidían. En los casos donde no hubo similitud con los patrones ya descritos, se hizo necesaria la definición de nuevos patrones electroforéticos.

En cada descendiente se detectó la banda que se ha identificado como ADN mitocondrial en las cepas parentales, aunque esta banda no presentó la misma intensidad y tamaño en todas y cada una de las cepas monoascospóricas (Fig. 20 y 21).

En cuanto a los patrones de la descendencia del cruzamiento SAS56 × UCA992 (Tabla 14), se observó que diez de los veinte descendientes estudiados presentaron los mismos patrones que los parentales (P III y P IV). Dos descendientes mostraron el patrón VIII, que se corresponde con el descrito en el apartado 4 para las cepas aisladas de campo. Los ocho restantes exhibieron tres patrones diferentes que se han denominado

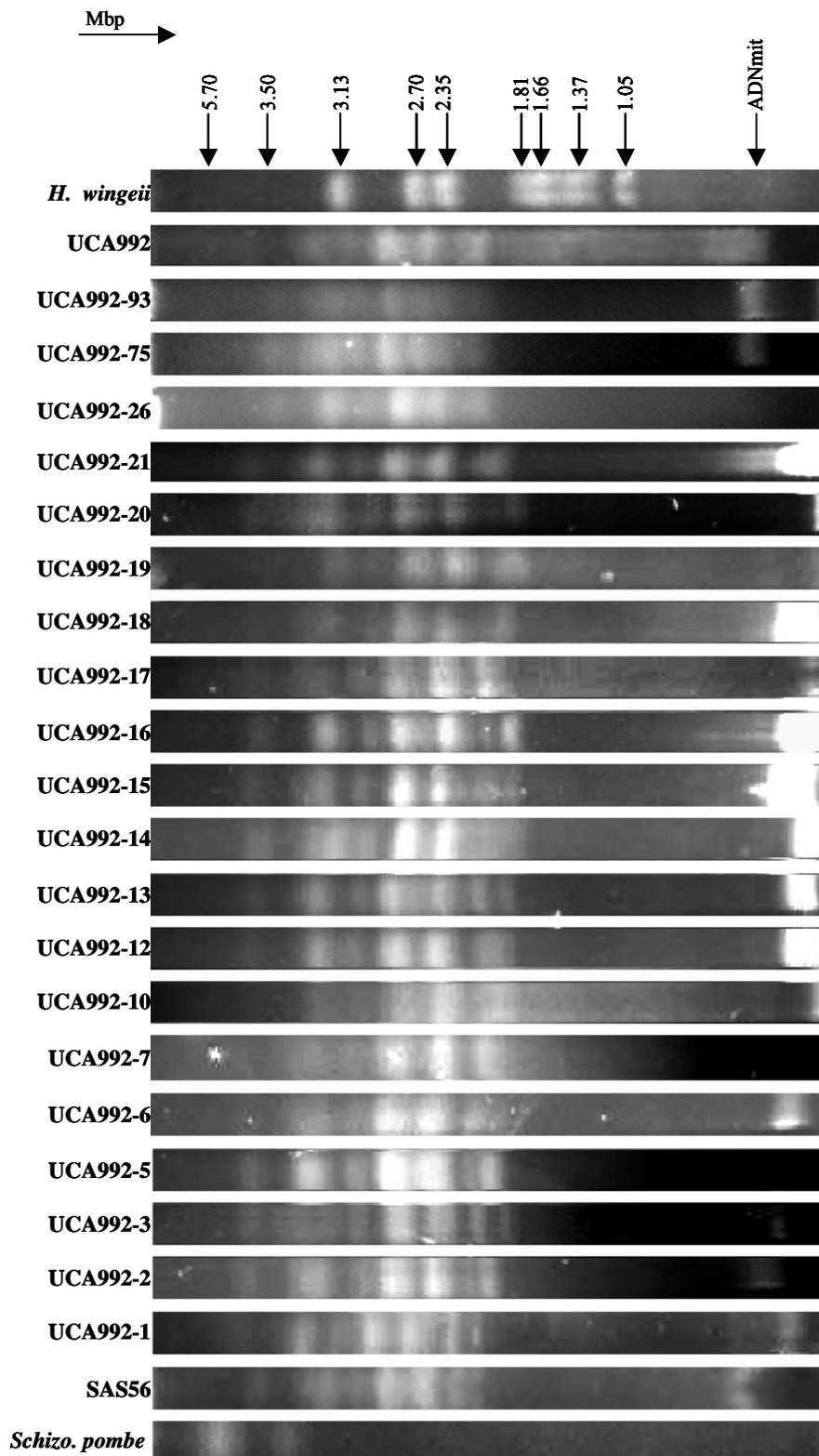


Figura 20. Cariotipo electroforético del cruzamiento SAS56 × UCA992 obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la derecha se corresponden con los pesos moleculares de los marcadores en Mbp

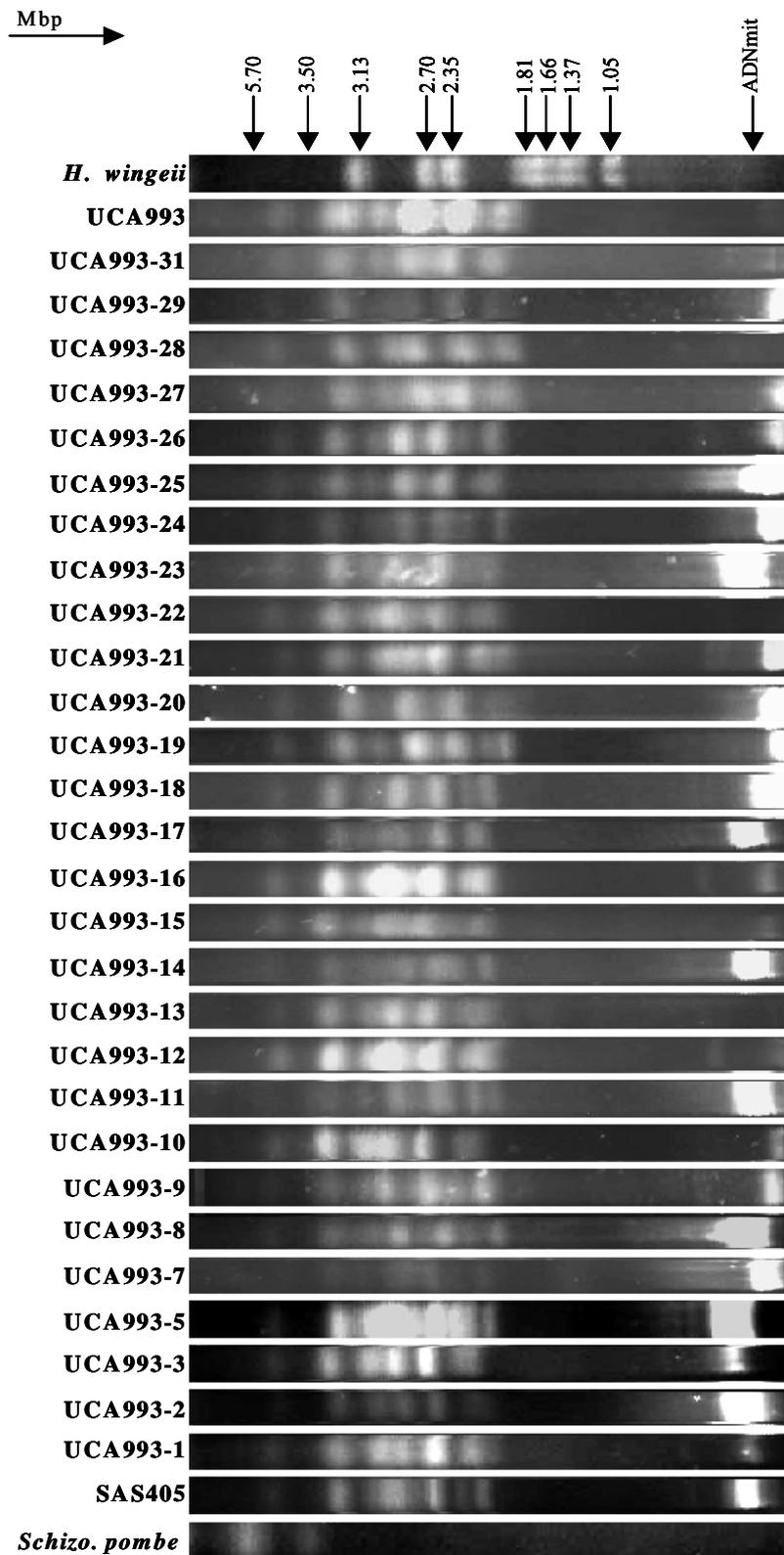


Figura 21. Cariotipo electroforético del cruzamiento SAS405 × UCA993 obtenido mediante electroforesis en campo pulsante. ADNmt: ADN mitocondrial. Los números de la derecha corresponden con los pesos moleculares de los marcadores en Mbp

Resultados...

X, XI y XII (Fig. 22, Tabla 14). Los patrones X y XII se detectaron en 3 cepas monoascospóricas cada uno. Todas las bandas que se presentan tanto en el P X como en el P XII están en el cariotipo de los parentales, aunque en estos individuos las bandas se combinan de forma distinta a como se observan en los progenitores. El patrón XI, presente en 2 cepas, se caracteriza por tener 8 bandas cromosómicas de las que una de ellas (3.02 Mbp) está ausente en los parentales.

Para determinar el número de cromosomas presentes en cada banda, los datos de los cariotipos electroforéticos se analizaron estadísticamente mediante la distribución chi cuadrado (χ^2) de bondad del ajuste, con la hipótesis inicial más simple de que cada banda contenga un solo cromosoma (Tabla 15). Los valores de χ^2 , para un nivel de significación del 0.05, indican que no existen diferencias significativas entre las frecuencias observadas para las bandas de 3.30, 2.52, 2.42, 2.29, 2.21 y 2.16 Mbp resueltas en el cruzamiento y la frecuencia teórica propuesta. Por tanto, estas bandas segregan según una razón 1:1, lo que indica que están compuestas por un cromosoma.

Además, los cariotipos electroforéticos de SAS56 (P IV) y UCA992 (P III) presentan 4 bandas cromosómicas comunes en ambos parentales (3.72, 3.17, 2.90 y 2.66 Mbp). Dichas bandas se han identificado en todos los descendientes a excepción de UCA992-3 y UCA992-14. Estas dos cepas presentaron el patrón XI (Tabla 14), que carece de la banda de 3.17 Mbp y posee una nueva banda de 3.02 Mbp (Fig. 22). Incluso si se compara el patrón XI con el X (Fig. 22), se aprecia que la única diferencia que existe entre ellos es la ausencia de la banda de 3.17 Mbp y la presencia de las bandas de 3.30 y 3.02 Mbp. El peso molecular promedio de estas dos bandas (3.16 Mbp), es compatible con una reorganización entre dos cromosomas de 3.17 Mbp que comigran juntos inicialmente.

En el caso del cruzamiento SAS405 \times UCA993 (Fig. 21, Tabla 14), no hay ningún descendiente que presente el patrón IX (patrón de SAS405), y tan sólo tres de los veintiocho descendientes, mostraron el patrón III (patrón de UCA993). Dos cepas

Patrón	Descendientes	
	SAS56 × UCA992	SAS405 ^c × UCA993
II		UCA993-15; UCA993-23
III ^a	UCA992-7; UCA992-10; UCA992-12; UCA992-17; UCA992-19; UCA992-26	UCA993-2; UCA993-27; UCA993-31
IV ^b	UCA992-2; UCA992-5; UCA992-6; UCA992-15	
VII		UCA993-11; UCA993-18; UCA993-19
VIII	UCA992-75; UCA992-93	
X	UCA992-1; UCA992-13; UCA992-16	UCA993-8; UCA993-9, UCA993-24 UCA993-26
XI	UCA992-3; UCA992-14	
XII	UCA992-18; UCA992-20; UCA992-21	UCA993-25
XIII		UCA993-21
XIV		UCA993-3; UCA993-10; UCA993-13
XV		UCA993-12; UCA993-16; UCA993-22
XVI		UCA993-20
XVII		UCA993-29
XVIII		UCA993-7
XIX		UCA993-5
XX		UCA993-14
XXI		UCA993-1; UCA993-17; UCA993-28

Tabla 14. Patrones cromosómicos que presentan las cepas monoascospóricas de dos cruzamientos entre cepas de *B. cinerea*. a: patrón de los parentales UCA992 y UCA993; b: patrón del parental SAS56; c: SAS405 presentó el patrón IX

Cruzamiento ♀ × ♂	Banda (Mbp)	Fenotipo Parental ♀ × ♂	Nº Observados		χ^2 1 : 1
			+	-	
SAS56 × UCA992	3.30	+ × -	9	11	0.2
SAS56 × UCA992	2.52	+ × -	6	14	3.2
SAS56 × UCA992	2.42	- × +	14	6	3.2
SAS56 × UCA992	2.29	+ × -	6	14	3.2
SAS56 × UCA992	2.21	+ × -	11	9	0.2
SAS56 × UCA992	2.16	- × +	16	4	3.2
SAS405 × UCA993	2.70	+ × -	8	20	5.1*
SAS405 × UCA993	2.66	- × +	20	8	5.1*
SAS405 × UCA993	2.58	+ × -	6	22	9.1*
SAS405 × UCA993	2.29	+ × -	5	23	11.5**
SAS405 × UCA993	2.21	+ × -	8	20	5.1*
SAS405 × UCA993	2.16	- × +	17	11	1.2

Tabla 15. Segregación de las bandas cromosómicas observadas en los dos cruzamientos aislados. +: indica presencia de la banda; -: indica ausencia de banda; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.001

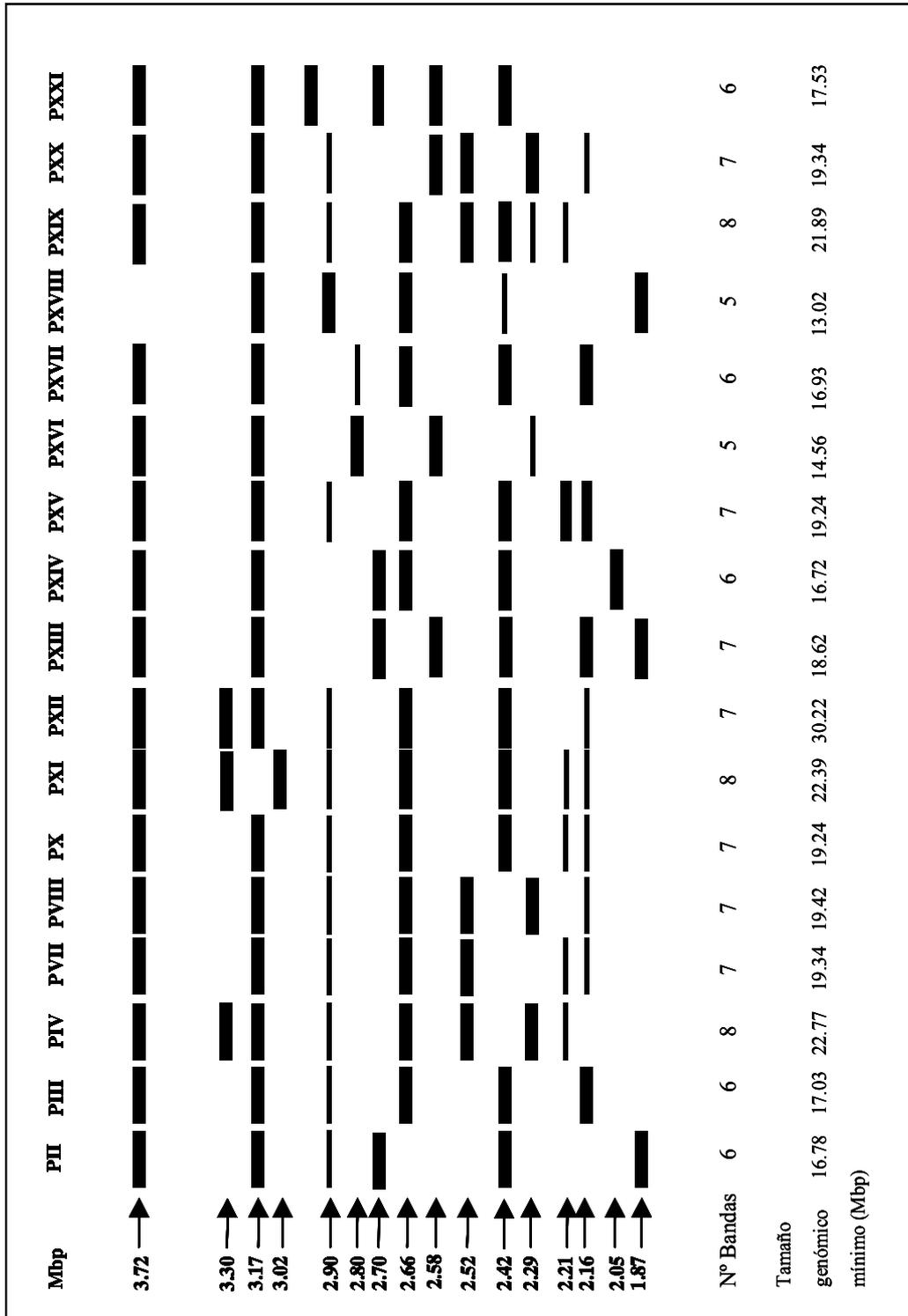


Figura 22. Esquema de los diferentes patrones cromosómicos (números romanos) obtenidos tras la electroforesis en campo pulsante de los descendientes de los cruzamientos SAS 56 x UCA992 y SAS405 x UCA993

exhibieron el patrón II, que fue definido en el apartado 4 para las cepas aisladas de campo (Tabla 14). Otras ocho cepas, se identificaron con los patrones VII, X y XII, patrones determinados en algunos de los descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992 (Tabla 14). El resto de los individuos, doce de los veintiocho, presentaron nuevos patrones cromosómicos, que se designaron como XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX y XXI (Fig. 22, Tabla 14). Todos estos nuevos patrones, excepto el P XV, contienen una banda cromosómica que no está presente en los parentales. Los tres descendientes que poseen el P XV, presentan las mismas bandas cromosómicas que el parental UCA993 y además, la banda de 2.21 Mbp, característica de SAS405.

Al igual que en el caso anterior, para analizar cómo segrega cada una de las bandas cromosómicas del cruzamiento SAS405 × UCA993, se aplicó el test del χ^2 (Tabla 15), con la misma hipótesis de partida. De todas las bandas estudiadas, se observó que tan sólo la banda de 2.16 Mbp segrega según una razón 1:1 y por tanto, está compuesta por un cromosoma. Sin embargo, las restantes bandas (2.70, 2.66, 2.58, 2.29 y 2.21 Mbp) presentan diferencias estadísticamente significativas entre los valores observados y esperados, por lo que estas cinco bandas contienen, probablemente, 2 ó más cromosomas (Tabla 15).

Las cepas parentales poseen 4 bandas en común, con un tamaño de 3.72, 3.17, 2.90 y 2.42 Mbp. De estas bandas, tan sólo la de 3.17 Mbp se visualizó en todos los descendientes, mientras que en los restantes casos ocurrió que (Fig. 22, Tabla 14): (i) la banda de 3.72 Mbp desapareció del patrón XVIII; (ii) la banda de 2.90 no apareció en los patrones XIII, XIV, XVI, XVII y XXI y (iii) la banda de 2.42 Mbp no se visualizó en los patrones VII, XVI y XX.

Además, se detectaron 6 bandas que no estaban presentes en ninguno de los parentales (Fig. 22, Tabla 14). Estas bandas tienen un tamaño de 3.30 Mbp (en el patrón XII), 3.02 Mbp (en el patrón XXI), 2.80 Mbp (en los patrones XVI, XVII), 2.52 Mbp (en los patrones VII, XIX y XX), 2.05 Mbp (en el patrón XIV) y 1.87 Mbp (en los patrones II, XIII y XVIII).

4. 2.- Caracterización Molecular de las Cepas *B. cinerea* T4 y Bd90

Las cepas T4 y Bd90, aisladas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y vid (*Vitis vinifera*) respectivamente, son las cepas objeto de estudio del Proyecto Europeo de Secuenciación del Genoma de *Botrytis*, lo que hace necesario conocer con la mayor exactitud posible la dotación cromosómica de las mismas.

Una vez puesta a punto la técnica de electroforesis en campo pulsante, se procedió a la obtención del cariotipo electroforético de las cepas T4 y Bd90 (Fig. 23A).

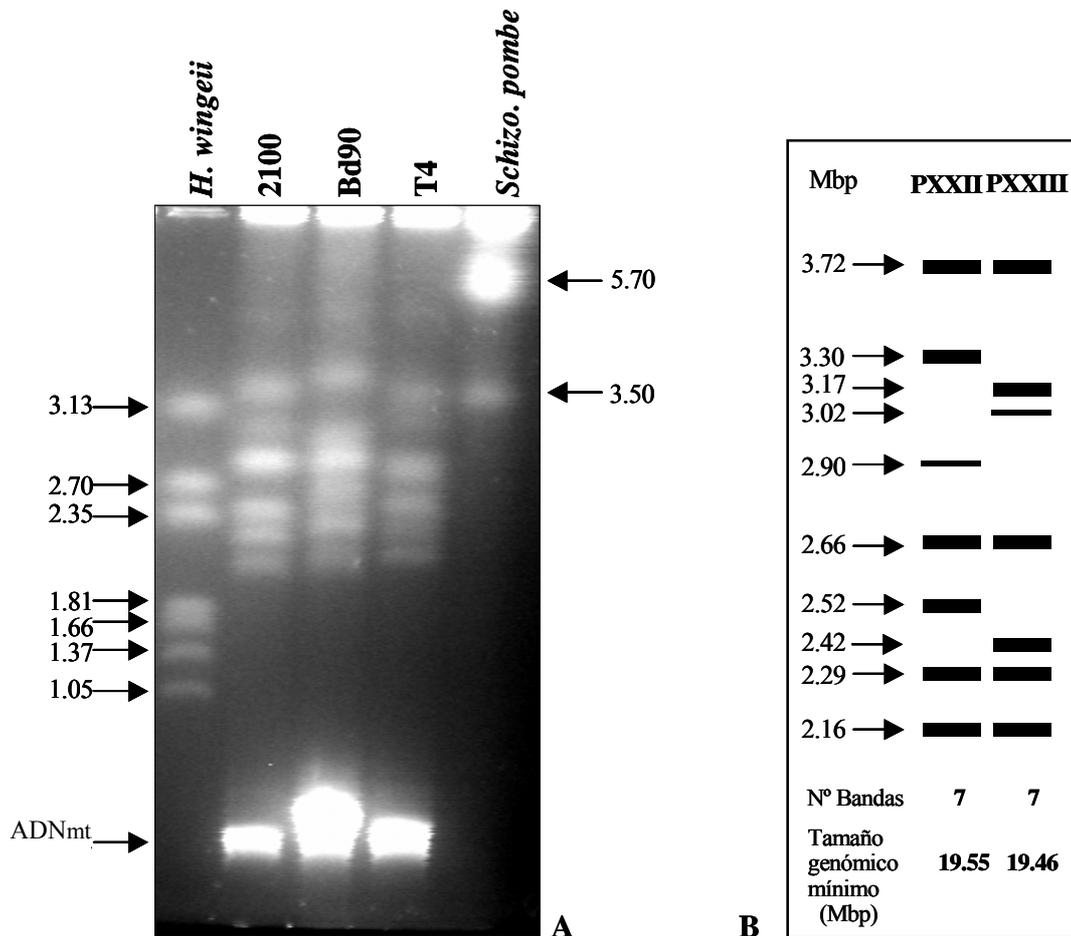


Figura 23. Caracterización molecular de las cepas Bd90 y T4. A: Cariotipo electroforético obtenido mediante PFGE. Pesos moleculares de los marcadores indicados a los lados (Mbp), ADNmt: ADN mitocondrial; B: Esquema de los patrones cromosómicos (en números romanos)

Como se puede observar en la figura 23, ambas cepas poseen 7 bandas cromosómicas cada una, cuatro de ellas comunes en las dos y 3 específicas de cada cepa. No obstante, estas 7 bandas ya han sido identificadas en las cepas analizadas en los apartados 4 y 4.1. Además, se observó la banda identificada como ADN mitocondrial, aunque en el caso de la cepa Bd90, siempre se obtuvo una banda de una intensidad superior a la obtenida en las demás cepas.

Al comparar los patrones descritos en Bd90 y T4 con los ya existentes (Fig. 22), se observa que estas dos cepas definen dos nuevos patrones que se han denominado P XXII y P XXIII, respectivamente (Fig. 23B y 24). Considerando que cada banda contiene un único cromosoma, el tamaño genómico mínimo es de 19.55 y 19.46 Mbp para Bd90 y T4, respectivamente.

5.- Hibridación del Cariotipo Electroforético de *B. cinerea*

La hibridación del cariotipo electroforético con una secuencia de un ADN conocido permite su localización cromosómica así como averiguar si las bandas cromosómicas que presentan el mismo tamaño son cromosomas homólogos. En el presente trabajo se han empleado dos tipos de secuencias de ADN repetidas como son el ADN ribosómico y el ADN telomérico. La secuencia de ADN telomérico de *B. cinerea* fue descrita por Levis *et al.* (1997b) y ha permitido confirmar que cada una de las bandas cromosómicas resueltas se corresponde con, al menos, un cromosoma.

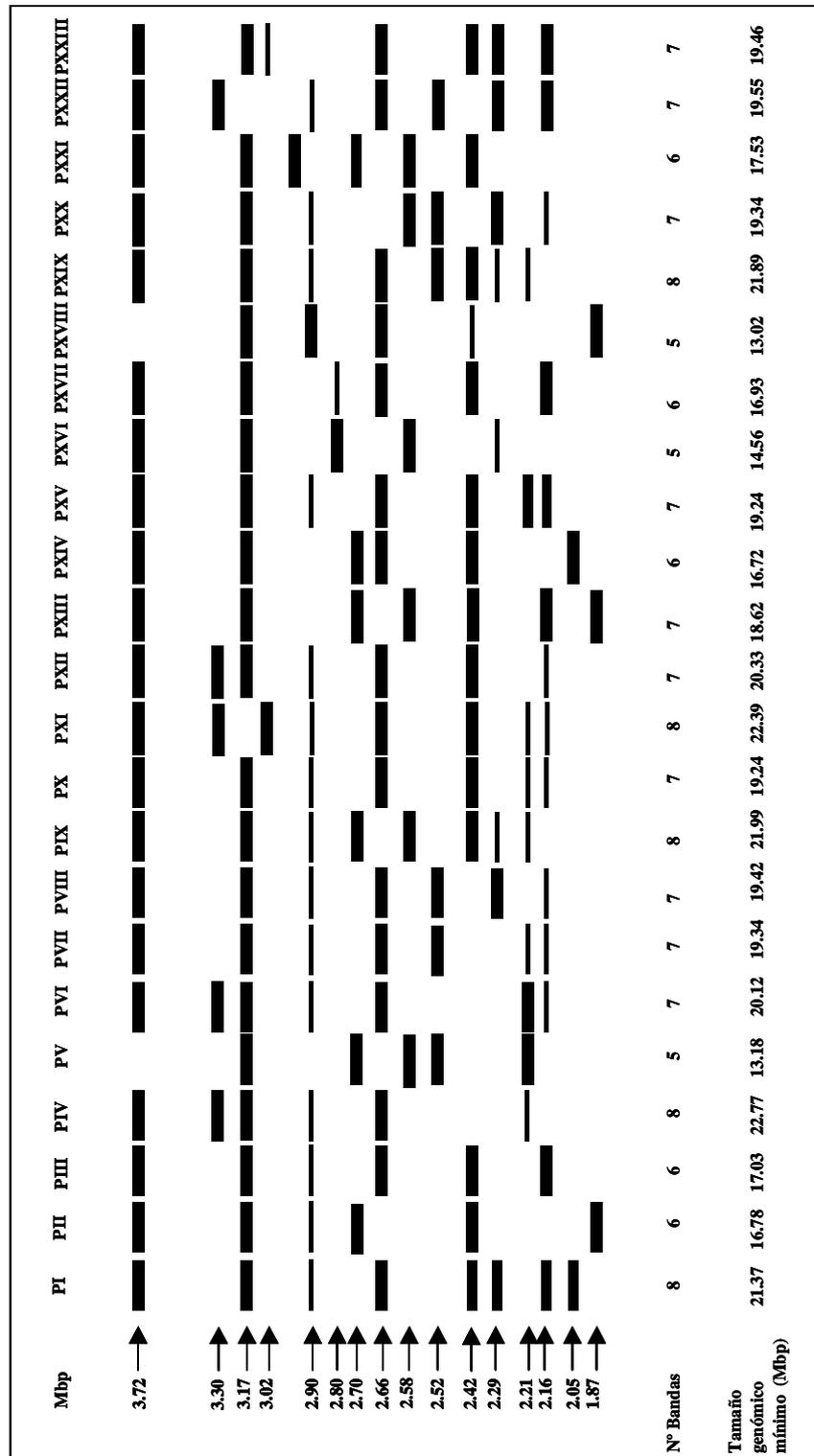


Figura 24. Esquema de los diferentes patrones cromosómicos (en números romanos) obtenidos tras la electroforesis en campo pulsante de 74 cepas de *B. cinerea*

5. 1.- *Hibridación con una Sonda de ADN Ribosómico*

Para localizar la posición cromosómica del ADN ribosómico, se realizó la hibridación del cariotipo electroforético de las cepas aisladas de campo (UCA991, UCA992, UCA993, UCA994, UCA995, UCA996, SAS56, SAS405, 2100, 2850, Bd90 y T4), con un fragmento, de aproximadamente 12 Kbp, que contiene los genes y espaciadores del ADNr 18S-5.8S-28S de *D. melanogaster*. Además, se hibridaron los cariotipos de 20 descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992 y 28 descendientes de SAS405 × UCA993. En las figuras 25 y 26 se muestran los ejemplos más significativos observados en las cepas aisladas de campo así como en los descendientes de ambos cruzamientos.

Tras la hibridación de los cariotipos electroforéticos de las cepas aisladas de campo (Fig. 25), se observó que el ADN ribosómico se localiza en un cromosoma de gran tamaño (3.17 Mbp) y en la banda identificada como ADN mitocondrial en todas las cepas, a excepción de las cepas UCA992 y Bd90. En la cepa UCA992, no se detectó señal de hibridación en la banda del ADN mitocondrial (Fig. 25 y 26, 1B). En la cepa Bd90, el ADN ribosómico hibridó sobre la banda de 3.30 Mbp y en la banda de ADN mitocondrial.

En los parentales SAS56 y UCA992, el ADN ribosómico hibridó sobre la banda cromosómica de 3.17 Mbp en ambos. Y en la cepa SAS56, además hibridó, aunque con una señal muy débil, en la banda del ADN mitocondrial. En cuanto a los descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992, la hibridación se detectó en la banda de 3.17 Mbp y en el ADN mitocondrial en todos los casos, excepto en cuatro cepas: (i) en UCA992-3 y UCA992-14, donde la señal se observó en la banda de 3.30 Mbp (Fig. 26, 1B) y (ii) en las cepas UCA992-13 y UCA992-18, donde no hubo hibridación en la banda del ADN mitocondrial.

Resultados...

En la cepa UCA993, el ADN ribosómico se visualizó en la banda de 3.17 Mbp con una alta intensidad y en la banda del ADN mitocondrial como una banda muy tenue (Fig. 26, 2B). En la cepa SAS405, el ADN ribosómico se localizó en las mismas bandas cromosómicas, aunque en esta ocasión con una señal intensa en ambas bandas (Fig. 26, 2B). En la descendencia de SAS405 × UCA993, el fragmento de ADN ribosómico hibridó siempre con la banda del ADN mitocondrial y en la banda 3.17 Mbp (en el 89.3 % de los descendientes) o en la banda de 3.30 Mbp (en el 10.7 % de los descendientes).

En la cepa UCA993-21 el ADN ribosómico hibridó en la banda de 3.30 Mbp (ausente en ambos parentales) (Fig. 26, 2B), la cual no se observó cuando se analizaron los geles teñidos con bromuro de etidio. Por tanto, en el cariotipo electroforético de esta cepa habría que considerar la banda de 3.30 Mbp como una banda separada de la de 3.17 Mbp. De nuevo, encontramos evidencias de que la banda de 3.17 Mbp puede contener, al menos, 2 cromosomas migrando conjuntamente.

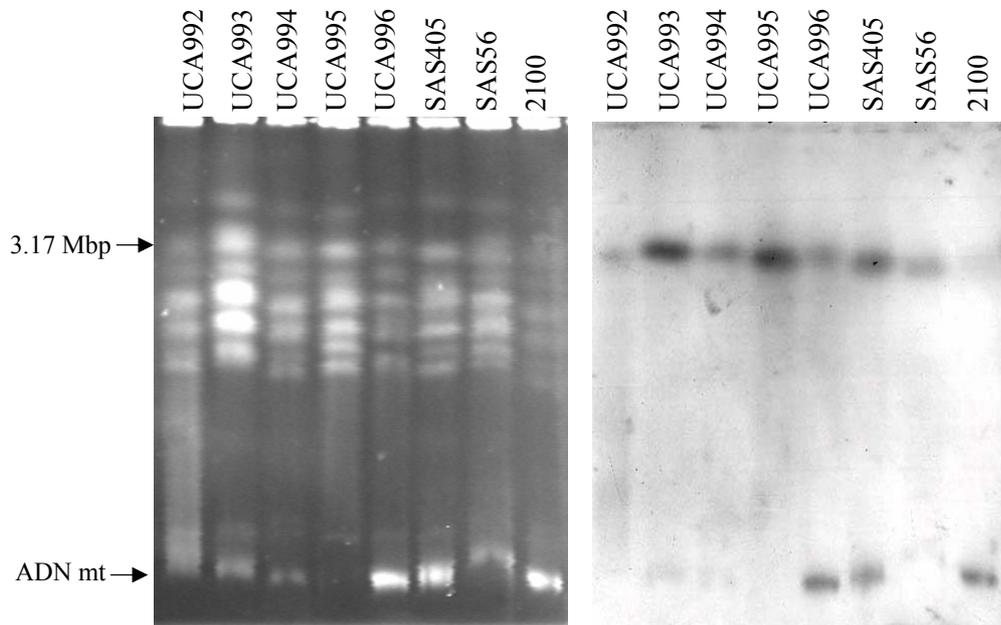


Figura 25. Hibridación del cariotipo electroforético de 8 cepas de *B. cinerea*, aisladas del campo, con una sonda de ADN ribosómico. A la izquierda se indican las bandas cromosómicas donde hibrida la sonda

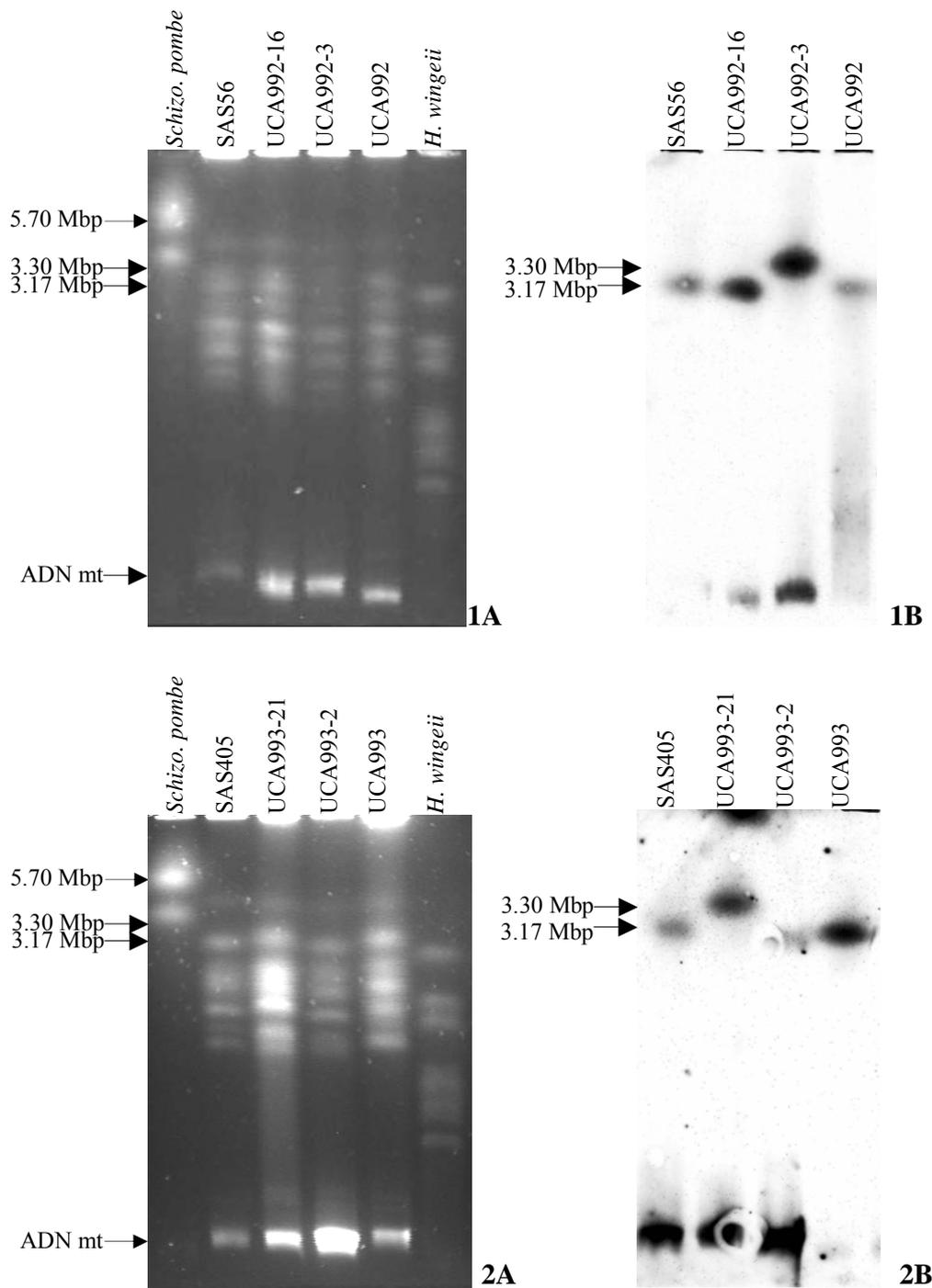


Figura 26. Polimorfismo cromosómico de *B. cinerea* detectado por PFGE (1A y 2A) e hibridación con ADN ribosómico (1B y 2B). 1: corresponde al PFGE e hibridación en los parentales SAS56 y UCA992 así como 2 descendientes de su cruzamiento. 2: corresponde al PFGE e hibridación en los parentales SAS405 y UCA993 así como 2 descendientes de su cruzamiento

5. 2.- Hibridación con una Sonda de ADN Telomérico

Todo cromosoma se caracteriza por la presencia de un centrómero y dos telómeros, estructuras, ambas, de vital importancia en los procesos de mitosis y meiosis. Dado que los telómeros son una estructura característica de los cromosomas, se planteó en el presente trabajo, la realización de la hibridación de los geles de electroforesis en campo pulsante con una sonda telomérica (TTAGGG)_n, obtenida mediante PCR (Material y Métodos, apartado 14.1), que nos permitiese confirmar que cada una de las bandas del cariotipo electroforético representaba, al menos, un cromosoma.

Se sometieron a estudio un total de 16 cepas de *B. cinerea*, 9 aisladas de campo (UCA992, UCA993, UCA994, UCA996, SAS56, 2100, 2850, Bd90 y T4) y 7 correspondientes a descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992 (UCA992-6, UCA992-13, UCA992-16, UCA992-21, UCA992-26, UCA992-75 y UCA992-93).

Como se puede observar en la figura 27, la secuencia telomérica hibridó en todas las bandas cromosómicas detectadas mediante electroforesis en campo pulsante, lo que indica que todas las bandas del cariotipo electroforético se corresponden, al menos, con un cromosoma. Además, la hibridación con la sonda telomérica desveló la existencia, en la cepa UCA992-16 (Fig. 27 y 28), de un cromosoma de gran tamaño (3.30 Mbp). Esta banda no fue identificada previamente con la tinción de los geles de electroforesis con bromuro de etidio, como una banda separada de la de 3.17 Mbp. Como consecuencia, esta cepa presenta un total 8 cromosomas, un tamaño genómico mínimo de 22.54 Mbp y además, define un nuevo patrón cromosómico al que se denomina P XXIV (Fig. 28).

La cepa UCA992-16 es uno de los descendientes estudiados del cruzamiento SAS56 × UCA992. La banda de 3.30 Mbp, detectada mediante la hibridación con la sonda telomérica en UCA992-16, fue previamente descrita en el cariotipo electroforético de su parental SAS56. En el apartado 4.1 de resultados, se analizó el número de cromosomas presente en la banda 3.30 Mbp en este cruzamiento, mediante el estudio de

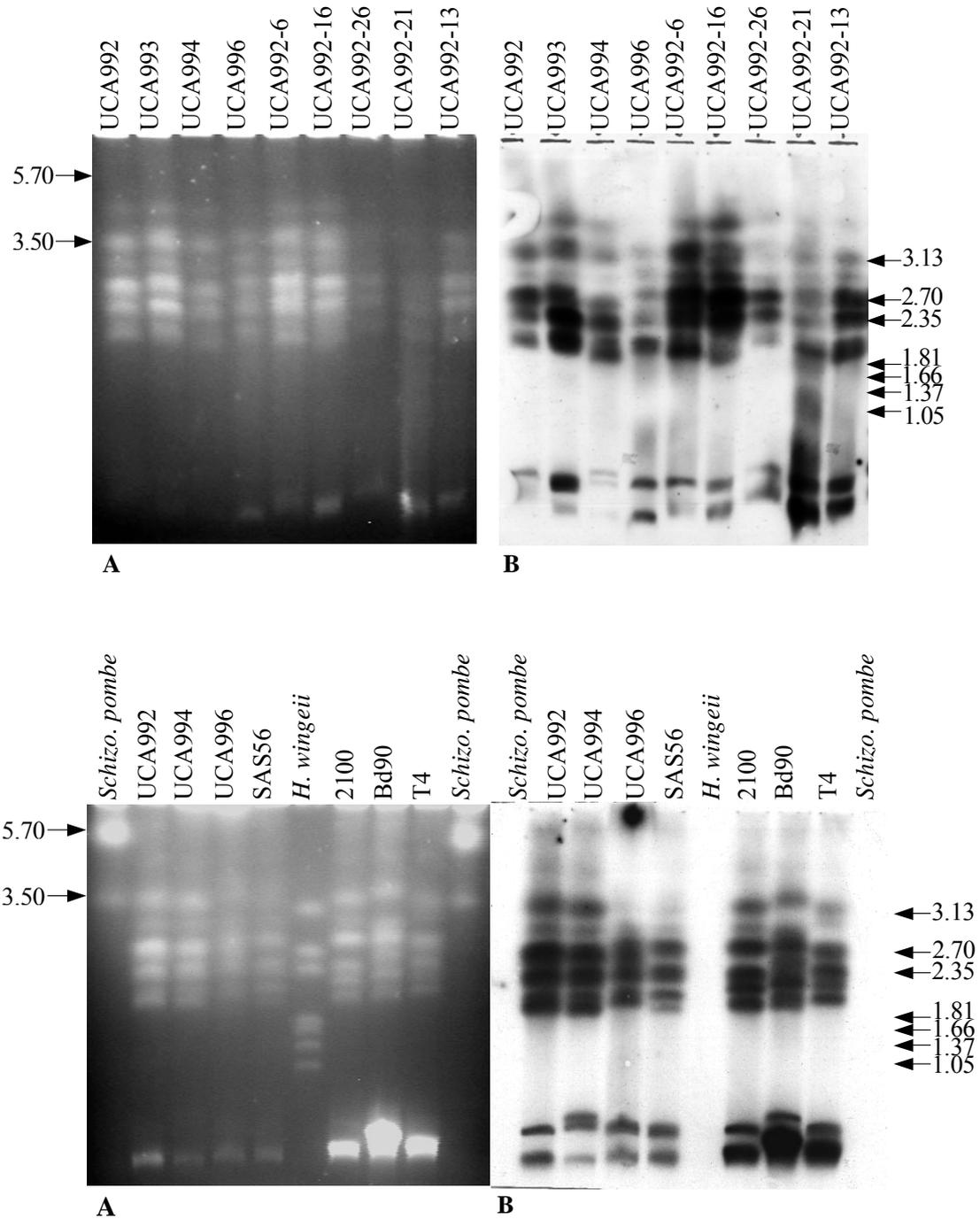


Figura 27. Cariotipos electroforéticos de 13 cepas de *B. cinerea* determinados mediante PFGE (A) e hibridación con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. A los lados, los tamaños moleculares de los marcadores en Mbp de *Schizo. pombe* (izquierda) y *H. wingeii* (derecha)

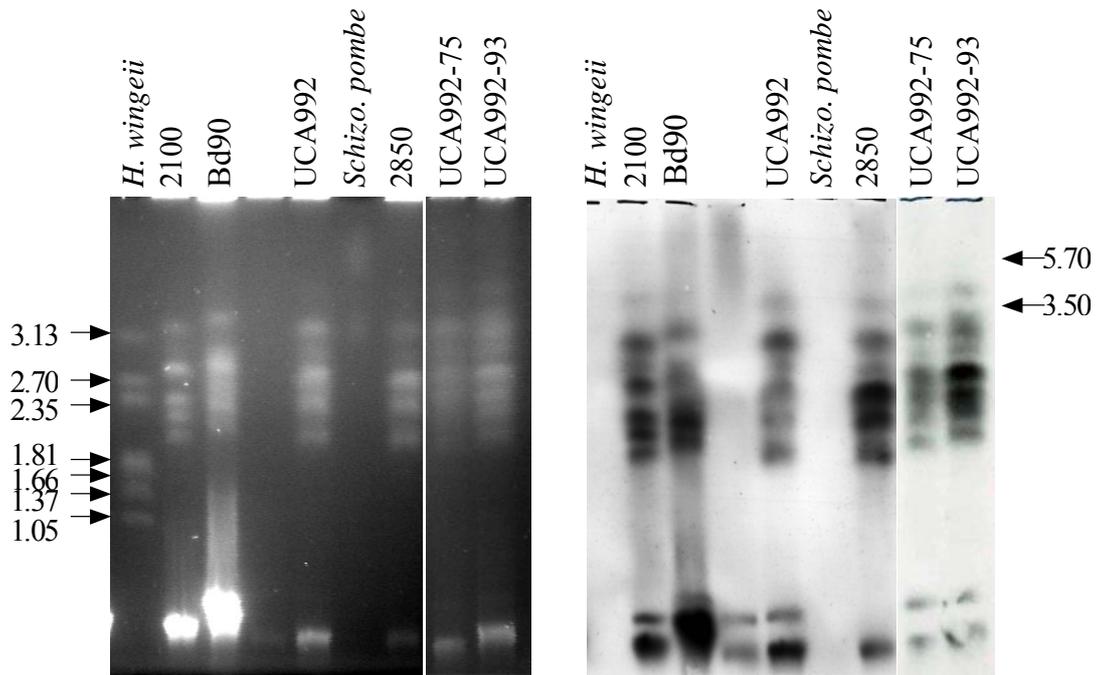


Figura 27 (Continuación). Cariotipo electroforético de 6 cepas de *B. cinerea* determinado mediante PFGE (A) e hibridación con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. A los lados, los tamaños moleculares de los marcadores en Mbp de *Schiz. pombe* (derecha) y *H. wingeii* (izquierda)

de la distribución χ^2 . La identificación de esta banda en el descendiente UCA992-16, modifica la razón presencia: ausencia de esta banda de 9:11 (Tabla 15) a 10:10. A partir de estos nuevo datos se calcula χ^2 , cuyo nuevo valor es cero, es decir, no existen diferencias significativas entre la frecuencia observada y esperada, por tanto, la banda de 3.30 Mbp está compuesta por un único cromosoma.

Además, la secuencia de ADN telomérico hibridó en la banda de mayor movilidad electroforética (Fig. 27), descrita previamente como ADN mitocondrial (Vallejo *et al.*, 1996). El estudio realizado por Bendich (1996), sobre la movilidad electroforética del ADN mitocondrial de hongos y plantas en PFGE, ha demostrado que el comportamiento de esta molécula en el gel es el de una molécula lineal, con un tamaño superior al que posee la molécula de ADN mitocondrial en la célula. Además, el ADN mitocondrial carece de secuencias del tipo de las secuencias teloméricas. La señal

de hibridación en la banda de menor tamaño, presentó distinta movilidad electroforética y desigual intensidad de hibridación entre las diferentes cepas. En la mayoría de ellas la señal de hibridación de esta última banda, presenta las características de una banda sencilla. Sin embargo, en otras como 2100, Bd90, T4, UCA992-21 y UCA992-13, la banda es de grosor mayor (Fig. 27). Este resultado, sugiere que en esa banda están comigrando el ADN mitocondrial junto a algunos fragmentos de ADN que se hayan podido fraccionar durante la preparación de la muestra, e incluso, algún minicromosoma.

Uno de los resultados más relevantes de la hibridación de los geles de electroforesis en campo pulsante con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n, fue la posibilidad de detectar los cromosomas de pequeño tamaño (Fig. 27). Estos sólo se habían observado en los cariotipos electroforéticos de algunas cepas aisladas de fresa (Huelva).

Los marcadores moleculares empleados en la electroforesis no presentan bandas en la región donde se resuelven los minicromosomas. No obstante, es conocido (Vollrath y Davis, 1987) que la movilidad electroforética y el tamaño de estas bandas están relacionados linealmente. Por tanto, empleando la regresión lineal que se establece entre la migración de las bandas de los marcadores y su tamaño (valor medio de $r^2 = 0.9889$), es posible pronosticar el tamaño de los minicromosomas. Se identificaron un total de 6 minicromosomas diferentes (Fig. 27 y 28), con tamaños de 787, 740, 618, 482, 400 y 357 Kbp. El minicromosoma de 484 Kbp es el más frecuente de todos ellos como se puede observar en 7 de las 16 cepas (UCA994, UCA996, UCA992, UCA992-6, UCA992-13, UCA992-16 y UCA992-21). Otro minicromosoma presentado por un alto número de cepas es el de 618 Kbp, que se encuentra en 5 cepas (UCA992-26, UCA992-75, 2100 y T4). En cambio, los restantes minicromosomas son específicos de una única cepa cada uno.

Además del tamaño, el número de minicromosomas entre las 16 cepas también fue variable, observándose ninguno, uno o dos minicromosomas por cepa (Fig. 27 y 28). Todas las cepas tuvieron un minicromosoma a excepción de las cepas UCA994 y 2850, que presentaron 2 y ningún minicromosoma respectivamente.

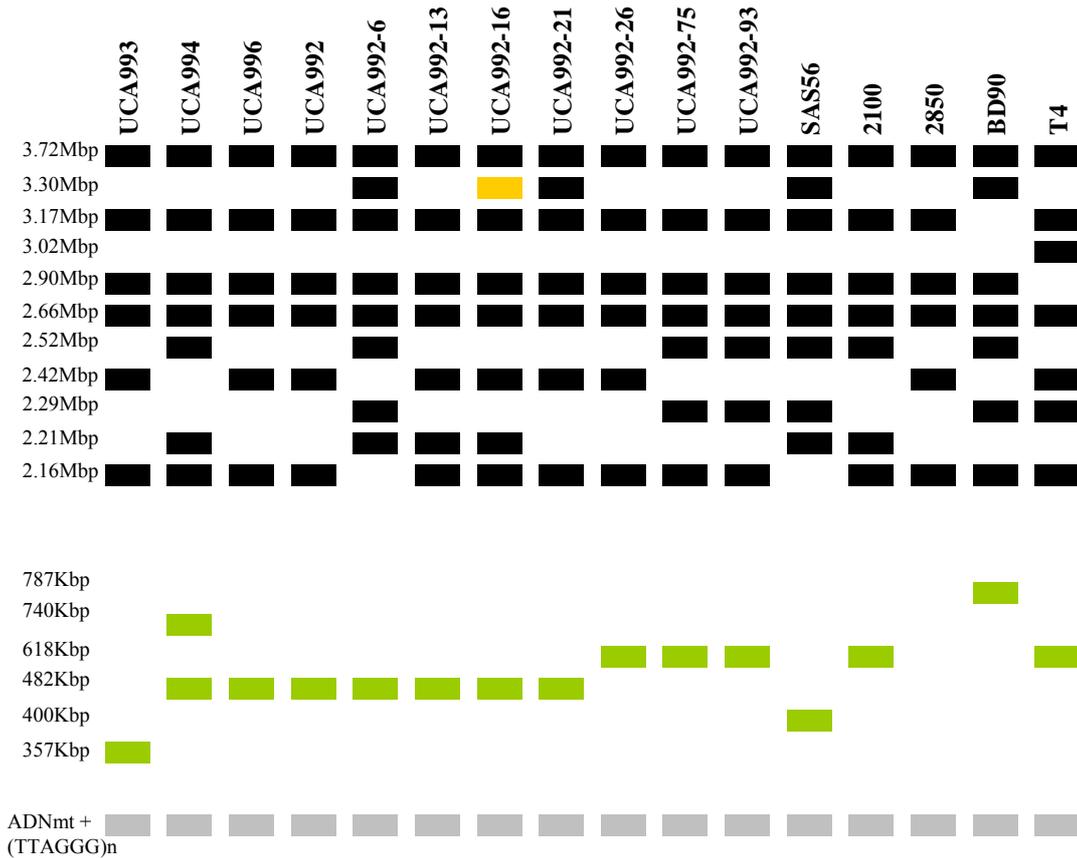


Figura 28. Esquema del cariotipo electroforético de 16 cepas de *B. cinerea* hibridado con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. Bandas verdes: minicromosomas; bandas grises: banda de mayor movilidad electroforética; banda amarilla: nueva banda identificada en la cepa UCA992-16 (P XXIV). ADNmt + (TTAGGG)_n: indica la banda donde comigran el ADN mitocondrial junto a algún minicromosoma o fragmento de cromosoma

Al analizar el comportamiento de estos minicromosomas en el cruzamiento, se observa que ningún descendiente presenta el minicromosoma detectado en el parental SAS56, mientras que 4 descendientes (UCA992-6, UCA992-13, UCA992-16 y

UCA996-21) si que poseen el del parental UCA992. Además, aparece un nuevo minicromosoma en los descendientes UCA992-26, UCA992-75 y UCA992-93.

Sobre la base de estos resultados, el número mínimo de cromosomas en *B. cinerea* osciló entre 6 y 9, siendo el valor más frecuente de 8 cromosomas por cepa (50 %). Teniendo en cuenta a los minicromosomas, la organización cromosómica de las 16 cepas de *B. cinerea* es la que se recoge en la figura 29, donde también se especifica la localización cromosómica del ADN ribosómico (bandas de color rojo) y la del ADN mitocondrial junto al posible minicromosoma o fragmento de cromosoma (ADNmt + (TTAGGG)n).

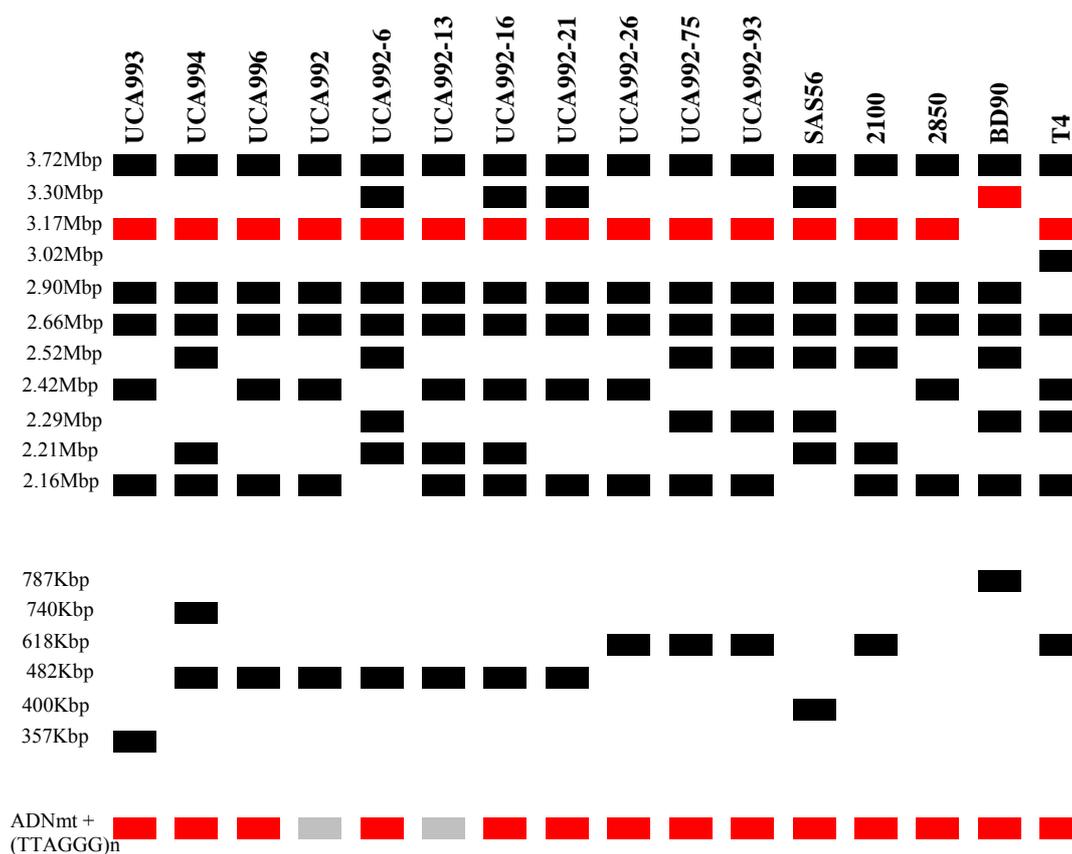


Figura 29. Organización cromosómica de *B. cinerea* determinada mediante la hibridación del PFGE con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n y el ADN ribosómico. Banda roja: localización del ADN ribosómico; banda gris y ADNmt + (TTAGGG)_n: banda donde comigran el ADN mitocondrial junto a algún minicromosoma o fragmento de cromosoma

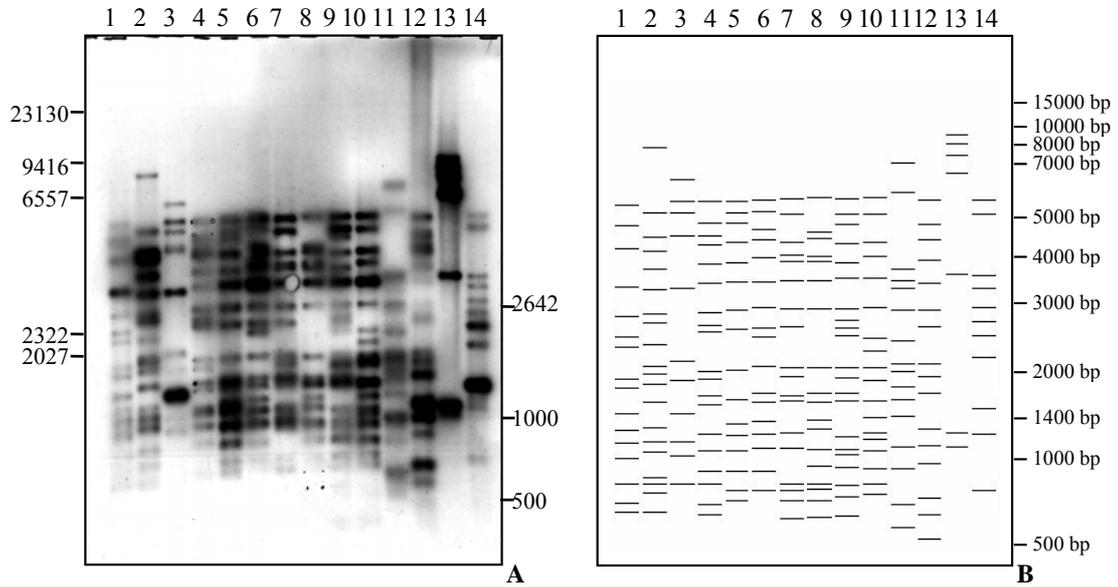
6.- Hibridación de los RFLP con una Secuencia de ADN Telomérico (TTAGGG)_n

La hibridación del ADN del patógeno digerido con enzimas de restricción, empleando como sonda una secuencia telomérica, es una poderosa herramienta para la determinación del número de cromosomas. Esta es especialmente útil en microorganismos en los que no es posible obtener protoplastos, o en aquellos donde el tamaño de los cromosomas impide una adecuada resolución de los mismos. En el presente trabajo se ha digerido el ADN de 9 cepas de *B. cinerea* (UCA992, UCA993, UCA994, UCA996, SAS56, 2100, 2850, Bd90 y T4) así como de 5 descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992 (UCA992-16, UCA992-21, UCA992-26, UCA992-75, UCA992-93), con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI* y *NotI*. A continuación, se hibridó el patrón de restricción con la sonda (TTAGGG)_n, obtenida como se indica en el apartado 14.1 del capítulo Material y Métodos.

Tras la digestión del ADN de las 14 cepas de *B. cinerea* con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* y *PstI*, e hibridación con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n (Fig. 30 y 31), se observó que cada cepa presentaba un patrón exclusivo para cada una de las enzimas, detectándose un mínimo de 6 y un máximo 21 telómeros por cepa (Tabla 16). Sin embargo, el patrón de banda que se obtenía tras la digestión con *NotI* y posterior hibridación no tuvo suficiente resolución, por lo que esta enzima no fue considerada en la determinación del número mínimo de cromosomas en *B. cinerea*.

Una vez determinado el número de telómeros, es posible estimar el mínimo número de cromosomas como el número de telómeros dividido por dos, lo que supone que el número de cromosomas en *B. cinerea* oscila entre 8 y 11 (Tabla 16), valor que supera al obtenido mediante la técnica de hibridación de los geles de PGFE con la secuencia telomérica. No obstante, en la mayoría de las cepas se puede observar que

EcoRI



HindIII

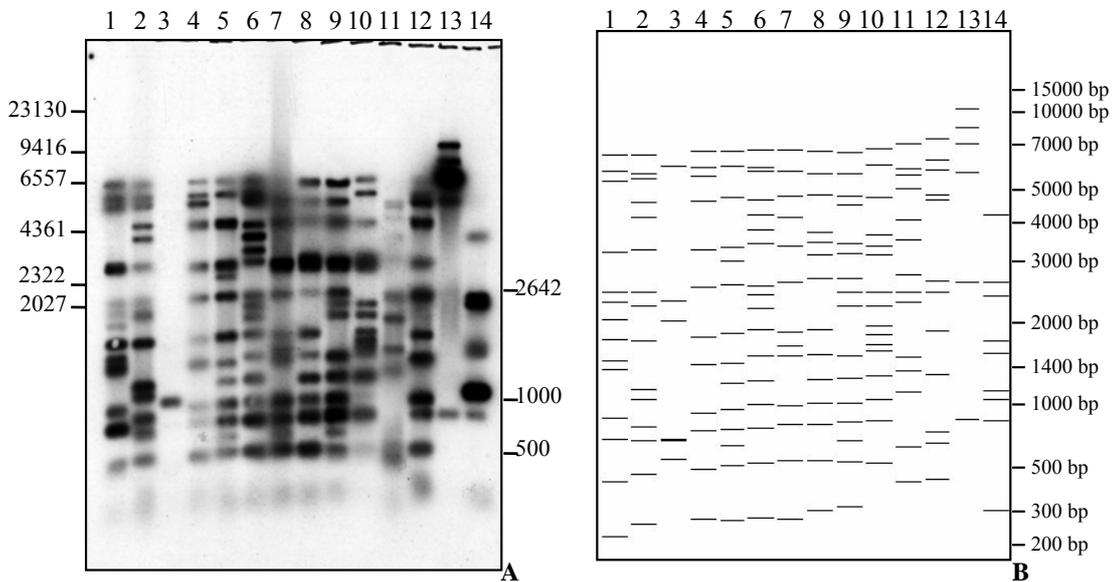


Figura 30. (A) Hibridación con la secuencia (TTAGGG)_n del ADN de 14 cepas de *B. cinerea* digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII*. A los lados, los tamaños moleculares (bp) de los marcadores λ -*HindIII* (izquierda) y marcador XIV (derecha). (B) Asignación de bandas mediante la utilización del programa Fingerprinting II (BioRad). 1: UCA993; 2: UCA994; 3: UCA996; 4: UCA992; 5: UCA992-16; 6: UCA992-21; 7: UCA992-26; 8: UCA992-75; 9: UCA992-93; 10: SAS56; 11: 2100; 12: 2850; 13: Bd90; 14: T4

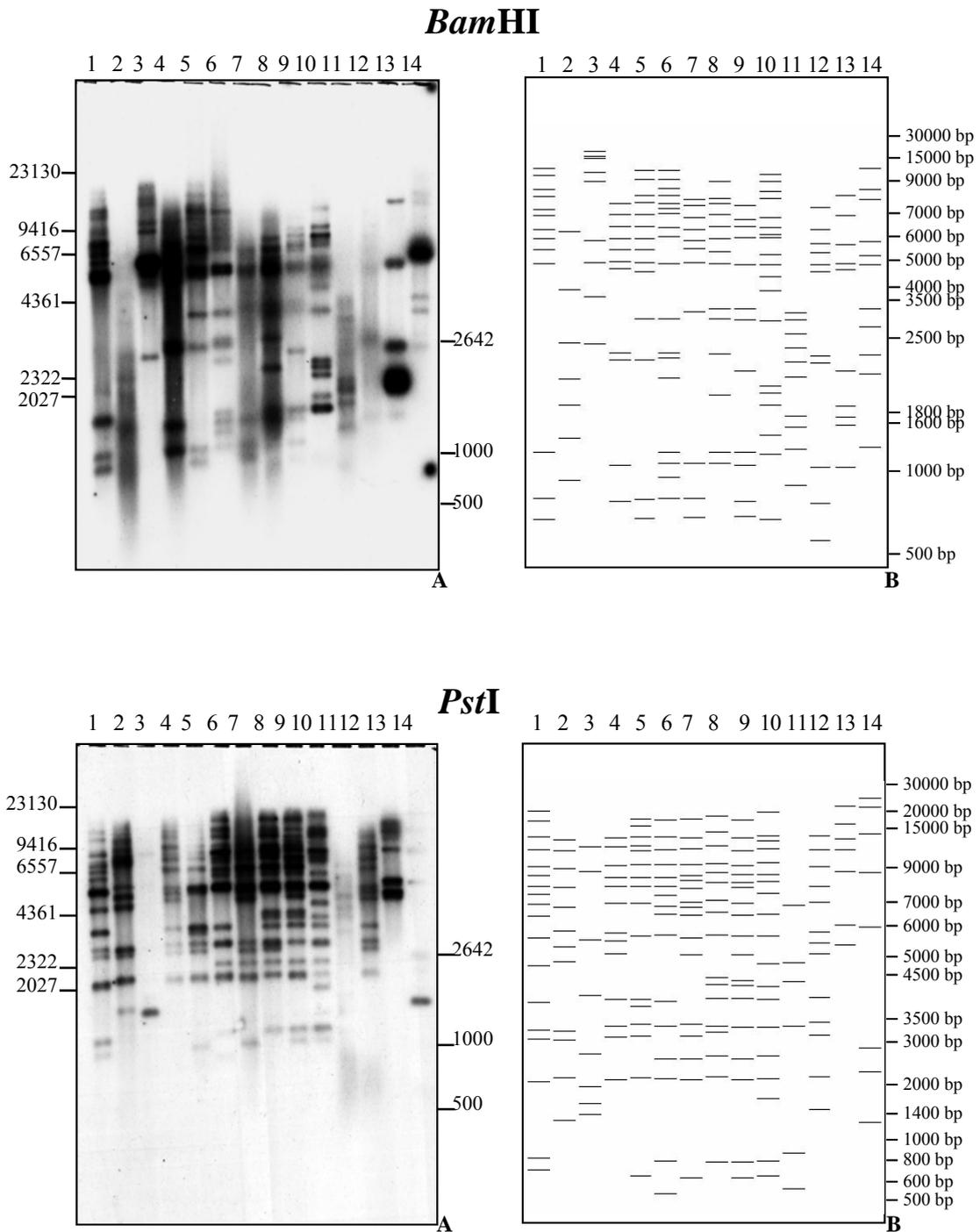


Figura 31. (A) Hibridación con la secuencia (TTAGGG)_n del ADN de 14 cepas de *B. cinerea* digerido con la enzima *Bam*HI y *Pst*I. A los lados, los tamaños moleculares (bp) de los marcadores λ -*Hind*III (izquierda) y marcador XIV (derecha). (B) Asignación de bandas mediante la utilización del programa Fingerprinting II (BioRad). 1: UCA993; 2: UCA994; 3: UCA996; 4: UCA992; 5: UCA992-16; 6: UCA992-21; 7: UCA992-26; 8: UCA992-75; 9: UCA992-93; 10: SAS56; 11: 2100; 12: 2850; 13: Bd90; 14: T4

existe alguna banda con una intensidad mayor a las restantes (Fig. 30 y 31). Esto implica que estas bandas contienen más de un telómero migrando conjuntamente, lo que explicaría las diferencias observadas en el número de bandas que se obtienen en una misma cepa por cada enzima ensayada. En las cepas UCA996, Bd90 y T4 el número de telómeros es menor al esperado (Tabla 16), dado que el número de cromosomas resueltos por PFGE e hibridación con la secuencia telomérica, es de 7 en UCA996 y 8 en las otras dos cepas. Este comportamiento se presenta de una forma más acusada en la cepa Bd90, en la que además del bajo número de telómeros obtenidos con las 4 enzimas, existe una banda de intensidad y grosor muy superior, donde deben comigrar un número elevado de telómeros de tamaño similar. Este resultado hace en estas 3 cepas, el número de cromosomas determinados mediante la técnica *telomeric fingerprinting* sea por defecto.

Cepas	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>BamHI</i>	<i>PstI</i>	Nº mínimo cromosomas
UCA992	19	12	11	13	10
UCA993	16	14	13	18	9
UCA994	20	15	7	12	10
UCA996	11	6	9	8	6*
SAS56	18	15	19	19	10
2100	16	15	10	6	8
2850	16	12	11	13	8
Bd90	7	6	10	7	5*
T4	11	9	11	8	6*
UCA992-16	16	14	14	16	8
UCA992-21	17	17	18	16	9
UCA992-26	18	13	11	17	9
UCA992-75	18	14	14	17	9
UCA992-93	21	16	12	19	11

Tabla 16. Número de telómeros obtenidos mediante hibridación de los RFLP con la sonda (TTAGGG)_n. *: estimación por defecto

La digestión del ADN de las 14 cepas de *B. cinerea* con la enzima *EcoRI* y posterior hibridación con la secuencia telomérica, dio lugar a un total de 52 bandas diferentes (Fig. 30), comprendidas entre 8.9 Kbp y 510 bp. Estas se combinan originando 14 patrones diferentes, es decir, que cada cepa analizada posee su propio perfil identificativo. Además, no existe ninguna banda en común entre las 14 cepas

Resultados...

estudiadas. El número de telómeros determinados mediante *telomeric fingerprinting* con *EcoRI* oscila entre 7 en la cepa Bd90 y 21 en la UCA992-93 (Fig. 30, Tabla 16), siendo esta enzima con la que se logra resolver el mayor número de telómeros en 10 de las 14 cepas analizadas.

Si se examina el patrón de bandas obtenido con *EcoRI* en las cepas que actúan como parentales y los cinco descendientes (Fig. 30), se comprueba que todas las bandas de la cepa UCA992 (parental masculino) están presentes en los 5 descendientes. Sin embargo, en la cepa SAS56 (parental femenino) existe dos bandas exclusivas, de 2.1 y 1.05 Kbp, que no se encuentran en ningún descendiente. La banda de 2.1 Kbp tampoco se visualiza en las cepas aisladas de campo sin embargo, la de 1.05 Kbp si aparece en las cepas UCA993, UCA994 y UCA996. También, se observa que en el descendiente UCA992-93 aparece una banda, de 2.6 Kbp, que no se encuentra en ninguno de los parentales ni en los demás descendientes. Por otro lado, se resuelven 5 bandas (5.3, 3.2, 1.85, 1.5 y 1.15 Kbp) que están presentes en ambos parentales así como en los cinco descendientes.

La digestión con la enzima *HindIII* (Fig. 30) originó un total de 60 bandas de distintos tamaños en un rango que va desde 12 Kbp a 230 bp. Estas se organizan en 14 patrones diferentes, uno por cepa, sin que exista ninguna banda común entre todos ellos. El número de telómeros resueltos, por cepa, osciló entre 6 (UCA996 y Bd90) y 17 (UCA992-21), como se puede observar en la tabla 16. En cuanto a los datos obtenidos en el cruzamiento (Fig. 30), se observó que las bandas de cada uno de los parentales aparecen en los descendientes y las bandas comunes en los dos parentales, lo están también en los 5 descendientes. No obstante, hay 4 descendientes en los que se localizan 1 o 2 bandas que no están en los parentales, UCA992-26 (4.1 Kbp), UCA992-93 (4.4 Kbp y 650 bp), UCA992-16 (3.1 Kbp y 650 bp), UCA992-21 (4.1 Kbp y 3.7 Kbp).

La digestión con las enzimas *BamHI* y *PstI* originaron un gran número de telómeros de elevado peso molecular, dando lugar a perfiles complejos. Con el propósito de lograr resolver mejor las bandas de gran tamaño, la concentración de agarosa de los geles se disminuyó hasta un 0.5 %.

En cuanto a los resultados obtenidos con la enzima *Bam*HI, se han resuelto un total de 53 bandas distintas, tras la hibridación con la secuencia telomérica, con tamaños que van desde los 20 Kbp a los 550 bp (Fig. 31). Cada cepa presenta su propio patrón, sin que exista ninguna banda común entre todas ellas. Como se muestra en la tabla 16, el número mínimo y máximo de telómeros por cepa es de 7 (UCA994) y 19 (SAS56), respectivamente.

Al comparar el número de telómeros obtenidos en cada cepa por las 4 enzimas (Tabla 16), la digestión con *Bam*HI es la que origina el mayor número de telómeros en 4 de las 14 cepas analizadas (SAS56, Bd90, T4 y UCA992-21). Además, el número de telómeros obtenidos en la cepa T4, coincide con los observados tras la digestión con la enzima *Eco*RI.

Al analizar los patrones en los descendientes y parentales del cruzamiento SAS56 × UCA992, todas las bandas presentes en el parental masculino están entre los 5 descendientes. Sin embargo, en el parental femenino hay 6 bandas (6.1, 4.1, 3.8, 2.25, 1.9 y 1.4 Kbp) que no aparecieron en ningún descendiente, aunque sí en algunas de las cepas de *B. cinerea* aisladas de campo (Fig. 31). Por último, en cada descendiente aparece, al menos, una nueva banda que no está presente en sus parentales (Fig. 31) y cuyos tamaños son: 11 Kbp (UCA992-16 y UCA992-21), 7.2 Kbp (UCA992-21), 3.1 Kbp (UCA992-26, UCA992-75 y UCA993-93), 2.35 Kbp (UCA992-21 y UCA992-93) y 925 bp (UCA992-21).

En el caso de la digestión del ADN de *B. cinerea* con *Pst*I y posterior hibridación con la secuencia (TTAGGG)_n, se pueden observar 45 bandas diferentes entre 25 Kbp y 525 bp (Fig. 31), presentando cada cepa un patrón específico. Al igual que ha ocurrido con las otras enzimas, no existe ninguna banda común entre todas ellas. El número mínimo de telómeros es de 6 en la cepa 2100 y el máximo de 19 en SAS56 y UCA992-93 (Tabla 16). Como se puede observar en la tabla 16, el mayor número de telómeros obtenidos en la cepa UCA993 es el resultante de la digestión con la enzima *Pst*I. Un comportamiento similar se puede apreciar en las cepas SAS56 y UCA992-16 aunque, en

Resultados...

ellas el número de telómeros obtenidos con esta enzima coincide con el de *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente.

Cuando se analizan los patrones obtenidos tras la digestión con *Pst*I de SAS56, UCA992 y sus 5 descendientes (Fig. 31), se observa que las bandas presentes en ambos parentales lo están en todos sus descendientes a excepción de la banda de 3.85 Kbp, que no aparece en la cepa UCA992-26. En el parental SAS56 existen 3 bandas (20 Kbp, 4.9 Kbp y 1.7 Kbp) que no se encuentran en los descendientes, aunque la de 4.9 Kbp si la presenta la cepa 2100. Por primera vez, se ha detectado en el otro parental (UCA992) una banda (5.5 Kbp) que no segrega en los descendientes, aunque sí aparece en la cepa 2850. Del mismo modo que ha ocurrido con las demás enzimas, se localizan bandas en los descendientes que no están en los parentales (Fig. 31). El tamaño de estas bandas es de 18.6 Kbp (común en los 5 descendientes), 6.7 Kbp (UCA992-26) y 4.3 Kbp (UCA992-75 y UCA992-93).

6. 1.- Estimación del Número de Cromosomas

Teniendo en cuenta los datos obtenidos mediante la hibridación con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n, tanto de los geles de PFGE como del ADN digerido con las enzimas de restricción (Tabla 17), es posible establecer el número de cromosomas de *B. cinerea* entre 7 y 11, de manera que existe una sola cepa (UCA992-93) con 11 cromosomas, tres de ellas (UCA992, UCA994 y SAS56) con 10 cromosomas, cinco (UCA993, UCA992-16, UCA992-21, UCA992-26 y UCA992-75) con un total de 9 cromosomas, otras cuatro (2100, 2850, Bd90 y T4) con 8 cromosomas y tan sólo una cepa (UCA996) con 7 cromosomas. Por tanto, son 9 cromosomas el número más frecuente (35.7 %) en el cariotipo de *B. cinerea*.

La técnica *telomeric fingerprinting* ha permitido determinar el número más alto de cromosomas en todas las cepas a excepción de 2100, UCA996, Bd90, T4 y UCA992-16. En el caso de la cepa 2100, el número de cromosomas obtenidos por ambas técnicas

coincidió. Mientras que en el resto, la hibridación de los geles de PFGE fue la más resolutive.

Si se analiza el número de cromosomas obtenidos en las cepas que fueron aisladas de vid (UCA992, UCA993, UCA994, SAS56 y Bd90), estas presentaron 8, 9 ó 10 cromosomas. Por tanto, no es posible establecer ninguna relación entre el número de cromosomas por cepa y el huésped para el caso de las que han sido aisladas de la vid.

Cepas	PFGE y (TTAGGG)_n	<i>Telomeric Fingerprinting</i>
UCA992	7	10
UCA993	7	9
UCA994	9	10
UCA996	7	6*
SAS56	9	10
2100	8	8
2850	6	8
Bd90	8	5*
T4	8	6*
UCA992-16	9	8
UCA992-21	8	9
UCA992-26	7	9
UCA992-75	8	9
UCA992-93	8	11

Tabla 17. Número mínimo de cromosomas obtenido mediante *telomeric fingerprint* e hibridación del cariotipo electroforético con una secuencia de ADN telomérico. *: estimación por defecto

Las cepas que actuaron como parentales en el cruzamiento analizado (SAS56 × UCA992) muestran 10 cromosomas cada una. De los 5 descendientes estudiados, 4 de ellos poseen 9 cromosomas y tan sólo uno (UCA992-93) muestra 11 cromosomas, valor superior al de los parentales.

6. 2.- *Estudio de la Variabilidad en B. cinerea*

A partir del estudio combinado de las bandas que se originan tras la digestión con las cuatro enzimas e hibridación con la secuencia telomérica, se establece un total de 210 caracteres binarios. Sobre la base de estos caracteres se calculó la matriz de similitud (Tabla 18), que fue sometida al análisis de cluster utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) (Fig. 32).

El análisis de cluster reveló un alto grado de variabilidad entre las 14 cepas de *B. cinerea* (Fig. 32), las cuales presentaron, tan sólo, un 22 % de similitud total. Como se puede observar en el dendrograma, las cepas con mayor similitud son UCA992 y 2850 (69.35 %), ambas cepas presentan una morfología conidial y el mismo patrón electroforético. Sin embargo, fueron aisladas de diferentes huéspedes (vid y bulbo de azafrán), y contienen distinto número de minicromosomas, uno la cepa UCA992 y ninguno, 2850. Entre las demás cepas aisladas de campo se puede observar un alto grado de variabilidad. Según la tabla 18, las cepas 2100 y UCA996 son las más diferentes, con un valor de 11.24 % para el coeficiente de similitud.

Las cepas SAS56 y UCA992, empleados como parentales en el cruzamiento, presentan un 41.17 % de similitud (Tabla 18). De ambos parentales, SAS56 es el que presenta menor variabilidad con los 5 descendientes analizados (Fig. 32). No obstante, si se analizan los datos de la matriz de similitud (Tabla 18), los descendientes UCA992-16, UCA992-26 y UCA992-75 tienen mayor semejanza con el parental UCA992 (64.35, 65.45 y 61.62 %, respectivamente) mientras que, UCA992-21 y UCA992-93 se parecen más al parental SAS56 (60.17 y 57.40 %, respectivamente).

Al estudiar la similitud que existe entre los 5 descendientes, se observa que son UCA992-21 y UCA992-75 los más parecidos entre sí (66.25 %). A su vez, estas dos cepas muestran un 63.90 % de similitud con UCA992-93. El descendiente UCA992-26 revela un 62.57 % de similitud con las tres cepas anteriores. Y por último, UCA992-16 un 58.53 % con todos ellos.

	UCA992-21	UCA992-75	UCA992-93	UCA992-26	UCA992-16	SAS56	UCA993	UCA992	2850	UCA994	T4	2100	UCA996	Bd90
UCA992-21	100,00													
UCA992-75	66,25	100,00												
UCA992-93	63,90	63,91	100,00											
UCA992-26	57,22	64,59	62,57	100,00										
UCA992-16	62,82	59,83	55,68	58,53	100,00									
SAS56	60,17	55,39	57,40	52,29	57,33	100,00								
UCA993	55,66	43,05	49,62	50,49	55,77	52,87	100,00							
UCA992	57,97	61,62	54,49	65,45	64,33	41,17	56,34	100,00						
2850	43,02	45,20	45,57	47,54	51,25	32,11	39,11	69,35	100,00					
UCA994	41,95	31,65	36,29	39,15	38,54	39,56	35,79	48,50	40,87	100,00				
T4	37,16	33,13	32,14	36,44	35,82	33,90	28,67	28,21	26,21	30,45	100,00			
2100	33,23	30,21	32,81	20,82	21,07	27,96	22,43	23,01	27,63	30,45	21,54	100,00		
UCA996	24,53	20,94	22,21	20,19	25,27	29,39	26,91	22,51	24,88	24,89	29,92	11,24	100,00	
Bd90	21,22	22,82	20,07	26,23	21,69	19,83	19,95	26,66	22,81	22,50	21,95	12,23	16,47	100,00

Tabla 18. Matriz de similitud elaborada a partir de los valores de *telomeric fingerprinting*

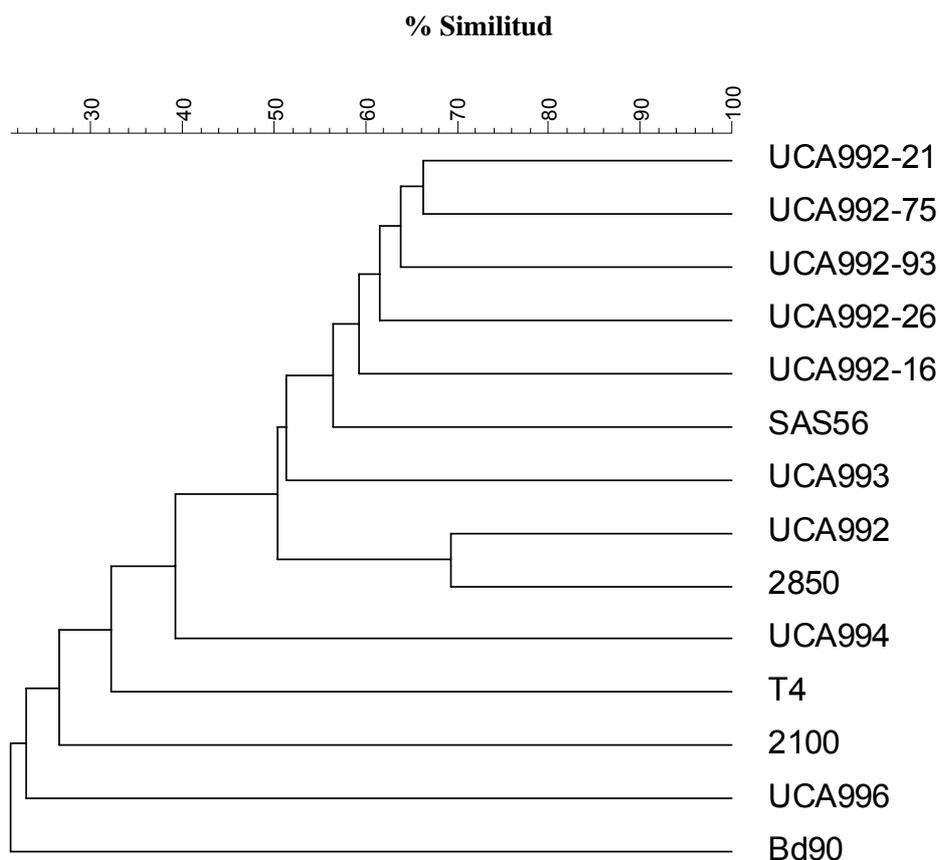


Figura 32. Dendrograma construido basándose en el polimorfismo de los RFLP de las 14 cepas de *B. cinerea* tras la hibridación con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n

Si en el estudio de la variabilidad de las cepas, se tiene en cuenta además de las bandas obtenidas mediante *telomeric fingerprinting*, las de la hibridación de los geles de PFGE con la secuencia telomérica, el análisis de cluster produce un dendrograma como el que se recoge en la figura 33. De nuevo, se observa una alta variabilidad entre las 14 cepas analizadas. Y de las cepas aisladas de campo son UCA992 y 2850 las que presentan mayor similitud (62.15 %).

De los descendientes, la principal diferencia con respecto al anterior análisis es que los dos descendientes más semejantes son UCA992-75 y UCA992-93 (63.85 %) (Fig. 33). Además, se observa otro cluster formado por UCA992-16 y UCA992-21, con un 60.25 % de similitud. Las dos primeras cepas muestran un 57.83 % de semejanza con UCA992-26 y las cepas UCA992-16 y UCA992-21 un 53.49 % con las 3 anteriores.

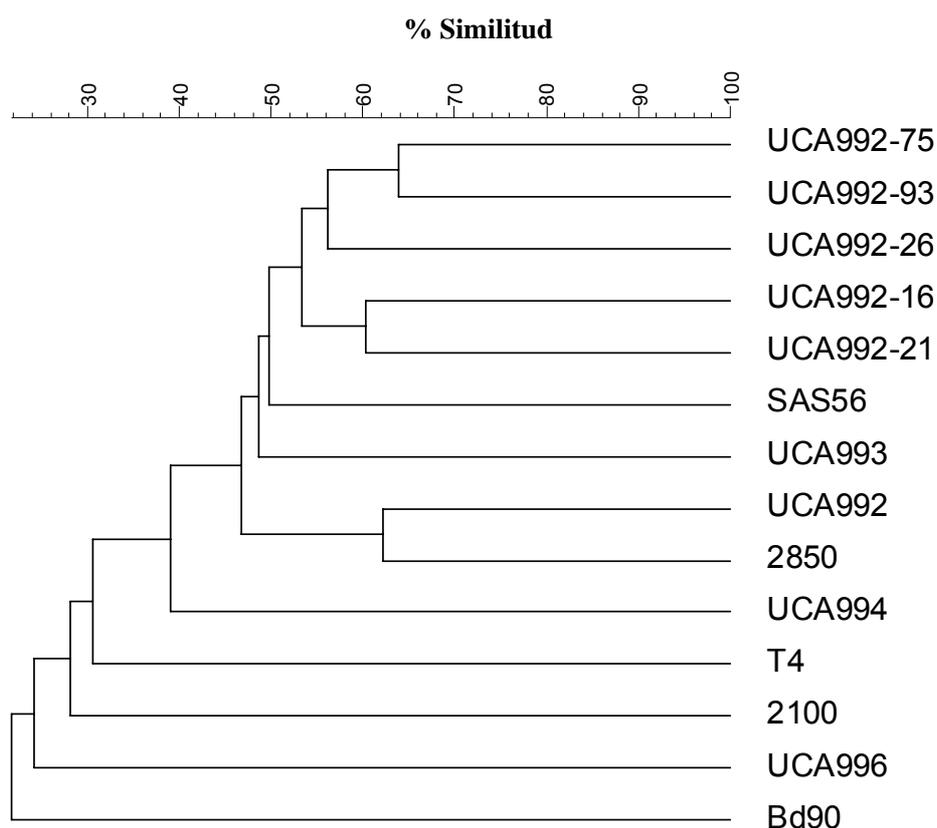


Figura 33. Dendrograma basado en el *telomeric fingerprinting* y la hibridación de los geles de electroforesis en campo pulsante con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n

Discusión

1.- Estudio de la Competitividad de *B. cinerea* en el Marco de Jerez

El cultivo de la vid es susceptible de sufrir numerosas enfermedades producidas por hongos filamentosos, las cuales ponen en serio peligro la producción de las cosechas y causan alteraciones en las características organolépticas del vino. En este sentido, es *B. cinerea* el hongo fitopatógeno más estudiado, sin embargo, existen otros patógenos que pueden atacar a la vid como *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., etc.

En el presente trabajo se pretendió conocer las distintas poblaciones de hongos filamentosos presentes en los viñedos del marco vitivinícola de Jerez, así como la influencia de la inoculación de una cepa de laboratorio de *B. cinerea* sobre la microbiota propia de la vid. Para ello se realizó un muestreo de dos parcelas de vid, *Vitis vinifera*, variedad Palomino Fino, pertenecientes a dos bodegas del marco de Jerez. A continuación, se inoculó con una suspensión de conidios de la cepa *B. cinerea* UCA992 (cepa de laboratorio obtenida por el aislamiento sucesivo de conidios producidos *in vitro* a partir de un aislado de campo), cada una de las vides que habían sido previamente pinchadas con el objeto de favorecer el desarrollo del patógeno. Transcurridos 15 días desde la inoculación, se volvieron a muestrear ambas parcelas. Se estudió la microbiota presente en las vides antes y después de la inoculación.

Los géneros fúngicos aislados en la viña fueron *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium*. En general, los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium* fueron los mayoritarios, aunque con comportamientos diferentes cada año, mientras que *Botrytis* y *Penicillium* fueron más regulares pero con una presencia minoritaria. Los hongos causantes de podredumbre secundarias en la vid, como son, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, fueron los géneros dominantes en estudios previos realizados en viñedos de Chile (Pszczolkowski *et al.*, 2001), Portugal (Abrunhosa *et al.*, 2001), el estado de Washington (Dugan *et al.*, 2002), el Valle de San Joaquín en California (Duncan *et al.*, 1995) y en la Costa del Levante (Bau *et al.*, 2005) y Norte (Bellí *et al.*, 2005) de España. Cotejando estos datos con los nuestros,

comprobamos que los géneros de hongos presentes en la vid son comunes, aunque la frecuencia con la que se presentan varía en función de las variedades de vid cultivadas, los daños físicos de la uva, las técnicas de cultivo, la situación geográfica y las condiciones climatológicas.

El género *Botrytis* fue el que se presentó con menor frecuencia en las dos parcelas (menos del 10 % de la micobiota), lo que ha sido también observado por diversos autores (Bau *et al.*, 2005; Dugan *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 2006). Dugan *et al.* (2002) demostraron que es la competición por el nicho con el resto de hongos presentes en la vid la causa de que el número de colonias de estos últimos sea superior al de *B. cinerea*. En otros frutos como el Kiwi, Walter *et al.* (1999) describieron una baja presencia de *B. cinerea* como consecuencia de la capacidad que pueden presentar los demás hongos saprofitos para producir compuestos inhibitorios del crecimiento de *Botrytis*.

Al analizar la micobiota de la viña 15 dpi, se observó que la micobiota total, así como el número de colonias de *B. cinerea*, en los liños control, experimentaron un incremento en todos los casos, a excepción de la parcela A en el año 2001. Durante el periodo de maduración de la vid, el cual coincide con los meses de julio y agosto en el marco de Jerez, tiene lugar un incremento progresivo de los azúcares de la uva, lo que favorece el desarrollo de la población de hongos de la vid. Sin embargo, la parcela A durante el año 2001 tiene un comportamiento contrario a lo esperado. Este hecho podría estar relacionado con factores externos como son: las condiciones climáticas en esta parcela, las prácticas agrícolas seguidas por el viticultor y los daños físicos causados por la población de insectos presentes en la vid (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002).

La inoculación con la cepa de *B. cinerea* UCA992 provocó un descenso del número de colonias de las cepas de *Botrytis* durante el año 2000 y sólo en la parcela B durante el año 2001. Resultados similares se han obtenido por Akua *et al.* (2004), quienes concluyen que la falta de implantación de una cepa de *Botrytis* se debe no sólo a las características de la propia cepa empleada como inóculo artificial, sino también, a las características de la viña y a la naturaleza del inóculo natural de la vid, lo que puede asimismo, aplicarse a nuestro estudio.

Al analizar el efecto que tuvo la inoculación con *B. cinerea* sobre cada uno de los géneros detectados en la viña, se descubrió un resultado diferente para cada patógeno. Según nuestros resultados, no es posible establecer un modelo que prevea el comportamiento de la micobiota de la vid tras la inoculación con una cepa de laboratorio de *B. cinerea*. No obstante, sí es posible concluir que la inoculación modifica el desarrollo de la micobiota propia de la vid, del mismo modo que modifica el desarrollo de cepas silvestres de *B. cinerea*.

Aspergillus ha sido el género detectado como mayoritario en la parcela B durante los dos años de seguimiento de la viña y en la parcela A en el año 2000. La producción de micotoxinas con actividad antifúngica, por parte de este patógeno, podría ser la causa de la supremacía de este hongo. El género *Aspergillus*, especialmente la sección *Nigri* ha sido descrito como el principal responsable de la producción de ocratoxina A en viñas de Argentina y Brasil (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002), Francia (Sage *et al.*, 2002) e Italia (Battilani *et al.*, 2003). La ocratoxina A es una micotoxina común, la cual está siendo objeto de numerosos estudios al tratarse de una sustancia nefrotóxica, carcinogénica, teratogénica, inmunotóxica y posiblemente neurotóxica. Un reciente estudio sobre las especies ocratoxigénicas que están presentes en las viñas localizadas en la costa mediterránea de España, realizado por Bau *et al.* (2005), demostró la existencia de especies de *Aspergillus carbonarius* productoras de ocratoxina A en la uva Palomino Fino del marco de Jerez, aunque en unos niveles medios inferiores al valor límite impuesto por la Unión Europea (2 µg /Kg de uva) (European Comisión, 2002). También se ha demostrado que la especie *Aspergillus niger* es capaz de producir ácido oxálico, con actividad antifúngica, así como otros metabolitos secundarios tales como malforminas, naphto-r-pyrones, nigerazina B y nigragilin, cuyos efectos sobre los hongos son aún desconocidos, aunque sí está demostrada su toxicidad frente a plantas, insectos y ratones (Blumenthal, 2003). Dada la gran capacidad del género *Aspergillus* de producir metabolitos tóxicos, en algunos casos con actividad antifúngica probada, cabría esperar que el predominio de este género frente a *Penicillium*, *Cladosporium* y *Botrytis* en las parcelas estudiadas en el presente trabajo, esté relacionado con la actividad de los metabolitos producidos por el mismo.

2.- Bioensayos de Patogenicidad

La enorme variabilidad del hongo *B. cinerea* así como el complejo mecanismo de infección que éste presenta, ha imposibilitado la existencia de un adecuado control racional del patógeno. La optimización del método de obtención de los apotecios bajo condiciones controladas de laboratorio, ha permitido determinar la compatibilidad sexual del patógeno (Faretra *et al.*, 1988a) así como el control genético de la resistencia a fungicidas. Sin embargo, aún hoy día no se tienen datos sobre el control genético de la patogenicidad. Con el objetivo de contribuir al control eficaz de la enfermedad, en el presente trabajo se ha propuesto el estudio genético de la patogenicidad de *B. cinerea*, mediante la realización de bioensayos de patogenicidad sobre hoja de judía de las cepas SAS56, UCA992 así como 73 descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992.

La selección de las cepas empleadas como parentales (SAS56 y UCA992) se realizó basándonos en los datos de virulencia presentados por ambas cepas cuando éstas fueron ensayadas sobre hoja de vid *Vitis vinifera* (Vallejo *et al.*, 2003a). Vallejo *et al.*, determinaron la patogenicidad de ambas cepas en hojas de vid (dañadas y sin ser dañadas), inoculadas con un bloque circular que contenía agar con micelio de la cepa a ensayar. Transcurridos 7 días del bioensayo, observaron que la cepa SAS56 fue una de las más patógenas, produciendo lesiones en las hojas independientemente de si éstas habían sido dañadas. Sin embargo, UCA992 fue la menos patógena, provocando lesiones sólo en aquellas hojas de vid que habían sido previamente dañadas. Estos resultados nos alentaron a emplear el cruzamiento SAS56 × UCA992 para realizar el estudio planteado.

A los 7 días de haber realizado la inoculación sobre las hojas de judía *Phaseolus vulgaris*, el tamaño de las lesiones fueron de 22.89 ± 1.49 mm y 14.33 ± 1.26 mm para las cepas SAS56 y UCA992 respectivamente. De nuevo, la cepa SAS56 ha sido la más virulenta independientemente de la naturaleza del inóculo y el huésped. Es importante resaltar que, la cepa UCA992, aún siendo la menos virulenta, es capaz de infectar la hoja sin necesidad de que existieran daños previos en el huésped, a diferencia de la incapacidad de dañar la hoja de vid sin ser dañada.

Los primeros síntomas observados tras la inoculación de las hojas de judía fueron las características lesiones necróticas sobre las hojas, las cuales aparecieron a las 48 horas de la inoculación. A partir de este momento, las lesiones se cubrieron de conidióforos únicamente o de micelio y conidióforos, en función de la cepa analizada. Las características manchas necróticas que aparecieron en el huésped son el resultado de la producción, por parte del patógeno, de la toxina botridial (Deighton *et al.*, 2001; Rebordinos *et al.*, 1996), que se acumula en la superficie del huésped causándole la muerte celular y por tanto, facilitando el desarrollo de la enfermedad.

En relación a las lesiones causadas por los descendientes, se observa que tras el cruzamiento sexual se produce una gran variabilidad en la patogenicidad de las cepas de *B. cinerea*. Del estudio comparativo de los 73 descendientes es posible establecer 4 grupos o comportamiento diferentes (denominados I, II, III y IV). El grupo I, el más numeroso, está formado por 28 descendientes capaces de producir lesiones de tamaño superior al parental SAS56 (parental más virulento). El grupo II con 19 descendientes y el grupo IV con 15 descendientes, originaron lesiones similares a las producidas por los parentales SAS56 (Grupo II) y UCA992 (Grupo IV), respectivamente. Y por último, el grupo III formado por 11 descendientes cuyas lesiones son inferiores a las causadas por el parental menos virulento.

Chao *et al.* (1997), propusieron que son necesarios más un cruzamiento para poder concluir cuál es el número de genes controlan el carácter virulencia/avirulencia. El cruzamiento establecido en el presente trabajo ha dado lugar a cepas con niveles de patogenicidad muy diferentes, las cuales podrán ser empleados en retrocruzamientos e incluso en estudios comparativos que aportaran nuevos datos sobre los mecanismos de patogenicidad de *B. cinerea*.

3.- Cariotipo Electroforético de *B. cinerea*

La aplicación de la citogenética para la caracterización de los cromosomas en hongos, ha permitido determinar del número de cromosomas sin embargo, el pequeño tamaño de los mismos ha hecho imposible obtener información sobre muchas de sus

características tales como el tamaño, la posición del centrómero, la longitud de los brazos, etc. El desarrollo de la técnica de electroforesis en campo pulsante supuso un gran avance en la caracterización molecular de los hongos, permitiendo la determinación del número y tamaño de los cromosomas así como la asignación de genes o marcadores a cromosomas concretos.

Hasta el momento del inicio de la presente tesis doctoral, se había realizado la caracterización molecular, mediante electroforesis en campo pulsante, de un bajo número de cepas de *B. cinerea*, 5 cepas fueron descritas en el trabajo llevado a cabo por Vallejo *et al.* (1996; 1993) y otras 5 cepas en el de van Kan *et al.* (1993). Este hecho nos motivó a realizar el estudio de un elevado número de cepas de *B. cinerea* aisladas de diferentes huéspedes y orígenes geográficos (26 cepas). Además, dado que era posible establecer el cruzamiento de cepas de *B. cinerea* en condiciones de laboratorio, nos planteamos determinar la influencia de la meiosis sobre el cariotipo electroforético de este patógeno. Para ello se analizó el cariotipo electroforético de 48 descendientes aisladas de dos cruzamientos diferentes (SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993).

Bajo las condiciones electroforéticas puestas a punto en el presente trabajo, se han resuelto entre 5 y 8 bandas cromosómicas por cepa, siendo 7 el número de bandas más frecuente. Mediante estudios de citogenética clásica, Shirane *et al.* (1988; 1989) establecieron en 16 el número de cromosomas de *B. cinerea*. Sin embargo, los autores no pueden determinar el tamaño de los cromosomas, la longitud de los brazos o la posición del centrómero, debido al pequeño tamaño que estos poseen. No obstante, lograron caracterizar la presencia de una estructura, similar a una fina hebra, exclusiva de uno de los cromosomas, que les permitía diferenciarlo de los demás.

Al analizar las intensidades relativas de las bandas, se observa que algunas de ellas, mayoritariamente las de tamaños superior a 2.29 Mbp, presentan una intensidad superior a otras. La diferencia evidente de intensidad entre las bandas, podría estar relacionada con la posibilidad de migración conjunta de varios cromosomas con pesos moleculares iguales o muy similares. En el caso de *B. cinerea* podría adoptarse esta hipótesis para interpretar los geles de electroforesis obtenidos de modo que, los resultados serían más compatibles con los estudios realizados por Shirane *et al.* (1988; 1989). Con el objetivo de lograr resolver estas bandas, se probaron diferentes

condiciones electroforéticas, sin embargo, en ningún caso se consiguió mejorar el número de bandas obtenidas previamente. Como posibles metodologías aplicables para mejorar la resolución de las bandas se han descrito, como pasos posteriores a la electroforesis en campo pulsante:

- i) La digestión con enzimas de restricción de la banda cromosómica que se desea resolver y posterior hibridación con una sonda de ADN telomérico (Mills *et al.*, 1995) y
- ii) La técnica de electroforesis en campo pulsante en dos dimensiones (KARD-PFGE, Karyotype and restriction display-PFGE) descrita por Brugère *et al.* (2000), que implica un primer paso de electroforesis en campo pulsante, el corte de la calle que contiene el cariotipo cuya resolución se pretende mejorar, su digestión con una enzima de restricción y por último, la separación de los fragmentos mediante una segunda electroforesis en campo pulsante

Otra alternativa que no necesita de la realización de una electroforesis en campo pulsante, es la aplicación de la técnica denominada *telomeric fingerprinting* (ver apartado 8 de Introducción), la cual ha permitido determinar el número de cromosomas en un gran número de hongos y que ha sido empleada en el presente trabajo de tesis doctoral.

Si se considera cada banda resuelta en los geles de electroforesis en campo pulsante, como un único cromosoma, el tamaño genómico mínimo de las cepas de *B. cinerea* osciló entre 22.77 Mbp (P IV) y 13.02 Mbp (P XVIII), siendo el valor medio de 18.57 ± 0.25 Mbp.

Todos los cariotipos electroforéticos obtenidos resultaron altamente reproducibles a pesar de los subcultivos realizados a lo largo del periodo de estudio. La estabilidad del cariotipo electroforético a través de las sucesivas divisiones mitóticas, ha sido descrita en numerosas especies fúngicas (Martin, 1995; Zolan, 1995). Lott *et al.* (1993) demostraron que el cariotipo de *Candida parapsilosis* se mantenía invariable después de 400 generaciones, creciendo bajo condiciones de laboratorio. Resultados

similares se han obtenido tras el estudio de más de 100 generaciones de *S. cerevisiae* creciendo en medio sintético (Rodríguez, M. E., comunicación personal). Para este género de levadura también se ha demostrado estabilidad del cariotipo de cepas empleadas como inóculo de una fermentación vínica, antes y después de la fermentación, permitiendo realizar un seguimiento de la levadura durante el proceso de vinificación (Wightman *et al.*, 1992). En el caso del hongo filamentoso *Fusarium oxysporum*, Migheli *et al.* (1993), observaron que el cariotipo de una cepa empleada como inóculo artificial, se mantuvo constante después de 4 semanas de haber realizado la inoculación. No obstante, existen algunas excepciones, en *Magnaporthe grisea* el cariotipo de dos cepas procedentes de sucesivos pases por un cultivo de arroz, fueron diferentes entre sí y además, distintos a los cariotipos de las cepas iniciales (Talbot *et al.*, 1993). Los cambios detectados no se caracterizaron, aunque afectaron principalmente a los cromosomas de mayor tamaño y al cromosoma donde se localiza el ADN ribosómico. Además, los autores señalaron que estas modificaciones contribuyeron al aumento de la plasticidad del genoma de *M. grisea*. Según esta premisa, se puede decir que la variabilidad observada en la mayoría de los hongos estudiados, y en concreto de *B. cinerea*, parece no deberse a reorganizaciones cromosómicas producidas por los diferentes pases de cultivo en el laboratorio.

3. 1.- Estudio del Polimorfismo Cromosómico en B. cinerea

El análisis del cariotipo electroforético de las 74 cepas de *B. cinerea* ha permitido establecer un total de 24 patrones cromosómicos diferentes de los que, 11 se han determinado en las 26 cepas aisladas de campo, 4 aparecieron entre los descendientes de SAS56 × UCA992 y los 9 restantes entre los de SAS405 × UCA993. De todos ellos, el patrón más frecuente fue el denominado P III, que ha aparecido en 22 de las cepas analizadas. Este patrón se caracteriza por contener 6 bandas cromosómicas y un tamaño de genoma mínimo de 17.03 Mbp.

En las cepas aisladas de campo no se encontró ninguna correlación entre los patrones cariotípicos que presentan y el huésped del que se aislaron las cepas, el origen geográfico, el año de aislamiento, o las características fenotípicas de las mismas.

En total, se detectaron 16 bandas cromosómicas, con tamaños comprendidos entre 3.72 Mbp y 1.87 Mbp. Dieciséis fue también el número de cromosomas descritos por Shirane *et al.* (1989), mediante la aplicación del método de *rotura del tubo germinativo*. De todas esas bandas cromosómicas, fueron las de 3.72 Mbp y 3.17 Mbp las más usuales, visualizadas en el 97% y 96 % de las cepas, respectivamente. Otra banda frecuente fue la de 2.90 Mbp que apareció en todas los cariotipos electroforéticos excepto en 11 cepas, cuyos patrones fueron V, XIII, XIV, XVI, XVII, XXI y XXIII. Las bandas de 2.66, 2.42 y 2.16 Mbp se presentaron con una frecuencia superior al 70 %. En cambio, las bandas cromosómicas de menor tamaño mostraron mayor variabilidad (frecuencia inferior al 18 %). Estudios previos en *B. cinerea* (Vallejo *et al.*, 1996; van Kan *et al.*, 1993) también detectaron la existencia de polimorfismo en la longitud de los cromosomas en 10 cepas aisladas de diferentes huéspedes, encontrando un único patrón cromosómico para cada una de las cepas analizadas. Igualmente, el polimorfismo cromosómico ha sido descrito en otros hongos filamentosos como *Histoplasma capsulatum* (Canteros *et al.*, 2005), *Fusarium oxysporum* (Alves-Santos *et al.*, 1999), *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet *et al.*, 1996), *Colletotrichum gloeosporioides* (Masel *et al.*, 1990) o *Ustilago hordei* (McCluskey & Mills, 1990); en hongos levaduriformes como *Candida albicans* (Chu *et al.*, 1993) o *S. cerevisiae* (Link & Olson, 1991) e incluso en parásitos como el caso de *Leighmania infatum* (Blaineau *et al.*, 1991).

Las principales fuentes de polimorfismo cromosómico en hongos son la recombinación meiótica (Dewar *et al.*, 1997; Mieczkowski *et al.*, 2006; Zolan *et al.*, 1994) y las reorganizaciones cromosómicas, tales como traslocaciones (Daviere *et al.*, 2001; Fierro & Martín, 1999; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1996; Orbach *et al.*, 1988; Plummer & Howlett, 1995; Tzeng *et al.*, 1992), deleciones (Daviere *et al.*, 2001; Masel *et al.*, 1993; McCluskey *et al.*, 1994; Plummer & Howlett, 1995), y duplicaciones (Daviere *et al.*, 2001). También, se ha descrito que la presencia en el genoma de secuencias transponibles constituyen elementos que favorecen las reorganizaciones cromosómicas. En este sentido, Daviere *et al.* (2001) lograron correlacionar el alto nivel de polimorfismo cromosómico en *Fusarium oxysporum* y la existencia de elementos transponibles en el genoma del patógeno, mediante el análisis de la distribución de los elementos transponibles en los cromosomas. Además, sugirieron que dicho polimorfismo es probablemente, debido a la recombinación ectópica entre los elementos

transponibles. Este mismo mecanismo ha sido descrito en otros hongos como *Crinipellis pernicioso* (Rincones *et al.*, 2006), *Fusarium oxysporum* (Daviere *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Dobinson *et al.*, 1993), *Schizosaccharomyces pombe* (Levin *et al.*, 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, 1989) y *Neurospora crassa* (Kinsey & Helber, 1989). En *B. cinerea* ya se han descrito 2 tipos de elementos transponibles, denominados *Boty* y *Flipper* (Diolez *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1999; Levis *et al.*, 1997). Levis *et al.* (1997) han determinado que en las cepas SAS405 y SAS56, existe 9 y 0 copias del elemento *Flipper* respectivamente. En el presente trabajo el estudio del cariotipo de ambas cepas, mostró un patrón cromosómico distinto en cada cepa (P IX en SAS405 y P IV en SAS56), por tanto los elementos transponibles pueden estar involucrados en la generación de polimorfismo cromosómico en este patógeno.

En *B. cinerea* la baja frecuencia con la que se han encontrado los apotecios en el medio natural (Beever & Weeds, 2004) ha hecho que sea la reproducción asexual la responsable del desarrollo del hongo en el medio natural. Sin embargo, Burt *et al.* (1996) mediante estudios de genética de poblaciones en el hongo *Coccidioides immitis*, cuya fase sexual no había sido aún descubierta, aportaron las primeras evidencias sobre la existencia de reproducción sexual de este patógeno en la naturaleza, a pesar de no haber sido observada. Por tanto, la escasa observación del estado sexual de *B. cinerea* en la naturaleza, no debe ser considerada como demostración de su ausencia. En base a la hipótesis propuesta por Kistler y Miao (1992), el polimorfismo en la longitud de los cromosomas está en relación inversa con la frecuencia con la que los hongos filamentosos sufren la meiosis, dada la fuerte presión de selección que este proceso ejerce sobre las aberraciones cromosómicas. En los estudios previos realizados por van Kan *et al.* (1993) y Vallejo *et al.* (1996), se describe un alto polimorfismo cromosómico, lo que apoya la hipótesis de Kistler y Miao. De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente memoria, se confirma la existencia de polimorfismo cromosómico entre las 26 cepas de *B. cinerea* aisladas de campo. No obstante, muchas de las cepas presentaron el mismo patrón electroforético, a diferencia de otras especies de hongos, que muestran una mayor variabilidad cromosómica (Kinscherf & Leong, 1988; Masel *et al.*, 1990; Zolan, 1995). Por tanto, el relativo polimorfismo cromosómico observado entre las cepas aisladas de campo (42 % de polimorfismo) puede sugerir que la reproducción sexual de *B. cinerea* en el medio natural es más frecuente de lo observado.

Bajo las condiciones de PFGE usadas en la presente memoria, el estudio de las cepas de *B. cinerea* aisladas de campo ha dado lugar a la definición de 11 patrones cromosómicos. Sin embargo, cuando se analizan las características fenotípicas de estas cepas se obtiene que cepas que presentan el mismo cariotipo electroforético poseen diferentes características morfológicas (tipo crecimiento, tamaño de los conidios), número de núcleos por conidio, patogenicidad y resistencia a fungicidas (Rebordinos *et al.*, 2000; 2003; Vallejo *et al.*, 2001; 2003a; 2003b). Estos datos ponen de manifiesto que la variabilidad cariotípica en *B. cinerea* no es tan elevada como la variabilidad encontrada entre sus características fenotípicas.

3. 2.- Efecto de la Meiosis en la Variabilidad Cariotípica

Con el objetivo de analizar la influencia de la meiosis en la variabilidad del cariotipo electroforético de esta especie, se resolvió el cariotipo de 48 cepas monoascospóricas, obtenidas al azar, de dos cruzamientos entre cepas que presentan polimorfismo cromosómico (SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993).

En algunos géneros de hongos se ha descrito que el cruzamiento entre cepas con diferentes cariotipos generan ascosporas con una reducida viabilidad (Pöggeler *et al.*, 2000; Zolan *et al.*, 1994), como consecuencia de la existencia de genes letales. Sin embargo, los resultados de los cruzamientos realizados entre las cepas de *B. cinerea* con diferentes cariotipos, han mostrado que las cepas empleadas como parentales mantenían, a pesar de las diferencias en sus cariotipos, su capacidad de reproducción sexual y además, que las 100 monoascosporas aisladas de cada cruzamiento fueron todas viables. Estos mismos resultados han sido también descritos en *Claviceps purpurea* (Hüsgen *et al.*, 1999), *Pythium sylvaticum* (Martin, 1995), *Ustilago hordei* (McCluskey & Mills, 1990) y *S. cerevisiae* (Ono & Ishino-Arao, 1988).

Cuando se compararon los cariotipos de los descendientes con respecto a los de los parentales, observamos variabilidad tanto en el número como en el tamaño de los cromosomas de los descendientes. Existen descendientes que presentaron el mismo patrón de bandas que los parentales, otros cuyo patrón resultó de la combinación de las

bandas presentes en sus parentales y un número alto de descendientes (42 %) que mostraron nuevas bandas cromosómicas, que no se habían observado en los parentales. La aparición de bandas cromosómicas con nuevos tamaños, ha sido descrito en otros géneros de hongos como *Coprinus cinereus* (Zolan *et al.*, 1994), *Pythium sylvaticum* (Martin, 1995) y *Claviceps purpurea* (Hüsken *et al.*, 1999). Un posible mecanismo que explicaría la formación de los cromosomas con nuevos tamaños entre los descendientes es el sobrecruzamiento entre cromosomas homólogos con diferentes tamaños de los parentales, generándose cromosomas con tamaños distintos a los presentados en las cepas que han sufrido reproducción sexual. Por tanto, se puede concluir que la recombinación meiótica en *B. cinerea* contribuye considerablemente a la variabilidad cariotípica de la especie. Además, las diferencias en el cariotipo de las cepas aisladas de campo, se corresponden con las encontradas en la naturaleza, lo que implica que la reproducción sexual tiene lugar en la naturaleza.

El cariotipo de los cruzamientos nos permitió realizar un análisis de la segregación de las bandas cromosómicas. En este estudio, se ha detectado que algunas bandas de las cepas que actúan como parentales no se ajustan a una segregación 1:1, indicando que estas bandas están compuestas por 2 o más cromosomas, que si son cromosomas homólogos, apoyaría la hipótesis de aneuploidía descrita por Büttner *et al.* (1994). Estos autores, mediante el estudio del contenido de ADN por núcleo en diversas cepas aisladas de campo, llegaron a la conclusión de que la aneuploidía/poliploidía es un fenómeno ampliamente extendido en la especie *B. cinerea*. No obstante, los estudios citogenéticos de Shirane *et al.* (1989) indicaban que *B. cinerea*, que presentaba 16 cromosomas, es haploide al compararla con *B. alli* que tenía 32 cromosomas. En este sentido, es interesante resaltar que en el presente trabajo de tesis doctoral, se han identificado 16 bandas cromosómicas distintas, coincidiendo con el número de cromosomas descrito por Shirane *et al.* (1989). Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, se puede considerar que la aneuploidía así como los diferentes niveles de ploidía sean mecanismos que estén actuando en esta especie.

3. 3.- *Relación entre la Patogenicidad y los Patrones Cromosómicos*

Si consideramos el estudio combinado de los patrones cromosómicos de los descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992 y el grupo de patogenicidad en el que se clasifican las mismas (Tabla 19), se observa que cepas con una alta virulencia (Grupo I) presentan patrones cromosómicos (P IV, P XI y P XII) que también están presentes en las cepas con la menor patogenicidad (Grupo III). Por consiguiente, no es posible establecer ninguna relación entre la patogenicidad de las cepas y el patrón cromosómico que estas presentan.

Patrón PFGE	<u>Grupo Clasificación Patogenicidad</u>			
	I	II	III	IV
P III	1	4	1	0 ^b
P IV	1	2 ^a	0	1
P VIII	1	0	0	0
P X	1	0	1	0
P XI	1	0	0	1
P XII	1	0	1	1
XXIV	0	1	0	0

Tabla 19. Número de descendientes que presentan un patrón cromosómico y grupo de patogenicidad. ^a: indica los patrones del parental SAS56; ^b: indica los patrones del parental UCA992

En *Netria haematococca*, Funnell *et al.* (2002) han comprobado que tres genes de la vía de la desmetilación de la fitoalexina pisatin, que están relacionados con la virulencia del patógeno en guisantes, se pierden en la descendencia de un cruzamiento, lo que conlleva una reducción de la virulencia de estos descendientes. Además, han probado que la ausencia de estos genes está asociada con la pérdida de parte de un cromosoma. En el caso de *B. cinerea*, las bandas cromosómicas que presenta los descendientes menos patógenos (Grupo III) del cruzamiento SAS56 × UCA992, son las

mismas que las observadas en las cepas más patógenas (Grupo I) del mismo cruzamiento. De manera, que no es posible relacionar la reducción de la patogenicidad en los descendientes con la ausencia de una banda cromosómica en el cariotipo electroforético de los mismos.

4.- Localización Cromosómica del ADN Ribosómico

La aplicación de la técnica de electroforesis en campo pulsante permite la determinación del cariotipo (número y tamaño de los cromosomas) del organismo, lo que combinado con la hibridación de genes específicos hace posible una profundización en la organización genómica del mismo. En el presente trabajo de tesis doctoral se decidió analizar el genoma de las cepas de *B. cinerea* mediante la localización y variabilidad del ADN ribosómico.

La sonda empleada es un fragmento que contiene los genes y espaciadores del ADNr 18S-5.8S-28S de *D. melanogaster*. Entre las razones por las que se eligió el ADN ribosómico para este estudio se encuentra: (i) que es fácilmente detectable, (ii) que está caracterizado en muchos organismos y (iii) que se trata de una secuencia altamente conservada. Con esta sonda se hibridó el cariotipo electroforético de las 12 cepas aisladas de campo así como 48 descendientes de los cruzamientos SAS56 × UCA992 y SAS405 × UCA993.

El ADN ribosómico se localizó, tanto en las cepas aisladas de campo como en los descendientes analizados, en dos bandas cromosómicas, i) en una banda de alto peso molecular pero con diferente tamaño según la cepa, y (ii) en una banda de bajo peso molecular (que coincide con la banda donde se localiza el ADN mitocondrial), revelando evidencias de reorganización cromosómica en *B. cinerea*. Una localización variable del ADNr en bandas de alto peso molecular se ha observado en *Coprinus cinereus* (Zolan *et al.*, 1994), *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet *et al.*, 1996) y *Sordaria macrospora* (Pöggeler *et al.*, 2000), donde se consideró que la variabilidad

observada se debía a la translocación y sobrecruzamiento durante la recombinación homóloga. Pöggeler *et al.*, (2000) observaron variabilidad tanto en la localización del ADN ribosómico como en la de los genes de la α -tubulina y el gen de compatibilidad sexual de *Sordaria macrospora*. Basándose en estos resultados, los autores consideraron que además de las translocaciones sería necesario considerar como posibles causas de polimorfismo, las deleciones, duplicaciones e inserciones. Entre estas últimas, los elementos transponibles, los plásmidos, el ADN viral, el ADN mitocondrial y el ADN de origen heterólogo son las posibles fuentes. En el genoma de *B. cinerea* se ha demostrado la existencia de una gran variedad de elementos extracromosómicos, entre los que se incluyen las mitocondrias y los plásmidos mitocondriales (Hiratsuka *et al.*, 1987; Vallejo *et al.*, 1996), los micovirus (Castro *et al.*, 1999; Vilches & Castillo, 1997) y los, anteriormente descrito, elementos transponibles (Diolez *et al.*, 1995; Levis *et al.*, 1997a; Giraud *et al.*, 1999), los cuales podrían estar implicados en reorganizaciones cromosómicas en este hongo.

En *Neurospora crassa* el ADN ribosómico está ordenado como una serie de 150 copias de secuencias repetidas en tandem de un tamaño de aproximadamente 9 Kbp y siempre localizado en un único sitio del genoma (Región Organizadora del Nucleolo, NOR). Butler y Metzberg (Butler, 1992; Butler & Metzberg, 1990) demostraron que la región organizadora del nucleolo de *N. crassa* podía sufrir expansión o contracción durante la etapa pre-meiótica de la fase sexual, como consecuencia de la rotura del cromosoma en la zona donde se encuentra el ADN ribosómico. Esta rotura cromosómica ha sido descrita como una fuente de variabilidad en tamaño del cromosoma donde se localiza el ADNr en *Coprinus cinereus* (Pukkila & Skrzynia, 1993), *Mucor circinelloides* (Díaz-Mínguez *et al.*, 1999), *Sordaria macrospora* (Pöggeler *et al.*, 2000) y *Ustilago hordei* (Gaudet *et al.*, 1998), además de en *N. crassa* (Butler, 1992). En este último trabajo, el autor propone un modelo que explica los cambios en el número de secuencias del ADN ribosómico según el cual, el cromosoma que contiene el ADNr sufre una rotura en un punto de la secuencia de los genes ribosómicos de manera que, el segmento fragmentado es translocado y de forma inmediata, en el extremo libre del cromosoma roto se adicionan secuencias teloméricas. Incluso, plantea que debe existir una secuencia específica en el ADNr que actúe como señal para que tenga lugar la rotura del cromosoma.

En *B. cinerea* la localización del ADNr mediante la técnica de hibridación “*in situ*” de fluorescencia, puso de manifiesto que éste se localiza en el extremo del cromosoma caracterizado por la presencia de la fina hebra (Taga y Murata, 1994). Por tanto, la rotura cromosómica puede ser una fuente de las diferencias en la hibridación del ADNr en el cariotipo de *B. cinerea*. La rotura al azar del cromosoma que originalmente contiene el ADNr podría dar lugar a un acortamiento del cromosoma y la traslocación del fragmento que se ha roto a otros cromosomas. Este mecanismo explicaría la hibridación del ADNr en la banda del ADN mitocondrial. Asimismo, la alta intensidad de la banda del ADNmt sugiere que esta banda posiblemente contiene otros fragmentos de cromosomas. Aquellas cepas en las que no hubo hibridación en la banda del ADNmt no habrán sufrido rotura del ADNr, dando lugar a la localización de este gen en un único cromosoma, como se ha sido descrito en otros hongos analizados (Debets *et al.*, 1990; Orbach *et al.*, 1988; Osiewacz & Ridder, 1991). La gran movilidad observada en el ADN ribosómico induce variabilidad cariotípica en *B. cinerea*.

En la mayoría de las especies de hongos el ADNr está localizado en el extremo del cromosoma, cercano a los telómeros. Posiblemente, el hecho de que el ADNr sea un punto frágil, propenso a romperse, hace que los genes esenciales se encuentren distantes del NOR, de manera que no exista el riesgo de que el organismo pueda sufrir deleciones letales.

5.- Hibridación de los Geles de Electroforesis en Campo Pulsante con una Sonda de ADN Telomérico

Con el objetivo de confirmar que cada banda cromosómica resuelta en los cariotipos electroforéticos se corresponde con, al menos, un cromosoma, se decidió realizar la hibridación de los geles de electroforesis con una secuencia de ADN telomérico (TTAGGG)_n. La sonda de ADN telomérico fue obtenida mediante una PCR, en la que no se emplea ADN como molde sino que la propia pareja de cebadores sirven

como molde en los primeros ciclos de la PCR, mientras que los productos que se van formando servirían como moldes en los siguientes ciclos de la misma, dando lugar a una población heterogénea de moléculas de amplio rango de tamaño.

Para realizar este estudio, se seleccionaron un total de 16 cepas de *B. cinerea*, 9 de las cuales se correspondían a cepas aisladas de campo y las 7 restantes a descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992.

La hibridación de los geles de electroforesis con la secuencia del ADN telomérico, confirmó que cada una de las bandas resultas mediante electroforesis en campo pulsante se corresponde, al menos, con un cromosoma. Además, se logró poner de manifiesto la existencia de 1 ó 2 cromosomas de pequeño tamaño por cepa. La secuencia de ADN telomérico también produjo hibridación en la banda de mayor movilidad electroforética, corroborando la posibilidad de que en esa banda comigren el ADN mitocondrial junto a algún minicromosoma. No obstante, la intensidad de la banda así como el grosor de la misma nos hace pensar que deben existir fragmentos de cromosomas que se hayan fraccionado durante la preparación de las muestras. Esto podría corresponder al caso, anteriormente citado, del ADN ribosómico.

Teniendo en cuenta estos datos, el número mínimo de cromosomas detectados en *B. cinerea* se sitúa entre 6 y 9, siendo el valor más frecuente de 8 cromosomas por cepa. La detección de estos minicromosomas implica un aumento del número de cromosomas por cepa respecto al número determinado mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante. Sin embargo, esta estimación sigue siendo inferior a los 16 cromosomas detectados mediante estudios citogenéticos (Shirane *et al.*, 1989). La diferencia entre ambas estimaciones radica en la imposibilidad de identificar si existe más de un cromosoma en las bandas con mayor intensidad. Por este motivo resulta de especial importancia cuantificar cuantos cromosomas existen en las bandas de diferente intensidad.

El tamaño de los minicromosomas osciló entre 787 Kbp y 357 Kbp, rango en el que se pudieron observar 6 minicromosomas de diferentes tamaños, lo que pone de manifiesto la existencia también de un alto polimorfismo en la longitud de los minicromosomas. El polimorfismo en los minicromosomas ha sido previamente

descrito en 5 cepas de *B. cinerea* (van Kan *et al.*, 1993) y en otros hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Masel *et al.*, 1990), *Leptosphaeria maculans* (Leclair *et al.*, 1996), *Magnaporthe oryzae* (Chuma *et al.*, 2003) y *Nectria haematococca* (Miao, 1990).

Las cepas que actúan como parentales en el cruzamiento, SAS56 × UCA992, poseen un minicromosoma cada una aunque de distinto tamaño (400 Kbp y 482Kbp). Entre los descendientes del cruzamiento, se observa que ninguno presenta el mismo cromosoma que el parental SAS56, mientras que 4 de ellos muestran el del parental UCA992. En los tres descendientes restantes se detecta un minicromosoma pero con un tamaño superior al de los parentales (618 Kbp). Estos resultados nos indican la existencia de reorganizaciones cromosómicas durante la fase sexual, generándose una mayor variabilidad genética en *B. cinerea*. En el hongo fitopatógeno *Magnaporthe oryzae*, el estudio de tétradas completas de un cruzamiento entre cepas con un minicromosoma de 1.2 Mbp (ausencia × presencia) ha demostrado que este minicromosoma sufre reorganizaciones del tipo de delección y duplicación, durante y después de la meiosis, e incluso, observaron la transferencia de un fragmento entre cromátidas hermanas durante la mitosis post-meiótica (Chuma *et al.*, 2003).

Una cuestión de enorme interés es saber si los minicromosomas de *B. cinerea* son cromosomas supernumerarios. Los criterios que definen a un cromosoma supernumerario son: (i) que presentan un tamaño, por lo general, más pequeño que los cromosomas A, (ii) que el número y tamaño que presenta cada individuo de una misma especie es variable, (iii) que están compuestos por ADN que no está presente en todos los aislados de la especie; ni en los cromosomas A, (iv) que muestran una segregación típicamente no Mendeliana y (v) que son ricos en secuencias repetidas. En cuanto a los minicromosomas que se han observado en las 16 cepas de *B. cinerea*, estos poseen un tamaño inferior a los cromosomas A y presentan en número y tamaño variable. Entre las cepas analizadas se encuentran 7 descendientes de un cruzamiento en el que ambos parentales presentan un minicromosoma. El bajo número de descendientes examinados y la presencia del minicromosoma en ambos parentales, nos hacen ser cautelosos y considerar el estudio de un mayor número de descendientes en un cruzamiento donde alguno de los parentales no presente un minicromosoma. Este hecho y la imposibilidad de saber si el ADN de estos minicromosomas está o no presente en el resto del genoma

de *B. cinerea*, impiden, hasta el momento, definir a estos minicromosomas como cromosomas supernumerarios.

En *Nectria haematococca*, varios genes involucrados en la detoxificación de las fitoalexinas producidas por la planta se encuentran localizados en cromosomas supernumerarios (Han *et al.*, 2001). La ausencia de estos cromosoma se ha asociado con la reducción de la virulencia en *N. haematococca* (Funnell *et al.*, 2002). En el fitopatógeno *Alternaria alternata* los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de una toxina relacionada con su patogenicidad, se encuentran en un cromosoma dispensable. Cepas mutantes que carecen de este cromosoma pierden su patogenicidad aunque conservan la habilidad de subsistir en la naturaleza (Hatta *et al.*, 2002). La posibilidad de que en los minicromosomas de *B. cinerea* existan genes implicados con la patogenicidad de este hongo fitopatógeno, hacen interesante el estudio y caracterización de los genes que se encuentran localizados en dichos minicromosomas.

6.- Hibridación de los *RFLP* con una Sonda de *ADN* Telomérico

La técnica de la electroforesis en campo pulsante nos ha permitido determinar el número de cromosomas en *B. cinerea*, sin embargo, la presencia de algunas bandas con mayor intensidad de fluorescencia y los resultados del estudio de la segregación de las bandas cromosómicas, nos indican la existencia de bandas en las que pueden estar comigrando dos o más cromosomas. La hibridación de los cariotipos electroforéticos con la secuencia de *ADN* telomérico nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de los minicromosomas. Sin embargo, la modificación de las condiciones electroforéticas, no nos permitió resolver el número de cromosomas presentes en las bandas de mayor intensidad, lo que nos llevó a emplear la técnica denominada *telomeric fingerprint* para estimar el número total de cromosomas.

En la presente tesis doctoral, se sometieron a estudio 9 cepas de *B. cinerea* aisladas de campo así como 5 descendientes del cruzamiento SAS56 × UCA992. El ADN extraído de cada cepa fue digerido con enzimas de restricción cuyas dianas de restricción no coincidieran con la secuencia de los telómeros, de manera, que por cada cromosoma obtendríamos 2 fragmentos que produjeran hibridación con el ADN telomérico. Tras la digestión, todos los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el ADN fue transferido a filtros de nylon e hibridados con la sonda de ADN telomérico previamente marcada.

Tras la digestión de las 14 cepas de *B. cinerea* con las 4 enzimas de restricción, el número máximo de telómeros por cepa varió entre 6 y 21. Además se observó un alto polimorfismo en la longitud de los telómeros de manera que, cada cepa de *B. cinerea* presenta un patrón exclusivo que permite identificarla. Un alto grado de polimorfismo asociado a la longitud de los telómeros es un fenómeno común entre una amplia variedad de eucariotas, como en *Magnaphorte grisea* (Farman & Leong, 1995), *Beauveria bassiana* (Viaud et al., 1996), *Cochliobolus heterostrophus* (Tasma & Bronson, 1998), *Paecilomyces* spp. (Inglis et al., 2005a), tomate (Broun et al., 1992) o ratón (Starling et al., 1990). Diversos autores (Farman & Leong, 1995; Tasma & Bronson, 1998) han descrito que las variaciones en la longitud de los telómeros pueden ser debidas a diferencias en el tamaño de los telómeros, a diferencias en la longitud de las secuencias asociadas a los telómeros, o incluso a duplicaciones de estas secuencias (Inglis et al., 2005a).

Al analizar las cepas aisladas de campo, no se observa ninguna banda común entre las cepas, ni entre las que fueron aisladas de un mismo huésped. Sin embargo, Levis et al. (1997b) estudiando el patrón de bandas obtenido al digerir con *EcoRI* el ADN de 80 cepas de *B. cinerea*, aisladas de distintos huéspedes, observaron la presencia de una banda a 7.4 Kbp en la mayoría de los aislados de vid y una banda intensa de 1.4 Kbp en los aislados de tomate. En nuestro estudio, las cepas aisladas de vid (UCA992, UCA993, UCA994, Bd90 y SAS56), no presentaron ni ésta, ni ninguna otra banda específica que permitiera identificarlas del resto.

La aparición de un patrón de bandas exclusivo para cada de *B. cinerea*, a modo de código de barras que le identifica, permitiría el seguimiento de la distribución espacial y temporal de la cepa en el campo. La capacidad que tiene esta técnica de asignar a cada cepa un patrón la convierte en una poderosa herramienta de identificación, principalmente, cuando se estudian hongos entomopatógenos que se emplean en biocontrol como es el caso de *Beauveria bassiana* (Viaud et al., 1996), *Metarhizium flavouride* (Inglis et al., 1999) o *Paecilomyces* spp. (Inglis et al., 2005a). Incluso se ha descrito en el caso de *Rosellina necatrix* (Aimi et al., 2002) y *Helicobasidium mompa* (Aimi et al., 2003) una relación directa entre el patrón que presentan las cepas y el grupo de compatibilidad micelial de las mismas, permitiendo la identificación del grupo al que pertenece cada cepa de modo inequívoco.

Una vez establecido el número de telómeros, se estimó el número de cromosomas en *B. cinerea* entre 8 y 11, valor que supera al obtenido mediante la técnica de hibridación de los geles de campo pulsante con la secuencia telomérica. No obstante, en la mayoría de las cepas se observa alguna banda con una intensidad superior a las demás, lo que implica la existencia de más de un telómero de tamaño similar comigrando en dicha banda. Este hecho explica las diferencias encontradas entre el número de bandas observadas en una cepa para cada enzima, así como las diferencias en el número de cromosomas obtenidos por este método y los 16 cromosomas determinados por Shirane et al. (1989). En tres cepas de las aisladas de campo (UCA996, Bd90 y T4), se ha observado una banda de intensidad y grosor muy superior junto con un número bajo de bandas de intensidad normal, siendo este comportamiento más acusado en la cepa Bd90. Esta banda de alta intensidad es un indicativo de ausencia de polimorfismo en las secuencias asociadas a los telómeros, dando lugar a un número anormalmente bajo de bandas teloméricas, lo que impide la determinación del número de cromosomas en estas cepas. Inglis et al. (2005b) observaron una banda de gran intensidad en los patrones de RFLP hibridados con una secuencia telomérica en *Metharhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Gliocadium* spp. Los autores demostraron la existencia de un gen que codifica para una helicasa tipo RecQ (*TAHI*) en la región subtelomérica de *Metharhizium anisopliae*, como consecuencia de la recombinación entre cromosomas. Además, probaron que la secuencia del gen se sitúa a la misma distancia del telómero en 12 de los 14 cromosomas presentados en el hongo,

existiendo monomorfismo en las secuencias subteloméricas, lo que genera la banda de gran intensidad en los RFLP.

Si se compara el número de cromosomas estimados mediante la aplicación de la electroforesis en campo pulsante (PFGE), la técnica de *telomeric fingerprint* y el PFGE hibridado con la secuencia telomérica (TTAGGG)_n, fueron estos dos últimos los que aportaron los mejores resultados, dando un valor del número de cromosomas más próximo al obtenido mediante cariotipo citogenético en *B. cinerea* (Shirane *et al.*, 1989). La hibridación con la secuencia telomérica de los RFLP presenta la ventaja de sea más sencillo y rápido, aunque también tiene sus inconvenientes: (1) algunas cepas presentaron una banda con mayor intensidad como consecuencia de la comigración de más de un telómero de similar tamaño o del monomorfismo en las secuencias asociadas a los telómeros, impidiendo en ambos casos resolver el número exacto de telómeros y (2) esta técnica no permite determinar el tamaño de los cromosomas y por consiguiente, el tamaño genómico de un individuo.

En la cepa 2100, el número de cromosomas determinado por *telomeric fingerprint* y la hibridación del PFGE han coincidido, indicándonos que cada banda representada en el cariotipo electroforético se corresponde con un único cromosoma. En la cepa UCA992-16, fue la hibridación del PFGE con la secuencia telomérica la que permitió estimar el número de cromosomas con mayor exactitud, confirmándose que en esta cepa existe más de un telómero con el mismo tamaño. En las restantes cepas, los datos obtenidos por *telomeric fingerprint* fueron los más altos, lo que implica que existe, al menos, una banda del cariotipo electroforético de estas cepas que contiene más de un cromosoma del mismo ó similar tamaño, que deberán ser resueltos.

Cuando se analiza el patrón de bandas en las cepas que actúan como parentales y sus descendientes, se observa que todas las bandas presentes en el parental UCA992, para las 4 enzimas ensayadas, lo están en sus descendientes a excepción de una banda obtenida tras la digestión con la enzima *PstI*. Sin embargo, con el parental SAS56 ocurre lo contrario, es decir, que en todos los casos alguna banda del parental no aparece en los descendientes excepto, con la enzima *HindIII*, donde todas las bandas de SAS56 se presentan en los 5 descendientes. En cuanto a las bandas presentes en los descendientes, tras la digestión con todas las enzimas se observan nuevas bandas que no

estaban presentes en ninguno de los parentales. Este comportamiento pone de manifiesto la existencia de reorganizaciones cromosómicas que impliquen a las secuencias adyacentes a los telómeros y como consecuencia aparezcan estas nuevas bandas teloméricas.

7.- Variabilidad Genética en *B. cinerea*

La naturaleza polimórfica de las secuencias subteloméricas, hace de la técnica *telomeric fingerprint* una poderosa herramienta para la determinación del número de cromosomas así como para el estudio de la variabilidad entre cepas. La aplicación de dicha técnica y el análisis de cluster utilizando el algoritmo UPGMA reveló un alto grado de variabilidad entre las 14 cepas de *B. cinerea* sometidas a estudio, las cuales presentaron un 22 % de similitud total.

Los valores del coeficiente Jaccard de similitud oscilaron entre un máximo de 69.35 % y un mínimo de 11.24 %, valores inferiores a los descritos previamente mediante el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). En estos casos, los coeficientes de similitud estuvieron comprendidos entre 99.5 % a 82.6 % (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993) y 100% a 36 % (Kerssies *et al.*, 1993). Por consiguiente, la región telomérica de *B. cinerea* muestra mayor variabilidad que otras regiones del genoma del patógeno y hacen de la técnica *telomeric fingerprint* una herramienta muy efectiva para la diferenciación entre cepas.

Las principales fuentes de variabilidad genética de un organismos son la recombinación y la mutación. No obstante, en *B. cinerea*, los mecanismos propuestos como responsables de la variabilidad genética han sido la heterocariosis (Grindle, 1979) y el diferente nivel de ploidía (Büttner *et al.*, 1994) existente entre las cepas. En el trabajo de la presente tesis doctoral, uno de los objetivos planteado fue el estudio de la repercusión de la reproducción sexual sobre la variabilidad genética. En este sentido, se ha observado que tras la meiosis existe variabilidad en el número y tamaño de los cromosomas que presentan los descendientes y además, que un número alto de descendientes (42 %) muestran nuevas bandas cromosómicas, que no se habían

observado en los parentales. Cuando se analizaron las bandas teloméricas también se detectó un alto polimorfismo entre los descendientes y, al igual que en el cariotipo electroforético, nuevas bandas teloméricas aparecieron entre los descendientes. Por tanto, la reproducción sexual en *B. cinerea* también debe ser considerada una fuente de variabilidad genética.

Probablemente la gran plasticidad genómica puesta de manifiesto entre las cepas de *B. cinerea*, contribuya al aumento de la capacidad adaptativa de las cepas a las condiciones de campo, lo que dificulta el control de la enfermedad causada por este fitopatógeno.

Conclusiones

1.- Conclusiones

1. Los géneros fúngicos aislados en la viña del marco de Jerez, fueron *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium* fueron los mayoritarios y con comportamientos diferentes en cada año, mientras que *Botrytis* y *Penicillium* fueron más regulares y minoritarios.
2. La inoculación de la viña con una cepa de laboratorio de *B. cinerea* modificó el desarrollo de la microbiota propia de la vid, así como el desarrollo de cepas silvestres de *B. cinerea*.
3. El análisis del cariotipo electroforético de 74 cepas de *B. cinerea* ha originado un total de 24 patrones cromosómicos diferentes. De ellos 11 se han definido en 26 cepas aisladas de campo y los 13 restantes entre los 48 descendientes de los dos cruzamientos ensayados. El número total de bandas cromosómicas resueltas fue de 16 y el número de bandas por cepa entre 5 y 8, siendo 7 el número de bandas más frecuente.
4. La aparición de nuevas bandas cromosómicas en el cariotipo electroforético de los descendientes de *B. cinerea*, pone de manifiesto que la recombinación meiótica contribuye considerablemente a la variabilidad cariotípica de la especie.
5. El estudio del polimorfismo cromosómico ha proporcionado evidencias de que la reproducción sexual de *B. cinerea* tiene lugar en la naturaleza con mayor frecuencia de lo observado.
6. La reproducción sexual de *B. cinerea* debe ser considerada, conjuntamente con la heterocariosis, el diferente nivel de ploidía y la existencia de elementos extracromosómicos, como una importante fuente de variabilidad genómica en esta especie.
7. El cluster de ADN ribosómico se localiza en una banda de alto peso molecular y con un tamaño diferente según las cepas. Las causas de esta variabilidad se atribuyen a la existencia de reorganizaciones cromosómicas y/o la rotura del cromosoma en la zona donde se encuentra el ADN ribosómico.

- 8.** La hibridación de los geles de electroforesis en campo pulsante con una secuencia de ADN telomérico, confirmó que cada una de las bandas cromosómicas se corresponde, al menos, con un cromosoma, así como la presencia de los minicromosomas en el cariotipo electroforético de *B. cinerea*. El número de minicromosomas por cepa fue 1 ó 2, con la excepción de una cepa en la que no se observó ninguno. Estos minicromosomas presentan un alto grado de polimorfismo y son susceptibles de sufrir reorganizaciones cromosómicas tras la meiosis.
- 9.** La digestión del ADN de *B. cinerea* con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* y *PstI*, y su posterior hibridación con una secuencia telomérica, establece un patrón de bandas exclusivo para cada cepa y específico de cada enzima, que permite su identificación de forma inequívoca.
- 10.** El número de cromosomas determinado mediante la hibridación de los RFLP con una sonda de ADN telomérico, se ha establecido entre 8 y 11. Este valor supera al obtenido mediante la técnica de campo pulsante, lo que implica que existe, al menos, una banda del cariotipo electroforético de las cepas que contiene más de un cromosoma de igual tamaño.
- 11.** La aplicación de la técnica *telomeric fingerprint* y el análisis de cluster reveló un alto grado de variabilidad entre las 14 cepas de *B. cinerea* sometidas a estudio, las cuales presentaron una similitud total del 22 %.

Bibliografía

A

-  **Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N. & Venâncio, A. (2001).** Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 240-242.
-  **Agrios, G. N. (1997).** Plant Pathology. *Academic Press. San Diego. California, USA.*, 362-363.
-  **Aimi, T., Kano, S., Yotsutani, Y. & Morinaga, T. (2002).** Telomeric fingerprinting of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*: a useful tool for strain identification. *FEMS Microbiology Letters* **217**, 95-101.
-  **Aimi, T., Kano, S., Iwasaki, Y. & Morinaga, T. (2003).** Telomeric fingerprinting of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa*: a useful tool for karyotype estimation. *Mycologi Research* **107**, 1055-1059.
-  **Akua, H. L., Miller, K. M., Sabeh, N. C., Greg Allen, R., Block, D. E. & VanderGheynst, J. S. (2004).** Production of *Botrytis cinerea* for potential introduction into a vineyard. *Bioresource Technology* **92**, 41-48.
-  **Akutsu, K., Irino, T., Tsukamoto, T. & Okuyama, S. (1987).** Relationship between development of benomyl-resistant strains and hyphal fusion in *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathology Soc. Jap.* **53**, 495-506.
-  **Akutsu, K., Tsukamoto, T., Irino, T. & Okuyama, S. (1988).** Transfer of benomyl-resistance by hyphal fusion of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathology Soc. Jap.* **54**.
-  **Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. & Leroux, P. (2002).** Euburicol 14 α -demethylase gene (*CVP51*) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **106**, 1171-1178.
-  **Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P. & Diaz-Minguez, J. M. (1999).** Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3335-3340.
-  **Anderson, J. P. (1924).** *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology* **14**, 152-155.

B

-  **Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P. & Kozakiewicz, Z. (2003).** Occurrence of ochratoxin A-producing fungi grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* **66**, 633-636.
-  **Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Minguéz, S. & Cabanes, F. J. (2005).** Ochratoxigenic species from spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 125-130.
-  **Beever, R. E. & Parkes, S. L. (1993).** Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **21**, 303-310.
-  **Beever, R. E. & Parkes, S. L. (2003).** Use of nitrate non-utilising (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *European Journal of Plant Pathology* **109**, 607-613.
-  **Beever, R. E. & Weeds, P. L. (2004).** Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Ed.: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. *Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.*, 29-52.
-  **Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S., Alegre, I., Ramos, A. J., Magan, N. & Sanchis, V. (2005).** Ochratoxin A-producing in spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 233-239.
-  **Bendich, A. J. (1996).** Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal Mol. Biology* **255**, 564-588.
-  **Benito, E. P., A., t. H., van`t Klooster, J. M. & L, v. K. J. A. (1998).** Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 207-220.
-  **Bhattacharyya, A. & Blackburn, E. H. (1997).** *Aspergillus nidulans* maintains short telomeres throughout development. *Nucleic Acids Research* **25**, 1426-1431.

-  **Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1515-1523
-  **Bishop, R. P., Spooner, P. R. & Sohampal, B. K. (1996).** Genetic fingerprinting of *Theileria parva* using a telomeric DNA probe. *Parasitology Research* **82**, 264-266.
-  **Blaineau, C., Bastien, P., Rioux, J. A., Roizés, G. & Pagès, M. (1991).** Long-range restriction map of size-variable homologous chromosomes in *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **46**, 293-302.
-  **Blakeman, J. P. (1980).** Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. *The Biology of Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. Academic Press. New York, London., 115-151.
-  **Blumenthal, C. Z. (2003).** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **39**, 214-228.
-  **Boehm, E. W. A., Ploetz, R. C. & Corby Kistler, H. (1993).** Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 196-207.
-  **Boeke, J. D. (1989).** Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Berg, D.E., Howe, M.M. (eds), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 335-374.
-  **Brody, H. & Carbon, J. (1989).** Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**.
-  **Broun, P., Ganal, M. W. & Tanksley, S. D. (1992).** Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1354-1357.
-  **Brugère, J. F., Cornillot, E., Métenier, G. & Vivarès, C. P. (2000).** In-gel DNA radiolabelling and two-dimensional pulsed field gel electrophoresis procedures suitable for fingerprinting and mapping small eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **28**, e48, 41-44.

-  **Buckley, P. M., Sjaholm, V. E. & Sommer, N. F. (1966).** Electron microscopy of *Botrytis cinerea* conidia. *Journal of Bacteriology* **91**, 2037-2044
-  **Burt, A., Carter, D. A., Koenig, G. L., White, T. J. & Taylor, J. W. (1996).** Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 770-773.
-  **Bustillo, A. J., Aleu, J., Hernandez-Galan, R. & Collado, I. G. (2003).** Biotransformation of the fungistatic compound (R)-(+)-1-(4'-chlorophenyl)propan-1-ol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **21**, 267-271.
-  **Butler, D. K. (1992).** Ribosomal DNA is a site of chromosome breakage in aneuploid strains of *Neurospora*. *Genetics* **131**, 581-592.
-  **Butler, D. K. & Metzberg, R. L. (1990).** Expansion and contraction of the nucleolus organizer region of *Neurospora*: changes originate in both proximal and distal segments. *Genetics* **126**, 325-333.
-  **Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B. & Tudzynski, P. (1994).** Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* **25**, 445-450.

C

-  **Canteros, C. E., Zuiani, M. F., Ritacco, V., Perrotta, D. E., Reyes-Montes, M. R., Granados, J., Zúñiga, G., Taylor, M. L. & Davel, G. (2005).** Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunology and Medical Microbiology Advances in Molecular Mycology* **45**, 423-428.
-  **Carle, G. F. & Olson, M. V. (1984).** Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **12**, 5647-5664.
-  **Carle, G. F., Frank, M. & Olson, M. V. (1986).** Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**, 1582-1585.

-  **Carstens, M., Vivier, M. A. & Pretorius, I. S. (2003).** The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Research* **12**, 497-508.
-  **Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S. & Castillo, A. (2001).** A doubled-strained RNA mycovirus confers hypovirulence traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* **228**, 87-91.
-  **Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S., Benavente, J. & Castillo, A. (1999).** A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* **175**, 95-99.
-  **Chao, C. T. & Ellingboe, H. (1997).** Genetic analysis of avirulence/virulence of an isolate of *Magnaporthe grisea* from a rice fields in Texas. *Phytopathology* **87**, 71-76.
-  **Chávez, R., Fierro, F., Gordillo, F., Martín, J.-F. & Eyzaguirre, J. (2001).** Electrophoretic karyotype of the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum* and chromosomal location of several xylanolytic genes. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 379-383.
-  **Chen, H., Smith, D. L., Sterrett, D. A., Zhou, D., Tucker, M. L., Solomos, T. & Gross, K. C. (1997).** Cloning and characterization of the rhamnogalacturonan hydrolase gene from *Botrytis cinerea*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 823-838.
-  **Chilosi, G. & Magro, P. (1997).** Pectin lyase and polygalacturonase isoenzyme production by *Botrytis cinerea* during the early stages of infection on different host plants. *Journal of Plant Pathology* **78**, 61-69.
-  **Chu, W. S., Magee, B. B. & Magee, P. T. (1993).** Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriology* **175**, 6637-6651.
-  **Chu, G., Vollrath, D. & Davis, R. W. (1986).** Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science* **234**, 1582-1585.
-  **Chuma, I., Tosa, Y., Taga, M., Nakayashiki, H. & Mayama, S. (2003).** Meiotic behavior of a supernumerary chromosome in *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetic* **43**, 191-198.

-  **Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. a. & Jarvis, W. R. (1980).** The Biology of *Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. And Jarvis, W. R. Academic Press. London.
-  **Colmenares, A. J., Durán-Patrón, R. M., Hernandez-Galan, R. & Collado, I. G. (2002a).** Four new lactones from *Botrytis cinerea*. *Journal Nat. Prod.* **65**, 1724-1726.
-  **Colmenares, A. J., Aleu, J., Durán-Patrón, R. M., Collado, I. G. & Hernández-Galan, R. (2002b).** The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 997-1005.
-  **Comménil, P., Belingheri, L., Bauw, G. & Dohorter, B. (1999).** Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 37-43.
-  **Covert, S. F. (1998).** Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* **33**, 311-319.
-  **Cutler, H. G., Jacyno, J. M., Harwood, J. S., Dulik, D., Goodrich, P. D. & Roberts, R. D. (1993).** Cotcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**, 1980-1982.

D

-  **Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C. E. & Dalcero, A. M. (2002).** Potencial ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* **19**, 408-414.
-  **Daviere, J. M., Langin, T. & Daboussi, M. J. (2001).** Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genetics and Biology* **34**, 177-192.
-  **De Miccolis, A. R. M., Milicevis, T., Natale, P., Lepore, A., De Guido, M. A., Pollastro, S., Cvjetkovic, B. & Faretra, F. (2004).** *Botryotinia fuckeliana* isolates carrying different transposons show differential response to fungicides and localization on host plants. *Journal of Plant Pathology* **85**, 288-290.

-  **De Waard, M. A. (1997).** Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science* **51**, 271-275.
-  **Debets, A. J. M., Holub, E. F., Swart, K., Van den Broek, H. W. J. & Bos, C. J. (1990).** An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. *Molecular Gen. Genetic* **224**, 264-268.
-  **Deighton, N., Muckenschnabel, B., Colmenares, A. J., Collado, I. G. & Willianson, B. (2001).** Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **57**, 689-692.
-  **Delcán, J. & Melgarejo, P. (2002).** Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botryotinia fuckeliana*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 391-400.
-  **Dewar, K., Bousquet, J., Dufour, J. & Bernier, L. (1997).** A meiotically reproducible chromosome length polymorphism in the ascomycete fungus *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). *Molecular Genetics and Genomics* **255**, 38-44.
-  **Díaz-Mínguez, J. M., López-Mata, M. A. & Eslava, A. P. (1999).** Complementary mating types of *Mucor circinelloides* show electrophoretic karyotype heterogeneity. *Current Genetic* **36**, 383-389.
-  **Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. & Brygoo, Y. (1995).** Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 103-108.
-  **Dobinson, K. F., Harris, R. E. & Hamer, J. E. (1993).** Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **6**, 114-126.
-  **Doehlemann, G., Berndt, P. & Hahn, M. (2006).** Different signalling pathways involving a G α protein, cAMO and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* **59**, 821-835.
-  **Doss, R. P., Deisenhofer, J. & von Nidda, H.-A., K. (2003).** Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **63**, 687-691.
-  **Doss, R. P., Potter, S. W., Chastagner, A. G. & Christian, J. K. (1993).** Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1786-1791.

-  **Doss, R. P., Potter, S. W., Soeldner, A. H., Christian, J. K. & Fukunaga, L. E. (1995).** Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 260-265.
-  **Dover, G. (1982).** Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**, 111-117.
-  **Drayton, F. L. (1932).** The sexual function of the microconidia in certain discomycetes. *Mycology* **24**, 345-348.
-  **Dugan, F. M., Lupien, S. L. & Grove, G. G. (2002).** Incidence, aggressiveness and *in planta* interactions of *Botrytis cinerea* and other filamentous fungi quiescent in grape berries and dormant buds in Central Washington state. *J. Phytopathology* **150**, 375-381.
-  **Duncan, R. A., Stapleton, J. J. & Leavitt, G. M. (1995).** Population dynamics mycoflora and occurrence of bunch rots of wine grapes as influenced by leaf removal. *Plant Pathology* **44**, 956-965.
-  **Duran-Patrón, R., Hernández-Galán, R., Rebordinos, L., Cantoral, J. M. & Collado, I. G. (1999).** Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites which the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron* **55**, 2389-2400.
-  **Durán-Patrón, R. M., Hernández-Galan, R. & Collado, I. G. (2000).** Secobotrytriendol and related sesquiterpenoids: New phytotoxic metabolites from *Botrytis cinerea*. *Journal Nat. Prod.* **63**, 182-184.

E

-  **El Ghaouth, A., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. (1997).** Antigungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*: Ultrastructural and cytochemical aspects. *Phytopathology* **87**, 772-779.
-  **Elad, Y. (1997).** Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Protection* **16**, 635-642.
-  **Elad, Y. & Stewart, A. (2004).** Microbial Control of *Botrytis* spp. *Ed.: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. Botrytis : Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 223-241.*

 **Elad, Y., Wiliamson, P., Tudzynski, P. & Delen, N. (2004).** *Botrytis: Biology, Pathology and Control. Ed.: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.*

 **European Commission. (2002).** (EC) N° 123/2005 of 26 th January 2005 amending Regulation (EC) N° 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Journal of the European Communities* **L25**, 3-5.

F

 **Färber, P. & Geisen, R. (2000).** Karyotype of *Penicillium nalgiovensen* and assignment of the penicillim biosynthetic genes to chromosome IV. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 59-63.

 **Faretra, F. & Antonacci, E. (1987).** Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathology Medit.* **26**, 29-35.

 **Faretra, F., Antonacci, E. & Pollastro, S. (1988a).** Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal Gen. Microbiology* **134**, 2543-2550.

 **Faretra, F., Antonacci, E. & Pollastro, S. (1988b).** Improvement of the technique used for obtaining apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) under controlled conditions. *Ann. Microbiology* **38**, 29-40.

 **Faretra, F. & Grindle, M. (1992).** Genetic studies of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Recent advances in Botrytis research. Ed.: Verhoeff, K., Malantrakis, N.E: and Williamson, B. PUDOC Scientific. Wageningen.*

 **Faretra, F. & Pollastro, S. (1992).** Genetics of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*): a major gene causing short apothecial stalks. *Phytopath. Medit.* **31**, 28-31.

 **Faretra, F. & Pollastro, S. (1993).** Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48-57.

-  **Faretra, F. & Pollastro, S. (1996).** Genetic studies of the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) by analysis of ordered tetrads. *Mycologi Research* **100**, 620-640.
-  **Farman, M. & Leong, S. A. (1995).** Genetic and physical mapping of telomeres in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Genetics* **140**, 479-492.
-  **Fierro, F. & Martín, J.-F. (1999).** Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Crit. Rev. Microbiol* **25**, 1-17.
-  **Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B. & Martín, J. F. (1993).** Resolution of four large chromosome in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Molecular Gen. Genetic* **241**, 573-578.
-  **Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. & Fèvre, M. (1996).** Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiotum*. *Current Genetic* **29**, 496-501.
-  **Free, S. J., Holtz, B. A. & Michaelides, T. J. (1996).** Mating behavior in field populations of *Monilinia fructucola*. *Mycologia* **88**, 208-211.
-  **Funnell, D. L., Matthews, P. S. & VanEtten, H. D. (2002).** Identification of new pisatin demethylase gene (*PDA5* and *PDA7*) in *Nectria haematococca* and non-Mendelian segregation of pisatin demethylating ability and virulence on pea due to loss of chromosomal elements. *Fungal Genetics and Biology* **37**, 121-133.

G

-  **Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrenniko, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M.,**

Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C. & Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **24**, 859-868.

 **Gaudet, D. A., Gusse, J. & Laroche, A. (1998).** Origins and inheritance chromosoma length polymorphisms in the barley covered smut fungus, *Ustilago hordei*. *Current Genetic* **33**, 216-224.

 **Genoscope (2005).** Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40 % of the harvest, depending on climatic conditions. <http://genoscope.cns.fr>.

 **Gentile, A. C. (1954).** Carbohygrate metabolism and oxalic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **29**, 257-261.

 **Gessler, C. & Jermini, M. (1985).** Role of flower infections of grape by *Botrytis cinerea* y consequences for the spraying schedule. *Quad. Viticulture Enology. University Torino* **9**, 245-250.

 **Gil-ad, N. L., Bar-Nun, N. & Mayer, A. M. (2001).** The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzymes activities. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 109-113.

 **Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. F. & Brygoo, Y. (1999).** Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous hort plants. *Phytopathology* **89**, 967-973.

 **Glass, N. L., Jacobson, D. J. & Shiu, P. K. T. (2000).** The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**, 165-186.

 **Govrin, E. M. & Levine, A. (2000).** The hipersensitive response facilitates plant infection by the necotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**, 751-757.

 **Gregory, P. H. (1949).** Studies on *Sclerotinia* and *Botrytis* II. De Bary's description and specimens of *Peziza fuckeliana*. *Trans. British Mycol. Soc.* **32**, 1-13.

 **Griffiths, A. J. F. (1995).** Natural plamids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews* **59**, 673-685.

-  **Griffiths, A. J. F., Collins, R. A. & Nargang, F. E. (1995).** Mitochondrial genetics of *Neurospora*. Ed. Kück, U. *The Mycota II Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
-  **Grindle, M. (1979).** Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **111**, 109-120.
-  **Gronover, C. S., Kasulke, D., Tudzynski, P. & Tudzynski, B. (2001).** The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1293-1302.
-  **Groves, J. W. & Drayton, F. L. (1939).** The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia* **31**, 485-489.
-  **Groves, J. W. & Loveland, C. A. (1953).** The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* **45**, 415-425.

H

-  **Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., B., V., Wiese, W., Schemeltzer, E., Schreider, P. H., Stocker, R. H. & Stenzel, K. (1993).** Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153-156.
-  **Han, Y., Liu, X., Benny, U., Kistler, H. C. & VanEtten, H. D. (2001).** Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *The Plant Journal* **25**, 305-314.
-  **Hansen, H. N. & Smith, R. E. (1932).** The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **22**, 953-954.
-  **Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K. & Tsuge, T. (2002).** A conditionally dispensable chromosome control host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* **161**, 59-70.
-  **Hennebert, G. L. (1973).** *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* **7**, 183-204.

-  **Hiratsuka, K., Namba, S., Yamashita, S. & Doi, Y. (1987).** Linear plasmid-like DNA's in fungus *Botrytis cinerea*. *Annals of Phytopathological Society of Japan* **53**, 638-642.
-  **Hoerberichts, F. A., ten Have, A. & Woltering, E. J. (2003).** A tomato metacaspase gene is uoregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* **217**, 517-522.
-  **Holz, G. (1999).** Behaviour and infection pathways of diverse fungal pathogens on fruit. In: *Conference Handbook, 12th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference, Canberra, Australia*, 257.
-  **Holz, G., Coertze, S. & Willianson, B. (2004).** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Y. Elad et al. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.*, 9-27.
-  **Howitt, R. L. J. (1998).** Characterization of mycoviruses in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *PhD thesis, University of Auckland, New Zealand*.
-  **Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N. & Forster, R. L. S. (1995).** Presence of double-strained RNA and virus-like particules in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**,1472-1478.
-  **Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N. & Forster, R. L. S. (2001).** Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus plant "potex.like" viruses. *Journal of General Virology* **82**, 67-87.
-  **Hüsgen, U., Büttner, P., Müller, U. & Tudzynski, P. (1999).** Variation in karyotype and ploidy level among field isolates of *Claviceps purpurea*. *J. Phytopathology* **147**, 591-597.
- I
-  **Ijdo, J. W., Wells, R. A., Baldini, A. & Reeders, S. T. (1991).** Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* **19**, 4780.
-  **Inglis, P. W., Magalhães, B. P. & Valadares-Inglis, M. C. (1999).** Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* reveled by telomeric fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters* **179**, 49-52.

 **Inglis, P. W., Sarmiento, B. C., Gaviño, C. F. C. & Valadares-Inglis, M. C. (2005a).** DNA fingerprinting of *Paecilomyces* strains of potencial use for the biological control of pest. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**, 1487-1492.

 **Inglis, P. W., Rigden, D. J., Mello, L. V., Louis, E. J. & Valadares-Inglis, M. C. (2005b).** Monomorphic subtelomeric DNA in the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*, contains a RecQ helicase-like gene. *Molecular Gen. Genomics* **274**, 79-90.

J

 **Jarvis, W. R. (1980).** Taxonomy. *The Biology of Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. Academic Press. London, U.K., 1-18.

 **Johnston, D. J., Willianson, B. & McMillan, G. P. (1994).** The interaction in planta of polygalacturonases from *Botrytis cinerea* with a cell-wall bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. *J. Exp. Botany* **45**, 1837-1843.

K

 **Kan, J. V., Klooster, J. V., Wagemakers, C. M., Dees, D. T., Vlugt-Bergmans, C. V., Van, K. J. & Van-der-Vlugt, B. C. (1997).** Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of Gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 30-38.

 **Kapat, A., Zimand, G. & Elad, Y. (1998).** Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycologi Research* **102**, 1017-1024.

 **Kars, I. & van Kan, J. A. L. (2004).** Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. Y. Elad *et al.* (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands., 99-118.

 **Kayser, T. & Schulz, G. (1991).** Eletrophoretic karyotype of cellulolytic *Penicillium janthinellum* strains. *Current Genetics* **20**, 289-291.

-  **Kerssies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M. & van Kan, J. A. (1993).** Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* **81**, 781-786.
-  **Kinscherf, T. G. & Leong, S. A. (1988).** Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. *Chromosoma* **96**, 427-433.
-  **Kinsey, J. A. & Helber, J. (1989).** Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1929-1933.
-  **Kirk, K. E., Harmon, B. P., Reichardt, I. K., Sedat, J. W. & Blackburn, E. H. (1997).** Block in anaphase chromosome separation caused by telomerase template mutation. *Science* **275**, 1478-1481.
-  **Kistler, H. C. & Miao, V. P. W. (1992).** New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review Phytopathology* **30**, 131-152.
-  **Klimpel, A., Gronover, C. S., Williamson, B., Stewart, J. A. & Tudzynski, B. (2002).** The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* **3**, 439-450.
-  **Kohn, L. M., Carbone, I. & Anderson, J. B. (1990).** Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology* **14**, 255-267.
- L**
-  **Leclair, S., Ansan-Melayah, D., Rouxel, T. & Balesdent, M.-H. (1996).** Meiotic behaviour of the minichromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* **30**, 541-548.
-  **Levin, H. L., Weaver, D. C. & Boeke, J. D. (1990).** Two related families of retrotransposons from *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 6791-6798.
-  **Levis, C., Fortini, D. & Brygoo, Y. (1997a).** Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics* **32**, 157-162.

-  **Levis, C., Giraud, T., Dutertre, M., Fortini, D. & Brygoo, Y. (1997b).** Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. *FEMS Microbiology Letters* **157**, 267-272.
-  **Link, A. J. & Olson, M. V. (1991).** Physical map of the *Saccharomyces cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. *Genetics* **127**, 681-698.
-  **Lopez Herrera, C. J., Mateo Sagasta, E. & Grana, E. E. (1986).** Estudio de la facies esclerocial de *Botrytis cinerea*. *Phytopath. medit.* **25**, 19-25.
-  **Lorbeer, J. W. (1980).** Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. *The Biology of Botrytis* Ed.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. Academic Press. London, U.K., 19-40.
-  **Lorenz, D. H. & Eichhorn, K. W. (1983).** Untersuchungen an *Botryotinia fuckeliana* Whetz, dem perfekt-stadium von *Botrytis cinerea* Pers. *Z. PflKrankh. PflSchutz* **90**, 1-11.
-  **Lott, T. J., Kuykendall, R. J., Welbel, S. F., Pramanik, A. & Lasker, B. A. (1993).** Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetic* **23**, 463-467.
-  **Louis, C., Girard, M., Kuhl, G. & Lopez-Ferber, M. (1996).** Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* **86**, 934-939.

M

-  **Magee, B. B. & Magee, P. T. (1987).** Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *Journal Gen. Microbiology* **133**, 425-430.
-  **Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. & Legendre, L. (2003).** Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 359-366.
-  **Martín, F. (1995).** Meiotic instability of *Pythium sylvaticum* as demonstrated by inheritance of nuclear markers and karyotype analysis. *Genetics* **139**, 1233-1246.

-  **Masel, A. M., Braithwaite, K., Irwin, J. A. G. & Manners, J. M. (1990).** Highly variable molecular karyotype in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics* **18**, 81-86.
-  **Masel, A. M., Irwin, J. A. G. & Manners, J. M. (1993).** DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 73-80.
-  **McCluskey, K. & Mills, D. (1990).** Identification and characterization of chromosome length polymorphisms among strains representing fourteen races of *Ustilago hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**, 366-373.
-  **McCluskey, K., Agnan, J. & Mills, D. (1994).** Characterization of genome plasticity in *Ustilago hordei*. *Current Genetic* **26**, 486-493.
-  **Miao, V. P. W. (1990).** Genes for phytoalexin detoxification in *Nectria haematococca*: Role in virulence on chickpea, and location on B chromosomes. *Ph. D. Dissertation. Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York.*
-  **Mieczkowski, P. A., Lemoine, F. J. & Petes, T. D. (2006).** Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair Mechanisms of chromosomal translocation* **5**, 1010-1020.
-  **Migheli, Q., Berio, T. & Gullino, M. L. (1993).** Electrophoresis karyotypes of *Fusarium* spp. *Exp. Mycological* **17**, 329-337.
-  **Mills, D., McCluskey, K., Russell, B. W. & Agnan, J. (1995).** Electrophoretic karyotyping: method and applications. In R. P. Singh and U. S. Singh (ed.), *Molecular methods in plant pathology*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea.
-  **Mohsin, G. A. I. (1990).** Le cycle sexue in vitro de *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.): Dèterminisme; optimisation des conditions d'obtention. *Tesis doctoral. Universidad de Lille.*
-  **Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. & Giraud, T. (2002).** Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* **106**, 594-601.

N

-  **Nogueira-Cano, M. I., Cisalpino, P. S., Galindo, I., Ramírez, J. L., Arrunda-Mortara, R. & Da Silveira, J. F. (1998).** Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 742-747.

O

-  **Ono, B.-I. & Ishino-Arao, Y. (1988).** Inheritance of chromosome length polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **14**, 413-418.
-  **Orbach, M. J., Vollrath, D., Davis, R. W. & Yanofsky, C. (1988).** An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 1469-1473.
-  **Osiewacz, H. D. & Ridder, R. (1991).** Genome analysis of imperfect fungi electrophoretic karyotyping and characterization of the nuclear gene coding for the glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Curvularia lunata*. *Current Genetics* **20**, 151-155.
-  **O'Sullivan, D., Tosi, P., Creusot, F., Cooke, B. M., Phan, T.-H., Dron, M. & Langin, T. (1998).** Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics* **33**, 291-298.

P

-  **Padmavathi, J. K., Uma Devi, K., Rao, C. U. M. & Reddy, N. N. R. (2003).** Telomere fingerprinting for assessing chromosome number, isolate typing and recombination in the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Mycologi Research* **107**, 572-580.
-  **Pantou, M. P. & Typas, M. A. (2005).** Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiology Letters* **245**, 213-220.
-  **Pezet, R., Pont, V. & Hoang-Van, K. (1991).** Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a lacase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiology Molecular Plant Pathology* **39**, 441-450.

-  **Plummer, K. M. & Howlett, B. J. (1995).** Inheritance of chromosomal length polymorphisms in the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular and General Genetics MGG* **247**, 416-422.
-  **Pöggeler, S., Masloff, S., Jacobsen, S. & Kück, U. (2000).** Karyotype polymorphism correlates with intraspecific infertility in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 281-289.
-  **Polman, J. K. & Larkin, J. M. (1989).** Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnology Tech.* **3**, 329-332.
-  **Pommier, J. P., Lebeau, J., Ducray, C. & Sabatier, L. (1995).** Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequence. *Biochimie* **77**, 817-825.
-  **Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. & Van Kan, J. A. L. (2000).** Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *En: J. W. Kronstad, (Ed), Fungal Pathology, Kluwer Academic Publishers.*, 33-64.
-  **Pszczolkowski, P., Latorre, B. A. & Ceppi Di Lecco, C. (2001).** Efectos de los mohos presentes en uvas cosechadas tardiamente sobre la calidad de los mosos y vinos Cabernet Sauvignon. *Ciencia e Investigación Agraria* **28**, 157-163.
-  **Puertas, M. J. (1999).** Genética. Fundamentos y perspectivas. *Ed: Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid.*
-  **Pukkila, P. J. & Skrzynia, C. (1993).** Frequent changes in the number of reiterated ribosomal RNA genes throughout the life cycle of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Genetics* **133**, 203-211.

R

-  **Raposo, R., Gómez, V., Urrutia, T. & Melgarejo, P. (2001).** Survival of *Botrytis cinerea* in Southeastern Spanish greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 229-236.
-  **Rebordinos, L., Cantoral, J. M., Prieto, M. V., Hanson, J. R. & Collado, I. G. (1996).** The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **42**, 383-387.

-  **Rebordinos, L., Santos, M., Vallejo, I., Collado, I. G. & Cantoral, J. M. (1997).** Molecular characterization of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Recent Res. Devel. in Phytochemistry* **1**, 293-307.
-  **Rebordinos, L., Vallejo, I., Carbú, M. & Cantoral, J. M. (2003).** Control of agricultural diseases and pest: the case of *Botrytis cinerea*. *Research Signpost. Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production* Trivadrum, Kerala, India, 268-287.
-  **Rebordinos, L., Vallejo, I., Santos, M., Collado, I. G., Carbú, M. & Cantoral, J. M. (2000).** Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* **17**, S37-S42.
-  **Reino, J. L., Hernández-Galán, R., Durán-Patrón, R. & Collado, I. G. (2004).** Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **152**, 563-566.
-  **Rha, E., Park, J. H., Kim, M. O., Chung, Y. R., Lee, C. W. & Kim, J. W. (2001).** Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 105-109.
-  **Rincones, J., Mazotti, G. D., Griffith, G. W., Pomela, A., Figueira, A., Leal, J., G. A., Queiroz, M. V., Pereira, J. F. & Azevedo, R. A. (2006).** Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycological Research* **110**, 821-832.
-  **Roiha, H., Miller, J. R., Woods, L. C. & Glover, D. M. (1981).** Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **290**, 749-753.
-  **Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., K-M., W., Siewers, V., Tenberge, K., Tudzynski, B. & Tudzynski, P. (2004).** Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD2) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* **5**, 17-27.
-  **Romero-Martínez, R., Canteros, C. & Taylor, M. L. (2004).** Variabilidad cromosómica intraespecífica en hongos patógenos de humanos, especialmente en *Histoplasma capsulatum*. *Revista Iberoamericana de Micología* **21**, 168-176.

S

-  **Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F. & Creppy, E. E. (2002).** Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1306-1311.
-  **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
-  **Santos, M., Rebordinos, L., Gutiérrez, S., Cardoza, R.-S., Martín, J.-F. & Cantoral, J. M. (2001).** Characterization of the *gdhA* gene from the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **34**, 193-206.
-  **Schoonbeek, W., Del Sorbo, G. & De Waard, M. A. (2001).** The ABC transporter *BcatrB* affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 562-571.
-  **Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. (1984).** Separation of yeast chromosomes-sized DNA by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 65-75.
-  **Schwartz, D. C., Smith, L. C., Baker, M. & Hsu, M. (1989).** Pulsed electrophoresis instrument. *Nature* **342**, 575-576.
-  **Serra, R., Mendonça, C. & Venâncio, A. (2006).** Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology* **42**, 42-47.
-  **Shirane, N., Masuko, M. & Hayashi, Y. (1988).** Nuclear behaviour and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **78**, 1627-1630.
-  **Shirane, N., Masuko, M. & Hayashi, Y. (1989).** Light microscopy observation of nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species. *Phytopathology* **79**, 728-730.
-  **Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Gronover, C. S., Pradier, J. M., Tudzynski, B. & Tudzynski, P. (2005).** Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *Bcbot1* of *Botrytis cinerea*: role in botrydial biosynthesis and impact on virulence in different wild strains. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **18**, 602-612.

-  **Smith, C. L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J. B., Yanagida, M. & Cantor, C. R. (1987).** An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **15**, 4481-4489.
-  **Soulié, M. C., Perino, C., Piffeteau, A., Choquer, M., Malfatti, P., Cimerman, A., Kunz, C., Boccara, M. & Vidal-Cros, A. (2006).** *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*). *Cellular Microbiology* **8**, 1310-1321.
-  **Soulié, M. C., Piffeteau, A., Choquer, M., Boccara, M. & Vidal-Cros, A. (2003).** Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene *Bcchs1* results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genetics and Biology* **40**, 38-46.
-  **Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biological* **98**, 503-517
-  **Starling, J. A., Maule, J., Hastie, N. D. & Allshire, R. C. (1990).** Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Research* **18**, 6881-6888

T

-  **Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, K. & Akutsu, K. (1997).** Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* **17**.
-  **Taga, M. & Murata, M. (1994).** Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma* **103**, 408-413.
-  **Talbot, N. J., Salch, Y. P., Ma, M. & Hamer, J. E. (1993).** Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaphorte grisea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 585-593.
-  **Tasma, I. M. & Bronson, C. R. (1998).** Genetic mapping of telomeric DNA sequences in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Current Genetic* **34**, 227-233.

 **ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. & van Kan, J. A. (1998).** The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1009-1016.

 **Tenberge, K. B. (2004).** Morphology and cellular organisation in *Botrytis* interactions with plants. *Y. Elad et al. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.*, 67-84.

 **Tolmsoff, W. J. (1983).** Heteroploidy as a mechanism of variability among fungi. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 317-340.

 **Tzeng, T. H., Lyngholm, L. K., Ford, C. F. & Bronson, C. R. (1992).** A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterosrophus*. *Genetics* **130**, 81-96.

U

 **Uhm, J. Y. & Fuji, H. (1983).** Heterothalmsm and mating type mutation in *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* **73**, 569-572.

 **Urbasch, I. (1983).** Über entstehung und keimung der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift* **108**, 54-60.

 **Urbasch, I. (1985).** Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their phialoconidial development. *Phytopathology* **112**, 229-237.

 **Urbasch, I. (1986).** *In vivo*-untersuchungen zur entstehung und funktion der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. am wirt-parasit-system *Fuchsia hybrida*-*B. cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **117**, 276-282.

V

 **Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. & Boccara, M. (2003).** Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 360-367.

 **Vallejo, I., Carbú, M., Rebordinos, L. & Cantoral, J. M. (2003a).** Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain. *Biologia, Bratislavia* **58**, 1067-1074.

-  **Vallejo, I., Muñoz, F., Carbú, M., Rebordinos, L., Fernández-Acero, F. J. & Cantoral, J. M. (2003b).** Study on fungicide resistance of *Botrytis cinerea* isolates from diseased strawberry plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **36**, 1-7.
-  **Vallejo, I., Rebordinos, L., Collado, I. G. & Cantoral, J. M. (2001).** Differential behaviour of mycelial growth of several *Botrytis cinerea* strains on either Patchoulol- or Globulol-amended media. *Journal Phytopathology* **149**, 113-118.
-  **Vallejo, I., Santos, M., Cantoral, J. M., Collado, I. G. & Rebordinos, L. (1996).** Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* strains. *Hereditas* **124**, 31-38.
-  **Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Van't Klooster, J. W., Wagmakers, C. A. M. & Van Kan, J. A. L. (1993).** Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **97**, 1193-1200.
-  **van Kan, J. A., Goverse, A. & Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B. (1993).** Electrophoretic karyotype analysis of *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**, 119-128.
-  **Verhoeff, K. (1980).** The infection process and host-pathogen interactions. *The Biology of Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. Academic Press. London.
-  **Verhoeff, K., Leeman, M., Van Peer, R., Posthuma, L., Schot, N. & Van Eijk, G. W. (1988).** Changes in pH and the production of organic acids during colonisation of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **122**, 327-336.
-  **Viaud, M., Couteaudier, Y., Levis, A. & Riba, G. (1996).** Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 175-183.
-  **Viaud, M. C., Balhadere, P. V. and Talbot, N. J. (2002).** A Magnaporthe grisea Cyclophilin Acts as a Virulence Determinant during Plant Infection. *Plant Cell* **14**, 917-930.

-  **Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.-M. and 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.
-  **Vilches, S. & Castillo, A. (1997).** A double-strained RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* **155**, 125-130.
-  **Vlugt-Bergmans, C. V., Wagemakers, C. M., Kan, J. V., Van-der-Vlugt, B. C. & Van, K. J. (1997).** Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 21-29.
-  **Vollrath, D. & Davis, R. W. (1987).** Resolution of DNA molecule greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric field. *Nucleic Acids Research* **15**, 7865-7876.
- W
-  **Wang, P., Cardenas, M. E., Cox, G. M., Perfect, J. R. and Heitman, J. (2001).** Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Reports* **2**, 511-518.
-  **Walter, M., Boyd-Wilson, K. S. H., Perry, J. H., Elmer, P. A. G. & Frampton, C. M. (1999).** Survival of *Botrytis cinerea* conidia on kiwifruit. *Plant Pathology* **48**, 823-829.
-  **Weeds, P. L., Beever, R. E., Sharrock, K. R. & Long, P. G. (1999).** A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54**, 13-53.
-  **Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2001).** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**, 581-590.
-  **Whetzel, H. H. (1945).** A synopsis of the genera and species of the *Sclerotinaceae*, a family of stomatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia* **37**, 648-714.

 **Wightman, J. D., Xu, X., Yorgey, B. M., Watson, B. T., McDaniel, M. R., Michaels, N. J. & Bakalinsky, A. T. (1992).** Evaluation of genetically modified wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 283-289.

 **Wubben, J. P., Mulder, W., ten Have, T., van Kan, J. A. & Visser, J. (1999).** Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1596-1602.

Y

 **Yoder, O. C., Barbara Valent & Chumley., F. (1986).** Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *The American Phytopathological Society* **76**, 383-385.

 **Young, C., Itoh, Y., Johnson, R., Garthwaite, I., Jiles, C. O., Munday-Finch, S. C. & Scott, B. (1998).** Paxilline-negative mutants of *Penicillium paxilli* generated by heterologous and homologous plasmid integration. *Current Genetics* **33**, 368-377.

 **Yunis, H. & Elad, Y. (1989).** Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* **17**, 13-21.

Z

 **Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. & Xu, J. (2000).** The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 724-732.

 **Zolan, M. E. (1995).** Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev.* **59**, 686-698.

