

Implicaciones de las proteínas BcGTL1, BcGTL2, BcGTL3, BcEGL1 y BcSUN1 en el crecimiento y la virulencia de Botrytis cinerea

BcGTL1, BcGTL2, BcGTL3, BcEGL1 and BcSUN1 implications in the growth and virulence of Botrytis cinerea

Trabajo de Fin de Grado

Román Rivero Carracedo

Tutorizado por Nélida Emilia Brito Alayón y
Celedonio González Díaz. Grado en Biología.

Junio 2019

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción.....	3
1. <i>Botrytis cinerea</i> es un hongo fitopatógeno de gran interés económico.....	3
2. El control de <i>B. cinerea</i> constituye un desafío	3
3. Las glicoproteínas son un elemento de gran importancia del secretoma de <i>B. cinerea</i>	4
4. Estudio de proteínas del glicosecretoma de <i>B. cinerea</i>	5
Objetivos	8
Material y métodos	10
1. Organismos y medios de cultivo	10
2. Análisis del efecto del estrés osmótico en el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	11
3. Análisis del efecto de diferentes sustratos causantes de estrés en el crecimiento fúngico.....	11
4. Cuantificación de la producción de esclerocios.....	12
5. Aislamiento y cuantificación de conidias	12
6. Ensayo de virulencia en hojas de judía	12
7. Tratamiento estadístico de los datos.....	13
Resultados y discusión	15
1. Análisis del crecimiento en presencia de compuestos causantes de estrés.	15
2. Cuantificación de la capacidad productora de conidias y esclerocios	20
3. Análisis de la virulencia en hojas de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	23
Conclusiones.....	27
Conclusions	27
Bibliografía.....	29

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno capaz de infectar más de 1400 especies vegetales, incluyendo un amplio número de plantas de interés agronómico. Durante el proceso infectivo, *B. cinerea* secreta una gran cantidad de proteínas, muchas de ellas glicosiladas, cuya implicación es crucial en el proceso de infección de los hospedadores vegetales. En el presente trabajo, se ha continuado con el trabajo desarrollado previamente en el grupo de investigación, estudiando el papel desempeñado por varias proteínas que forman parte del glicosecretoma en diferentes aspectos del ciclo de vida de *B. cinerea*. Para ello, se utilizaron cepas mutantes *knock-out* para cada uno de los genes que las codifican, proporcionadas por el grupo de investigación. Se analizó el crecimiento de estas cepas en presencia de compuestos causantes de estrés, la producción de estructuras de resistencia y dispersión, así como su capacidad infectiva en un hospedador vegetal. Los resultados obtenidos apuntan a una posible implicación de estas proteínas en la producción de estructuras de resistencia, así como en la virulencia del hongo.

Abstract

Botrytis cinerea is a phytopathogenic fungus able to infect more than 1400 plant species, including a broad range of plants with agronomic interest. During the infective process, *B. cinerea* secretes a high quantity of proteins, many of which are glycosylated. The secreted proteins play an essential role in the infection of plant hosts. This work has continued the research of one of the main research lines of this group, studying the role of some proteins of the glycoscretome in *B. cinerea* life cycle. Knock-out mutant strains of all the genes that codify these proteins were used and these strains were provided by the research group. The mutant strains growth under the effect of compounds that cause stress, the production of resistance and dispersion structures, as well as their virulence in a plant host were analysed. The results obtained suggest a possible implication of the studied proteins in the production of resistance structures and in the fungus virulence.

Introducción

Introducción

1. *Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno de gran interés económico

Botrytis cinerea Pers.:Fr (*B. cinerea*) es el hongo filamentoso fitopatógeno que causa la enfermedad conocida como ``podredumbre gris``. Es capaz de infectar más de 1400 especies vegetales, incluyendo un amplio número de plantas de interés agronómico (Elad *et al.*, 2007). Es uno de los hongos necrotrofos más extensamente estudiados y ha sido clasificado como el segundo hongo fitopatógeno más importante atendiendo a la importancia científica y económica de diferentes hongos fitopatógenos (Dean *et al.*, 2012). Filogenéticamente, se incluye en la clase *Ascomycetes*, familia *Sclerotiniaceae* (Hahn *et al.*, 2014). En la fase reproductiva asexual produce conidias y recibe el nombre de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, mientras que en la fase sexual, en la que forma ascosporas, es conocido como *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz (Prins *et al.*, 2000).

El ciclo de vida asexual de *B. cinerea* se inicia con la producción de conidias en estructuras especializadas denominadas conidióforos. Las conidias son transportadas mayoritariamente por el viento hasta el hospedador. En ambientes con alto grado de humedad, germinan y, en condiciones favorables, los tubos germinales penetran los tejidos vegetales provocando la necrosis de la zona infectada (Elad *et al.*, 2016). A continuación, sigue una fase de diseminación e invasión de los tejidos próximos al lugar de penetración, produciendo la maceración de los tejidos afectados, pudiendo provocar la muerte del hospedador. Se trata de un patógeno de amplio espectro capaz de infectar tallos, hojas, flores y frutos, para finalmente producir esporas en los tejidos necrosados, que serán nuevamente dispersadas por el viento hasta alcanzar nuevos hospedadores (van Kan *et al.*, 2017; Elad *et al.*, 2007; Schumacher y Tudzynski, 2012).

2. El control de *B. cinerea* constituye un desafío

El control de este hongo no resulta sencillo, ya que es capaz de atacar a los cultivos en cualquier fase de su desarrollo, incluida la post-cosecha. Además, puede infectar cualquier órgano vegetal y es capaz de crecer incluso a temperaturas muy bajas (temperaturas de almacenamiento y transporte de los vegetales). Todos estos factores hacen que el control de *B. cinerea* constituya un desafío (Droby y Lichter, 2007).

Actualmente, los fungicidas siguen siendo el método de control más usado para reducir la incidencia de *B. cinerea*. Sin embargo, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias de control, ya que la utilización de fungicidas supone un alto riesgo de contaminación ambiental y un riesgo importante para la salud humana, lo que restringe su utilización (Portal de Guías Docentes de la ULL, Área de Bioquímica y Biología Molecular, 2017). Además, cada vez es más frecuente la aparición de nuevas cepas resistentes a muchos de estos fungicidas (Hahn *et al.*, 2010). En este contexto, este TFG se enmarca en la línea de investigación de la Universidad de La Laguna que trabaja en el desarrollo de sistemas de lucha contra el hongo que puedan resultar más eficaces, más económicos y menos dañinos para el medio ambiente y la salud. Para ello, se pretende identificar factores de virulencia o patogenicidad de *B. cinerea*, que permitan diseñar estrategias específicas que los neutralicen y, en definitiva, limiten el desarrollo de la infección.

3. Las glicoproteínas son un elemento de gran importancia del secretoma de *B. cinerea*

El conjunto de proteínas secretadas por el hongo (conocido como secretoma o proteoma extracelular) varía a lo largo de su ciclo de vida y también durante la interacción con sus distintos hospedares (Heard *et al.*, 2015). Muchas de estas proteínas constituyen el primer contacto con las barreras defensivas de la planta, y de esta interacción inicial depende que *B. cinerea* pueda finalmente penetrar y colonizar los tejidos vegetales, contribuyendo de esta forma a la patogenicidad del hongo y considerándose, por tanto, como factores de virulencia (Espino *et al.*, 2010; González-Fernández *et al.*, 2015).

Muchas de las proteínas del secretoma de *B. cinerea* están *O*-glicosiladas (González *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014). La *O*-glicosilación de proteínas extracelulares constituye un importante factor en la biología y virulencia de muchos hongos. Esta modificación post-traducciona consiste en la incorporación de azúcares a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) mediante enlaces *O*-glicosídicos, aumentando, en muchos casos, tanto la estabilidad como la solubilidad de las proteínas, y protegiéndolas de la acción de las proteasas (Goto, 2007).

4. Estudio de proteínas del glicosecretoma de *B. cinerea*

El presente trabajo se centra en el estudio de varias de las proteínas que forman parte del glicosecretoma de *B. cinerea* y es la continuación de un Trabajo de Fin de Grado previo (Pérez-Hernández, 2015) realizado en el marco del mismo grupo de investigación.

La anotación de los genes que codifican dichas enzimas, en las distintas secuenciaciones del genoma de *B. cinerea* que se han llevado a cabo, se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes que codifican para las glicoproteínas estudiadas en el presente trabajo.

^a <i>B. cinerea</i> B05.10 v.1	^{a,b} <i>B. cinerea</i> B05.10 v.2	^c <i>B. cinerea</i> B05.10 v.3	^d Familia	^e Notación asignada
BC1G_01903	B0510_1730	Bcin05g05090	GH72	<i>Bcgtl1</i>
BC1G_10455	B0510_3559	Bcin14g03970	GH72	<i>Bcgtl2</i>
BC1G_00409	B0510_1084	Bcin01g06010.1	GH16	<i>Bcgtl3</i>
BC1G_09079	B0510_9551	Bcin09g00200.1	GH17	<i>Bcegl1</i>
BC1G_12627	B0510_8844	Bcin06g00604	SUN	<i>Bcsun1</i>

^aNotación utilizada en la primera secuenciación del genoma de *B. cinerea* B05.10 (<http://www.broad.mit.edu>; Amselem *et al.*, 2011)

^bNotación utilizada en la segunda secuenciación de *B. cinerea* B05.10 (<http://www.broad.mit.edu>; Staats *et al.*, 2012)

^cNotación empleada en la secuenciación más reciente de *B. cinerea* B05.10 (http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea)

^dFamilias a las que pertenecen las distintas proteínas codificadas por estos genes: GH (Glicosil hidrolasas), SUN (Sim1-Uth1-Nca3)

^eNotación asignada por Pérez-Hernández *et al.*, 2015, utilizada en el presente trabajo.

Las proteínas codificadas por los genes estudiados en este trabajo se caracterizan por ser proteínas posiblemente hiper-*O*-glicosiladas (González *et al.*, 2012), formar parte del glicosecretoma, analizado de forma experimental por LC/MS-MS (González *et al.*, 2014) y ser abundantemente expresadas *in planta*, en función de los datos de RNAseq proporcionados por el Dr. Van Kan (Wageningen University, Wageningen, Países Bajos).

Entre las proteínas seleccionadas, dos de ellas, BcGTL1 y BcGTL2 forman parte de la familia 72 de las Glicosil Hidrolasas (GH72). Ambas presentan actividad β -1,3-glucanosiltransferasa en *Schizosaccharomyces pombe*, desempeñando importantes funciones en el ensamblaje y reordenamiento de los componentes de la pared celular (de Medina-Redondo, 2008), por lo que cabría esperar que, por homología, puedan tener una actividad similar en *B. cinerea*. Por otro lado, BcGTL3 pertenece a la familia GH16 (Glicosil Hidrolasas, familia 16) y muestra un alto grado de similitud con la proteína Crh1 de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta levadura, Crh1, junto a Crh2 juegan un importante papel en el ensamblaje de componentes durante la formación de nueva pared celular, ya que son transglicolasas que favorecen la unión de la quitina con moléculas de β (1-3)glucano o β (1-6)glucano, en un paso muy importante de este proceso de síntesis de nueva pared celular (Cabib *et al.*, 2008).

La proteína BcEGL1 es una β -(1,3)-endoglucanasa perteneciente a la familia GH17 (Glicosil Hidrolasas, familia 17). Respecto a esta proteína, no se ha detectado una clara homología con otras proteínas con función conocida, a excepción de una única proteína homóloga presente en el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (González *et al.*, 2014), por lo que resulta de especial interés tratar de avanzar en el conocimiento del papel que pueda tener esta proteína en la biología y/o patogenicidad de *B. cinerea*.

Por último, la proteína BcSUN1 forma parte de la familia β -glucosidasa-SUN (González *et al.*, 2014). En un trabajo reciente, se identificó la proteína BcSUN1 como el único miembro del Grupo-I de la familia SUN codificada por el genoma de *B. cinerea* (Pérez-Hernández *et al.*, 2017). Esta proteína se encuentra débilmente unida a la superficie celular y está involucrada en el mantenimiento estructural de la pared celular y/o la matriz extracelular. Además, constituye el primer miembro de la familia SUN en el que se ha reportado que está implicado en la patogénesis de un hongo filamentoso (Pérez-Hernández *et al.*, 2017). A pesar de estos importantes avances en el conocimiento de esta proteína en los últimos años, sigue resultando de gran importancia continuar con el estudio de la misma, y, de esta manera, poder llegar a conocer con mayor profundidad cuál es su papel real en el mantenimiento de la pared celular y, sobre todo, su desempeño concreto y función específica en los procesos de patogénesis de *B. cinerea*.

En el presente trabajo, se ha continuado con el estudio del papel desempeñado por estas glicoproteínas en los diferentes aspectos de la biología de *B. cinerea*, utilizando para ello cepas mutantes *knock-out* para cada uno de estos genes, proporcionadas por el grupo

de investigación. Para ello, se ha analizado especialmente el crecimiento de estas cepas en presencia de compuestos causantes de estrés, la producción de estructuras de resistencia y dispersión y, finalmente, su virulencia.

Objetivos

Objetivos

En base a lo expuesto anteriormente, se ha establecido como objetivo general de este trabajo:

Analizar el papel de las proteínas BcGTL1, BcGTL2, BcGTL3, BcEGL1 y BcSUN1 en diferentes aspectos del crecimiento y la virulencia de Botrytis cinerea mediante el estudio de cepas mutantes knock-out de los genes codificantes para cada una de ellas

Para la consecución del anterior objetivo general, se plantearon como objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia de compuestos causantes de estrés en el crecimiento de las cepas mutantes.
2. Analizar la capacidad de producción de estructuras de dispersión y resistencia de las cepas mutantes.
3. Estudiar la virulencia en hojas de judía de las cepas mutantes.

Material y métodos

Material y métodos

1. Organismos y medios de cultivo

Para estudiar el papel de estas glicoproteínas en la biología y la virulencia del hongo, se utilizaron cepas *knock-out* para cada uno de los genes que las codifican. Estas cepas mutantes fueron generadas a partir de la cepa haploide B05.10 (Büttner et al., 1994), cedida por el Dr. Paul Tudzynski (Westfälische Wilhems-Universität Münster, Alemania). mediante la interrupción dirigida de los genes correspondientes, utilizando un casete de resistencia al antibiótico higromicina.

Las cepas mutantes fueron obtenidas en Wageningen University (Holanda) y cedidas por el Dr. Mario González Carracedo. En el presente trabajo se han anotado como se detalla a continuación:

- $\Delta Bcgtl1$: cepa en la que se ha delecionado el gen Bcin05g05090.
- $\Delta Bcgtl2$: cepa en la que se ha delecionado el gen Bcin14g03970.
- $\Delta Bcgtl3$: cepa en la que se ha delecionado el gen Bcin01g06010.1.
- $\Delta Bcegl1$: cepa en la que se ha delecionado el gen Bcin09g00200.1.
- $\Delta Bcsun1$: cepa en la que se ha delecionado el gen Bcin06g00604.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- **MEA**: extracto de malta (Pronadisa) al 1 % y agar bacteriológico al 1,5 %.

En los casos que fue necesario, se suplementó con higromicina (Duchefa) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

- **Tomate-agar**: extracto de frutos de tomate al 25 % (p/v), pH ajustado a 5,5 y agar bacteriológico al 2 %.
- **YGG**: extracto de levadura al 0,5 %, glucosa al 2 % y Gamborg B5 al 0,3% (Duchefa Biocheme)

En los casos que fue necesario, se suplementó con agar bacteriológico al 1,5%.

- **PDA**: *potato dextrose agar* al 3,9 % (Duchefa Biocheme)

2. Análisis del efecto del estrés osmótico en el crecimiento de *B. cinerea*

Con el objeto de estudiar el efecto del estrés osmótico sobre las distintas cepas de *B. cinerea*, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Sembrar conidias de las cepas mutantes y la silvestre de *B. cinerea* en MEA.
2. Incubar durante 48 h a 20 °C y en condiciones de oscuridad.
3. Obtener pequeñas porciones de agar que contenga el micelio del hongo (o *plugs*) y usarlas para inocular placas de Petri que contengan 10 ml del medio YGG y el mismo medio suplementado con sorbitol a una concentración de 0,5 M.
4. Crecer durante 3 días sin agitación, a 20 °C y en oscuridad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado
5. Fotografiar las placas.
6. Medir los diámetros de las colonias en cm.
7. Expresar los resultados como diámetro promedio (cm) de las colonias para cada cepa.

3. Análisis del efecto de diferentes sustratos causantes de estrés en el crecimiento fúngico

Se inocularon las cepas en estudio en distintos medios sólidos, siguiendo el protocolo:

1. Tomar *plugs* de agar con micelio joven e inocular placas con PDA, PDA suplementado con sorbitol 1M, YGG e YGG suplementado con 1,5 o 30mM H₂O₂, o rojo congo al 0,005 %.
2. Inocular cada placa con 2 *plugs*, hasta un total de 4 réplicas por medio a ensayar.
3. Incubar a 20 °C y en oscuridad.
4. Medir el diámetro de las colonias cada 24 h.
5. Calcular la velocidad de crecimiento, expresada en cm/día, a partir de los datos obtenidos.

4. Cuantificación de la producción de esclerocios

Se evaluó la capacidad de las distintas cepas de *B. cinerea* para producir estas estructuras de resistencia en medio YGG.

1. Inocular cada placa de YGG con 2 plugs de micelio joven, hasta un total de 4 réplicas por cepa a ensayar.
2. Incubar las placas durante 10-12 días a 20 °C y en oscuridad.
3. Hacer el recuento del número de esclerocios por colonia.
4. Calcular el número promedio de esclerocios producidos por cada cepa.

5. Aislamiento y cuantificación de conidias

Para aislar y cuantificar la producción de conidias por *B. cinerea*, se procedió de la siguiente forma:

1. Inocular 2 placas de tomate-agar con plugs de micelio joven por cada cepa a ensayar.
2. Incubar durante 10-12 días a 20 °C en oscuridad, exponiendo a los 3 días de crecimiento a luz cercana al UV durante 12 horas.
3. Añadir a cada placa 15 ml de agua estéril y separar las conidias con ayuda de un asa de siembra.
4. Retirar los restos de micelio filtrando la suspensión obtenida a través de una jeringuilla con algodón hidrófilo en su interior.
5. Centrifugar 5 min a 1500 x g.
6. Resuspender el sedimento (conidias) en 50 ml de agua estéril y volver a centrifugar como en 5.
7. Hacer una dilución 1/100 de las conidias y medir la absorbancia a 600 nm.
8. Calcular el valor de concentración inicial expresado en 10^6 conidias/ml para cada cepa.

6. Ensayo de virulencia en hojas de judía

Con el fin de evaluar la virulencia de las distintas cepas de *B. cinerea* en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*), se siguió el siguiente protocolo:

1. Cortar hojas de judía y disponerlas en bandejas con papel de filtro humedecido con agua estéril.
2. Inocular las hojas con 5 μ l de una suspensión de conidias de 2×10^5 conidias/ml en TGGK (KH_2PO_4 60 mM, glicina 10 mM, Tween 20 al 0,01%, glucosa 100 mM).
3. Incubar a 20 °C en recipientes cerrados, en oscuridad y con alto grado de humedad.
4. Cada 24 h, registrar fotográficamente el progreso de la infección y medir el área de la lesión en cm^2 con el software ImageJ.

7. Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el software SPSS Statistics (IBM). Para estimar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los datos, se empleó el test T-Student ($p = 0.05$), si seguían una distribución normal. En caso contrario, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney ($p = 0.05$). La normalidad de los datos se estimó mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0.05$).

Resultados y discusión

Resultados y discusión

1. Análisis del crecimiento en presencia de compuestos causantes de estrés.

En primer lugar, dada la posible implicación de las cinco proteínas estudiadas en este trabajo (Tabla 1) en los procesos relacionados con la estabilidad estructural de la pared y/o las envueltas celulares de *B. cinerea* (Pérez-Hernández, 2015), se analizó el crecimiento de las cepas mutantes en medios de cultivo suplementados con distintos compuestos causantes de diferentes tipos de estrés.

En primera instancia, se estudió la estabilidad de la pared celular y las envueltas celulares, empleando compuestos capaces de afectar a la integridad de estas estructuras, como son el sorbitol o el Rojo Congo. El sorbitol es un estabilizador osmótico ampliamente utilizado para analizar la estabilidad de la pared celular, ya que puede facilitar el crecimiento del hongo si la pared se encuentra debilitada (González *et al.*, 2014), mientras que el Rojo Congo es un colorante capaz de unirse a la quitina de la pared celular y constituye un sistema ampliamente utilizado para detectar cambios en la pared (Yoshimi *et al.*, 2017).

Para ello, las cepas mutantes y la cepa silvestre fueron crecidas en presencia y ausencia de sorbitol, se midió el radio de las colonias durante varios días y se calculó la velocidad de crecimiento (Fig. 1).

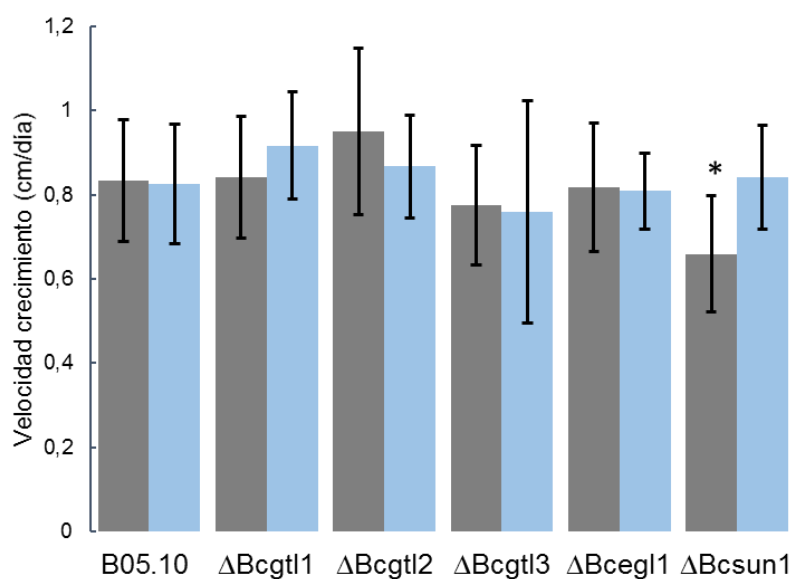


Fig. 1. Crecimiento de las cepas mutantes en medio PDA en presencia y ausencia de sorbitol. Las cepas indicadas fueron crecidas en placas con medio PDA sólido (barras grises), o bien en el mismo medio suplementado con sorbitol 1M (barras azules). Se realizaron tres medidas del radio para cada colonia, a los 3 y 4 días post-inoculación. A partir de esos valores se calculó la velocidad de crecimiento promedio para 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10) en las mismas condiciones de crecimiento, según el test T-Student en el caso de una distribución normal, o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

El análisis de los resultados reveló que, en ausencia de sorbitol, la mayoría de las cepas mutantes no presentaron diferencias en su crecimiento respecto a la cepa silvestre B05.10. La cepa $\Delta Bcsun1$ fue la única cuyo crecimiento presentó una reducción significativa (21%) respecto a la cepa B05.10. Por otra parte, en presencia de sorbitol, ninguna de las cepas mutantes presentó diferencias significativas en su crecimiento respecto a la cepa silvestre. La reducción del crecimiento de la cepa $\Delta Bcsun1$ en ausencia de sorbitol podría deberse a la implicación de la proteína BcSUN1 en la estabilidad de la pared celular que rodea a las hifas del hongo. De hecho la presencia de sorbitol en el medio de cultivo causó que esta cepa recuperase su capacidad de crecimiento hasta niveles similares a los de la cepa silvestre.

Con la finalidad de conocer con mayor precisión el efecto de este estabilizador osmótico, se volvieron a crecer las cepas mutantes en presencia y ausencia de sorbitol, esta vez en medio YGG líquido (Fig. 2).

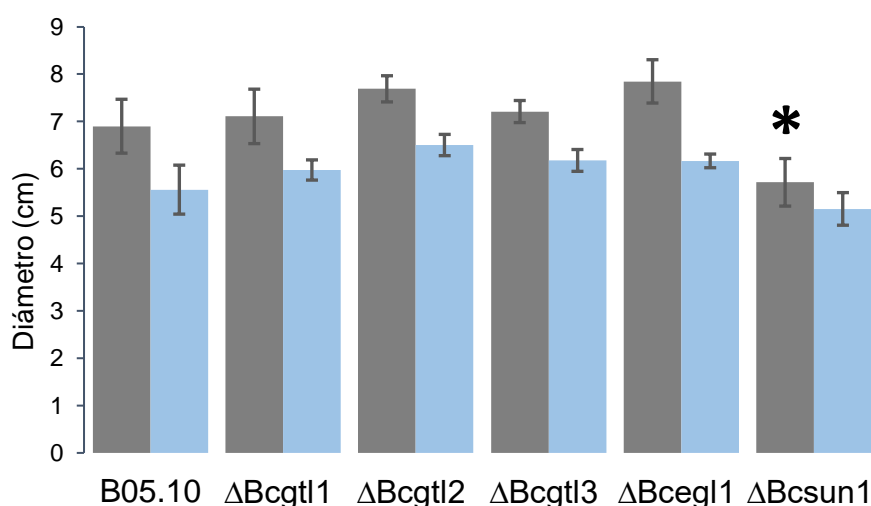


Fig. 2. Crecimiento de las cepas mutantes en medio YGG en presencia y ausencia de sorbitol. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio YGG líquido (barras grises), o bien en el mismo medio suplementado con sorbitol 0,5M (barras azules). Se muestra el diámetro (cm) promedio de las colonias tras 72 h de crecimiento para 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10) en las mismas condiciones de crecimiento, según el test T-Student en el caso de una distribución normal, o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

normal o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorv-Smirnov.

En este caso, los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente en medio PDA para la cepa $\Delta Bcsun1$, que presentó un menor crecimiento en ausencia de sorbitol, mientras que la presencia de este compuesto causó que la cepa mutante recuperase su capacidad de crecimiento hasta niveles similares a los observados para la cepa silvestre. La familia de proteínas SUN está formada por proteínas homólogas a glucanasas, muchas de ellas localizadas en la pared celular, y que participan en procesos celulares muy diversos (Kuznetsov *et al.*, 2013). Además, se ha observado que la mutación del gen *uth1* de *S. cerevisiae*, perteneciente a esta familia, dio lugar a que el contenido en β -D-glucano y quitina de la pared celular fuera diferente respecto a las células silvestres (Kuznetsov *et al.*, 2013). Dado que se ha observado una cierta disminución del crecimiento en medio sin sorbitol, la proteína BcSUN1 de *B. cinerea* también podría estar implicada en algún aspecto relacionado con la formación y/o estabilidad de las envueltas celulares. Resultados recientes (Pérez-Hernández *et al.*, 2017) indican que la cepa mutante $\Delta Bcsun1$ mantiene su capacidad de crecimiento en medio YGG sólido, sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que en medio YGG líquido esta cepa presenta un menor crecimiento que la cepa silvestre (Fig. 2). Estos resultados hacen sospechar de alguna alteración de las envueltas celulares en la cepa $\Delta Bcsun1$, que están implicadas en la adhesión de las hifas entre sí y al sustrato. De hecho, se ha demostrado que existen deficiencias en la producción de matriz extracelular, en la retención de agua y en la morfología de las colonias formadas por esta cepa mutante (Pérez-Hernández *et al.*, 2017).

Para continuar con el estudio de la estabilidad de la pared y las envueltas celulares, se analizó la respuesta de las cepas mutantes en medio YGG, esta vez en presencia y ausencia de Rojo Congo (Fig. 3).

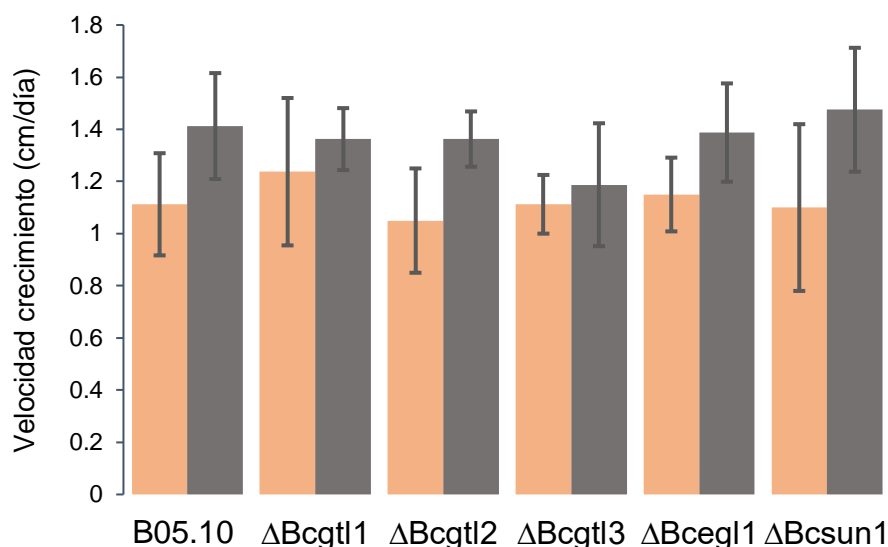


Fig. 3. Crecimiento de las cepas mutantes en medio YGG en presencia y ausencia de Rojo Congo. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio YGG sólido (barras grises), o bien en el mismo medio suplementado con Rojo Congo al 0.005 %, (barras naranjas). Se realizaron tres medidas del radio para cada colonia, a los 3 y 4 días post-inoculación. A partir de esos valores se calculó la velocidad de crecimiento promedio para 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10) en las mismas condiciones de crecimiento, según el test T-Student en el caso de una distribución normal o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En este caso, la velocidad de crecimiento de las cepas mutantes no presentó diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (B05.10), tanto en ausencia como en presencia de Rojo Congo. Este colorante se une a la quitina de la pared celular, actuando como un agente desestabilizador de la pared (Bansal *et al.*, 2019), de tal manera que cabría esperar una reducción en el crecimiento de las cepas mutantes cuya pared se encuentre debilitada, debido al estrés causado por parte del Rojo Congo. Sin embargo, en este caso, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, aunque esto no quiere decir que no existan deficiencias en la pared de estas cepas mutantes. Las cepas mutantes podrían presentar deficiencias en su pared celular, pero no haber sido detectadas utilizando Rojo Congo a esta concentración. No obstante, se puede intuir una cierta tendencia hacia un menor crecimiento en presencia de este compuesto, a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, por lo que podría resultar interesante analizar la respuesta que muestran estas cepas ante una mayor concentración de Rojo Congo.

Por otra parte, resultados recientes (Pérez-Hernández, 2017) indican que la cepa $\Delta Bcsun1$ presenta ciertas alteraciones en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes de estrés oxidativo. Concretamente, esta cepa mostró una mayor producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) *in planta* e *in vitro*, así como un menor crecimiento en presencia de este compuesto. Por ello, se analizó el crecimiento de todas las cepas mutantes en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y para conocer con mayor exactitud la capacidad de las cepas mutantes para resistir el efecto oxidante del H_2O_2 se ensayaron dos concentraciones de este compuesto en medio YGG (Fig. 4).

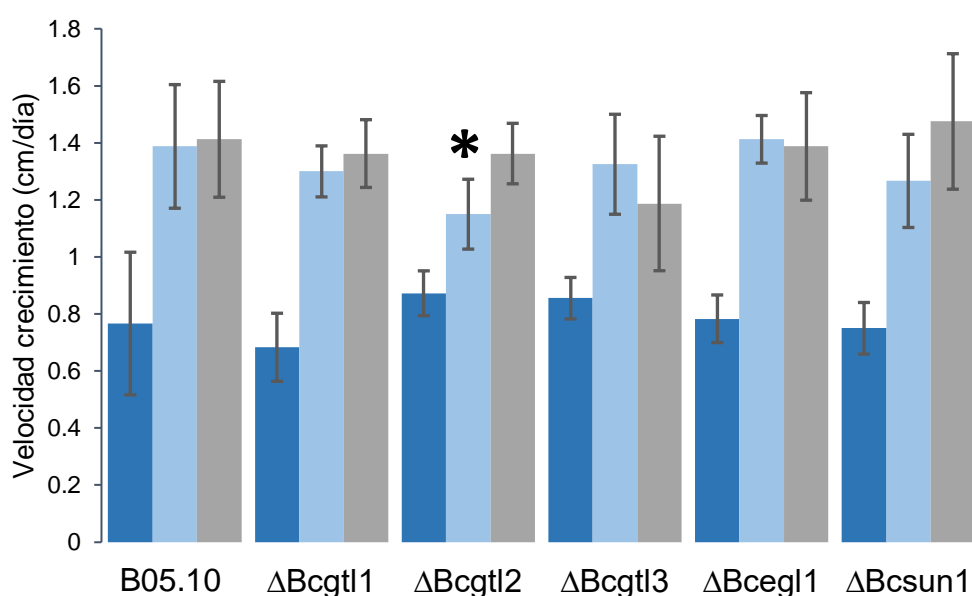


Fig. 4. Crecimiento de las cepas mutantes en medio YGG en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las cepas indicadas fueron crecidas en medio YGG sólido (barras grises), o bien en el mismo medio suplementado con peróxido de hidrógeno 1,5 mM (barras azul claro) o peróxido de hidrógeno 30 mM (barras azul oscuro). Se realizaron tres medidas del radio para cada colonia, a los 3 y 4 días post-inoculación. A partir de esos valores se calculó la velocidad de crecimiento promedio para 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10) bajo las mismas condiciones de crecimiento, según el test T-Student en el caso de una distribución normal o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorv-Smirnov.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que, en medio YGG y ausencia de peróxido de hidrógeno, el crecimiento de las cepas mutantes no difiere significativamente del crecimiento de la cepa silvestre (B05.10), confirmando los resultados anteriores (Fig. 3),

y los descritos por Pérez-Hernández *et al.*, 2017, para la cepa $\Delta Bcsun1$. Sin embargo, en presencia de 1,5 mM H₂O₂, la única cepa que mostró una reducción significativa de su crecimiento respecto a la cepa silvestre fue $\Delta Bcgtl2$, aunque este efecto no se observó cuando la concentración de H₂O₂ se incrementó hasta 30 mM en ninguna de las cepas, incluida $\Delta Bcgtl2$. En el trabajo de Pérez-Hernández *et al.*, 2017, la cepa $\Delta Bcsun1$ mostró una cierta reducción de su crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno 30 mM, Sin embargo, este efecto no se observó en el presente trabajo. A esta concentración de peróxido de hidrógeno, la cepa silvestre sufrió una elevada reducción en su crecimiento, pudiendo llegar a enmascarar el efecto de este compuesto en el crecimiento de las cepas mutantes. Para confirmar los resultados, sería conveniente repetir este experimento, por un lado, aumentando el número de réplicas, y, por otra parte, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en el rango entre 1,5 y 30 mM, con el fin de encontrar una concentración donde se observen con mayor claridad los efectos de este compuesto.

2. Cuantificación de la capacidad productora de conidias y esclerocios

Con el fin de evaluar la capacidad de dispersión y resistencia de las cepas mutantes, se cuantificaron respectivamente las conidias y los esclerocios producidos por las mismas (Fig. 5). Las conidias son esporas asexuales que juegan un papel fundamental en la biología de *B. cinerea*, pues contribuyen a la dispersión del hongo (Ryan *et al.* 2017). Por su parte, los esclerocios constituyen estructuras de resistencia y son masas compactas de micelio que contienen reservas nutritivas que se forman bajo condiciones ambientales adversas, permitiendo al hongo sobrevivir a estos períodos hasta que el medio vuelve a ser favorable para su crecimiento (Ryan *et al.* 2017).

El análisis de los resultados obtenidos indicó que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de conidias por parte de las cepas mutantes respecto a la cepa silvestre (B05.10), sin embargo, sí que se observaron diferencias para la producción de esclerocios. En la mayoría de los casos ($\Delta Bcgtl1$, $\Delta Bcgtl3$, $\Delta Bcegl1$ y $\Delta Bcsun1$), la producción de esclerocios fue mayor en las cepas mutantes, destacando la cepa $\Delta Bcsun1$, que presentó valores más elevados que en el resto de cepas. La mayor producción de esclerocios de la cepa mutante $\Delta Bcsun1$ respecto a la cepa silvestre confirma lo obtenido en trabajos previos enmarcados en este mismo grupo

de investigación (Pérez-Hernández, 2015). En dicho trabajo se observó un incremento en la producción de esclerocios de la cepa $\Delta Bcsun1$ respecto a la cepa silvestre en medio mínimo Gamborg B5 y en medio suplementado con extracto de tomate. En el presente trabajo se confirma que la producción de estas estructuras de resistencia es también mayor en medio YGG. Por otra parte, resultados más recientes obtenidos para la producción de esclerocios por parte de la cepa $\Delta Bcsun1$ (Pérez-Hernández *et al.*, 2017) también son confirmados en el presente trabajo. Sin embargo, la producción de esclerocios por parte de la cepa mutante $\Delta Bcgtl2$ fue menor que la producida por la cepa silvestre, por lo que parece ser que la implicación de BcGTL2 en la producción de esclerocios resulta diferente a la del resto de proteínas estudiadas, pues su ausencia en la cepa mutante $\Delta Bcgtl2$, al contrario que en el resto, existe una menor producción de estas estructuras de resistencia. De forma general, estos resultados indican que las proteínas BcGTL1, BcGTL2, BcGTL3, BcEGL1 y BcSUN1 deben estar implicadas de alguna manera en la respuesta del hongo a condiciones ambientales adversas mediante la producción de esclerocios.

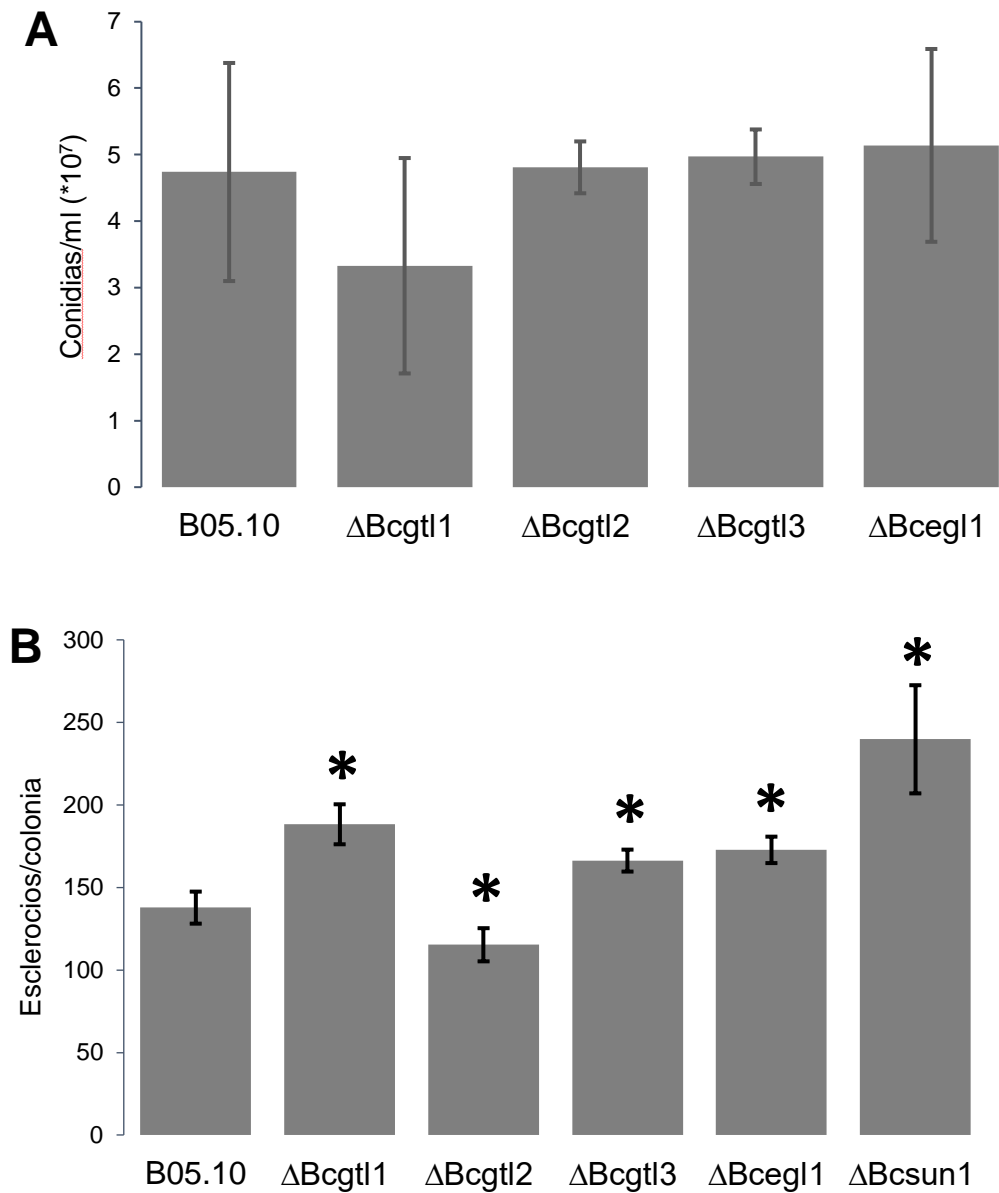


Fig. 5. Cuantificación de la producción de conidias y esclerocios de las cepas mutantes. A) . Número promedio de conidias por mililitro producidas durante el crecimiento de micelio joven de las cepas mutantes en placas de tomate-agar durante 10 días para 2 réplicas biológicas. **B)** Número promedio de esclerocios producidos por colonia en medio YGG para 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10), según el test T-Student en el caso de una distribución normal o el test U de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorv-Smirnov.

3. Análisis de la virulencia en hojas de judía (*Phaseolus vulgaris*)

Con el fin de analizar la capacidad infectiva o virulencia de las cepas mutantes, se utilizaron hojas de judía (*Phaseolus vulgaris*) como hospedador vegetal, las cuales fueron infectadas utilizando suspensiones de conidias de las diferentes cepas estudiadas.

En primer lugar, se analizó el porcentaje de inoculaciones que fueron capaces de prosperar y causar finalmente una lesión en el hospedador vegetal tras 48 horas de incubación (Tabla 2).

Cepa	B05.10	$\Delta Bcgt1$	$\Delta Bcgt2$	$\Delta Bcgt3$	$\Delta Bcegl1$
%infecciones	63,16	62,26	81,67	66,67	76,12
n	57	53	60	57	67

Tabla 2. Tabla con el porcentaje de inoculaciones que prosperan de las cepas mutantes. Estos valores indican el porcentaje de inoculaciones que progresaron y dieron lugar a una lesión, siendo n = número de inoculaciones.

El análisis del porcentaje de inoculaciones que prosperaron mostró que las mutaciones estudiadas no parecen afectar negativamente a la adhesión y/o penetración de los tejidos vegetales, dado que, en general, los porcentajes obtenidos son similares a los observados para la cepa silvestre (B05.10). Sin embargo, las cepas mutantes $\Delta Bcgt2$ y $\Delta Bcegl1$ mostraron valores algo superiores, lo que podría deberse a posibles variaciones en el material biológico utilizado para la infección, más que a la posible implicación de estas proteínas en la capacidad de infección. Por otra parte, estos resultados coinciden con lo descrito por Pérez-Hernández *et al.*, 2017 respecto a la capacidad infectiva de la cepa $\Delta Bcsun1$ en hojas de judía, para la cual no se observaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre en el número de inoculaciones que prosperaron.

Otra forma de evaluar la capacidad infectiva del hongo consiste en determinar el área de las infecciones producidas, por lo que se analizó el área de la infección de las lesiones que habían prosperado tras 48 horas de incubación (Fig. 6).

A

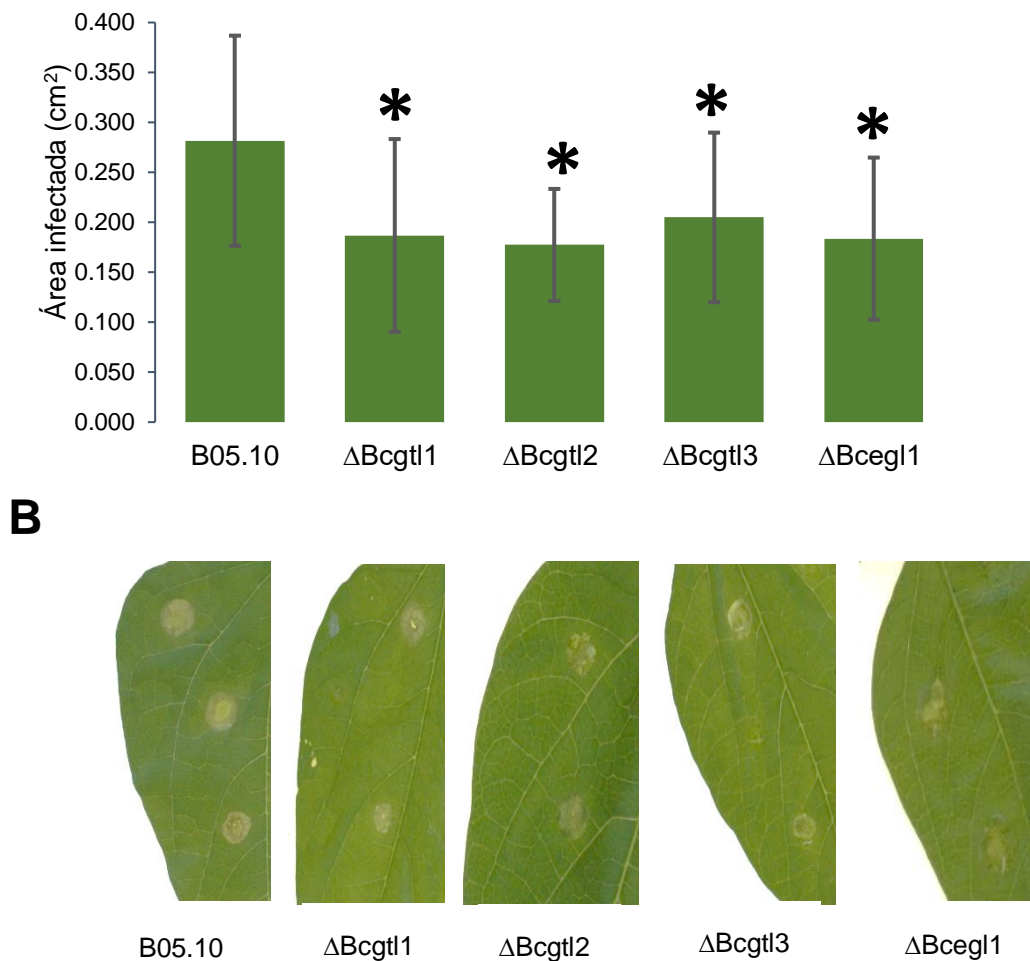


Fig. 6. Capacidad infectiva de las cepas mutantes en hojas de judía. (A) Análisis del área de infección de las lesiones producidas por las cepas mutantes en hojas de judía (*Phaseolus vulgaris*). Las hojas fueron inoculadas con 5 μ l de una suspensión de conidias de 2×10^5 conidias/ml y se midió el área de infección a las 48 h post-inoculación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la cepa silvestre (B05.10), según el test T-Student en el caso de una distribución normal o el test U de Mann-Whitney en caso de la distribución no fuese normal. La normalidad fue analizada mediante el test de Kolmogorv-Smirnov ($n > 33$). (B) Imágenes representativas de las lesiones producidas tras 48 h de infección.

El análisis de los resultados obtenidos indicó que el área de las lesiones producidas por las cepas mutantes fue significativamente menor que el área de las lesiones producidas por la cepa silvestre (B05.10). Esto indica que las proteínas BcGTL1, BcGTL2, BcGTL3 y BcEGL1 deben estar implicadas de alguna manera en la capacidad infectiva de *B. cinerea*. Estos resultados respaldan lo obtenido en trabajos previos (Pérez-Hernández, 2015), donde se realizaron ensayos similares, pero llevados a cabo en otros hospedadores vegetales, obteniéndose una reducción significativa en la capacidad infectiva de la cepa mutante $\Delta Bcgtl2$ en pétalos de gerbera, y de las cepas mutantes $\Delta Bcgtl3$ y $\Delta Bcegl1$ en hojas de parra. Sin embargo, en el caso de la cepa mutante $\Delta Bcgtl1$ no se había descrito

ninguna reducción en la virulencia en otros hospedadores, lo que puede indicar un papel específico de la proteína BcGTL1 en la infección de hojas de judía.

Conclusiones

Conclusiones:

1. La proteína BcSUN1 podría estar implicada en la estabilidad de la pared y/o las envueltas celulares y en la producción de estructuras de resistencia de *Botrytis cinerea*.
2. Las proteínas BcGTL1, BcGTL3 y BcEGL1 podrían estar implicadas en la producción de estructuras de resistencia y en la virulencia de *Botrytis cinerea*.
3. La proteína BcGTL2 podría estar implicada en la respuesta frente al estrés oxidativo, en la producción de esclerocios y en la capacidad infectiva de *Botrytis cinerea*.

Conclusions:

1. The protein BcSUN1 might be involved in the stability of the cell wall and/or the cell envelope and in the production of resistance structures in *Botrytis cinerea*.
2. The proteins BcGTL1, BcGTL3 and BcEGL1 might be involved in the production of resistance structures and in the virulence of *Botrytis cinerea*.
3. The protein BcGTL2 might be involved in the oxidative stress response, in the production of sclerotia and in the virulence of *Botrytis cinerea*.

Bibliografía

Bibliografía

- Cabib E, Farkas V, Kosík O, Blanco N, Arroyo J, et al.** 2008. Assembly of the yeast cell wall Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 29859-29872.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodríguez Peña, J. M. y Arroyo, J.** 2007. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1,6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*. **63**: 921-935.
- de Medina-Redondo, M.** 2008. Caracterización de las β -1, 3-glucanosil-transferasas de la familia GH72 implicadas en la remodelación de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe* (tesis doctoral). Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, et al.** 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**:414-430.
- Droby, S. y Lichter, A.** 2007. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management, p. 349-367. *En*: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Elad, Y., Vivier, M., Fillinger, S.** 2016. *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly, p. 1-15. *En*: Fillinger, S. and Elad, Y. (eds.), *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Heidelberg.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N.** 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction, p. 1-8. *En*: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R. y González, C.** 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* **10**: 3020-3034.
- González, M., Brito, N. y González, C.** 2012. High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the extracellular proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiology* **12**: 213.
- González, M., Brito, N., González, C.** 2014. Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology* **14**: 254.
- Goto M.** 2007. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**: 1415-1427.
- Hahn M, Viaud M, van Kan J.** 2014 The genome of *Botrytis cinerea*, a ubiquitous broad host range necrotrophy, p. 19-44. *En*: Dean, R., Lichens-Park, A., Kole, C.(eds.), *Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: dicot pathogens*. Springer, Heidelberg.
- Hahn, M., Leroch, M., Mosbach, A., Mernke, D., Kretschmer, et al.** 2010. "Multidrug resistance" in *Botrytis cinerea*: Molecular basis and practical relevance of a new fungicide resistance mechanism in agriculture. *Julius-Kühn-Archiv* **428**: 172.
- Hanisch F.** 2001. O-glycosylation of the mucin type. *Biological Chemistry* **382**: 143-149.

Heard S, Brown NA, Hammond-Kosack K. 2015. An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS one* **10**: e0130534.

Kuznetsov, E., Kučerová, H., Váchová, L., Palková, Z. 2013. SUN Family Proteins Sun4p, Uth1p and Sim1p Are Secreted from *Saccharomyces cerevisiae* and Produced Dependently on Oxygen Level. *PLoS ONE* **8**: e73882.

Lian J, Han H, Zhao J, Li C. 2017. In-vitro and in-planta *Botrytis cinerea* inoculation assays for tomato. *Plant Cell*.

Pérez-Hernández, A. 2015. Identificación de proteínas del secretoma de *Botrytis cinerea* implicadas en el metabolismo de la matriz extracelular. Trabajo de Fin de Grado. Grado en Biología. Universidad de La Laguna. España.

Pérez-Hernández, A., González, M., González, C., van Kan, J. A., Brito, N. 2017. BcSUN1, a *B. cinerea* SUN-family protein, is involved in virulence. *Frontiers in microbiology* **8**: 35.

Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. y Van Kan, J. A. L. 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens, p. 33-64. *En: Kronstad, J. (ed.), Fungal Pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.*

Schumacher, J., Tudzynski, P. 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*, p. 225-241. *En: Pérez, J., Di Pietro, A. (eds.), Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Springer, Heidelberg.*

Staats, M. y van Kan, J. A. L. 2012. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell* **11**: 1413-1414.

Van Kan JA, Stassen JH, Mosbach A, Van Der Lee, Theo AJ, et al. 2017. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology* **18**: 75-89.

Paredes Escalante JE, Carrillo Facio JA, Sañudo Barajas JA, Allende Molar R, García Estrada RS, et al. 2011. Enzimas Líticas Producidas por *Trichoderma* spp. y su Correlación con la Inhibición in vitro de Patógenos Causantes de la Pudrición de la Raíz del Garbanzo. *Revista mexicana de fitopatología* **29**: 73-75.

Ryan K., Ray C., Ahmad N., Lawrence W., Lagunoff M., et al. 2017. Hongos. Conceptos básicos, capítulo 42. *En: Ryan, K. and Ray, C (eds.), Sherris. Microbiología médica. McGraw-Hill Interamericana Editores, México D.F.*

Portal de Guías Docentes de la ULL. Personal docente e investigador, Celedonio González Díaz. (https://www.ull.es/apps/guias/guias/view_teacher/53990/425/). Abril 2019.