



Universidad Andrés Bello

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias de la Vida
Escuela de Biociencias
Ingeniería en Biotecnología

**“Caracterización del sistema de incorporación de hierro
Fet3/Ftr1 en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y evaluación
de su participación en el proceso de infección.”**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magíster en Biotecnología.

Director de tesis: **Dr. Paulo Canessa Aguila**

Facultad de Ciencias de la Vida
Universidad Andrés Bello

**Esteban Pablo Vásquez Montaña
Santiago, Chile.**

Mayo, 2019.

“Con especial dedicación a mi familia, madre, padre, hermano y hermana que sin ellos nada de esto podría ser posible. Gracias por la oportunidad entregada.”

Agradecimientos.

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Paulo Canessa, por la oportunidad de poder trabajar en su laboratorio y ser parte de éste desde su inicio acá en la universidad. Además de potenciar mis ganas de aprender, fomentando mi curiosidad e impulsando mi formación científica. Agradezco al financiamiento otorgado por FONDECYT, así como por el Instituto Milenio de Biología Integrativa (iBio).

Por otra parte, quisiera agradecer a la gente de mi grupo de trabajo en el laboratorio del Dr. Canessa, quienes me han apoyado y ayudado constantemente en este largo camino. También quiero destacar al personal del Centro de Biotecnología Vegetal de la UNAB, de los otros laboratorios, quienes estuvieron disponibles y dispuestos a ayudar en todas las ocasiones que los requerí.

Finalmente, y más importante, debo dar las gracias a toda mi familia en particular a mi Mamá, Papá, Hermano y Abba, por su infinita paciencia, fueron la principal fuente de motivación y energía cuando no la hubo. Por otra parte, debo agradecer a la familia que elegí, mis amigos, en especial, Daniel, Daniela, Diego, Francisca, Nicolás, Sebastián y Pablo, simplemente debo decir que su apoyo incondicional y sus consejos han sido los mejores, gracias a todos por tanto.

Índice.

| | |
|---|----|
| 1. Símbolos y abreviaturas..... | 1 |
| 2. Resumen..... | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 4. Hipótesis..... | 14 |
| 5. Objetivos | 14 |
| 5.1 Objetivo general..... | 14 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 6. Materiales y métodos..... | 15 |
| 6.1.0 Material biológico utilizado en esta tesis..... | 15 |
| 6.1.1 Identificación y caracterización bioinformática de genes ortólogos del sistema RIA en <i>B. cinerea</i> | 15 |
| 6.1.2 Diseño de construcciones génicas para deleccionar mediante reemplazo alélico los genes <i>bcfet3</i> y <i>bcftr1</i> de <i>B. cinerea</i> | 16 |
| 6.1.3 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para ensamblar las construcciones génicas..... | 18 |
| 6.1.4 Selección de colonias de <i>S. cerevisiae</i> y PCR de diagnóstico..... | 19 |
| 6.1.5 Extracción de DNA plasmidial de colonias transformadas..... | 19 |
| 6.1.6 Amplificación de la construcción desde DNA plasmidial..... | 20 |
| 6.1.7 Condiciones de crecimiento y transformación de la cepa B05.10 de <i>B. cinerea</i> | 20 |
| 6.1.8 Extracción de DNA genómico de las cepas transformadas y genotipificación de las mutantes..... | 22 |
| 6.1.9 Determinación del número de inserciones del gen de resistencia <i>hph</i> en cepas transformadas de <i>B. cinerea</i> | 25 |
| 6.2.0 Crecimiento miceliar de la cepa mutante $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ en medio PDA y PDA-planta en condiciones de fotoperíodo..... | 27 |
| 6.2.1 Cuantificación de hierro en las cepas mutante $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6.3.0 | Ensayos de infección de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto) y <i>Arabidopsis thaliana</i> | 28 |
| 6.3.1 | Desarrollo del fenotipo de infección de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ en plantas de <i>A. thaliana</i> cultivadas en medio hidropónico en condiciones de deficiencia de hierro..... | 30 |
| 6.3.2 | Tinción con 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) y azul algodón sobre hojas de <i>A. thaliana</i> infectadas con las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ | 31 |
| 6.4. | Análisis estadísticos..... | 32 |
| 7. | Resultados..... | 33 |
| 8.0 | Discusión..... | 56 |
| 9.0 | Conclusiones..... | 64 |
| 10. | Referencias..... | 65 |

Índice de figuras.

Figura 1. Esquema comparativo de motivos conservados en las proteínas BcFet3 y BcFtr1 de *B. cinerea*.

Figura 2. Locus *bcfet3/bcftr1* de *B. cinerea*.

Figura 3. Visualización en gel de agarosa al 0.8% de los fragmentos amplificado mediante PCR para genotipificar las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$.

Figura 4. Curvas de calibración para los amplicones de qPCR denominados “amp97/98” y “amp32/687”.

Figura 5. Caracterización fenotípica del desarrollo de conidias de la cepa mutante $\Delta bcftr1$.

Figura 6. Caracterización fenotípica del desarrollo de conidias de la cepa mutante $\Delta bcfet3$.

Figura 7. Caracterización fenotípica del desarrollo de esclerocios en la cepa mutante $\Delta bcfet3$ en medios PDA y PDA-planta.

Figura 8. La mutante $\Delta bcfet3$ desarrolla esclerocios de manera dependiente de la concentración de hierro.

Figura 9. Cuantificación intracelular de hierro total en la cepa $\Delta bcfet3$ crecida en medio PDA.

Figura 10. Ensayo de infección y cuantificación del área de la lesión provocada por la infección de la cepa $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*.

Figura 11. Ensayo de infección y cuantificación del área de la lesión provocada por la cepa $\Delta bcfet3$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* y *P. vulgaris*.

Figura 12. Ensayo de infección provocado por la infección de la cepa $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* en condiciones deficientes de hierro.

Figura 13. Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hojas de *A. thaliana* infectadas con la cepa $\Delta bcftr1$ y $\Delta bcfet3$ de *B. cinerea*

Figura 14. Modelo de trabajo generado a partir de los resultados obtenidos en esta tesis.

Índice de tablas:

Tabla 1. Partidores utilizados para amplificar por PCR y ensamblar mediante recombinación homóloga en levadura las construcciones genéticas que permitieron generar las mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*.

Tabla 2. Partidores utilizados para comprobar por PCR los clones transformados de $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*.

Tabla 3. Partidores utilizados para determinar el número de inserciones del gen *hph* mediante reacciones de qPCR en las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*.

Tabla 4. Promedio y razón del número de copias amplificadas por qPCR desde DNA genómico de los aislados de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$.

1. Símbolos y Abreviaturas.

[Fe]-: Concentraciones limitantes de hierro

[Fe]+: Concentraciones suficientes de hierro

Δ : *knock-out*

$\Delta bcfet3$: *Botrytis cinerea* mutante en el gen *bcfet3*

$\Delta bcftr1$: *Botrytis cinerea* mutante en el gen *bcftr1*

°C: Grados Celsius

B05.10: *Botrytis cinerea* silvestre

BPSD: ácido bialofenantrolina disulfónico

gr: Gramo

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DNA: ácido desoxirribonucleico

hrs: horas

Kb: kilo base

M: Molar

MCO: oxidasa multicobre

ml: Mililitro

ORF: marco de lectura abierto

pb: pares de bases

PDA: agar papa dextrosa

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

SC- URA(-): medio sintético completo sin uracilo

w/v: peso/ volumen

YPD: extracto de levadura, peptona, dextrosa

μ g: Microgramo

μ l: Microlitro

μ M: Micromolar

2. Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógono que infecta un número muy significativo de especies vegetales de interés comercial, afectando principalmente el cultivo de frutilla, uva y tomate, entre otros. Este hongo produce necrosis en los tejidos vegetales que infecta, destruyendo la célula hospedera para obtener los nutrientes, generando cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial. Debido a esto, el estudio de las estrategias de infección de *B. cinerea* tiene una gran relevancia. Los mecanismos de infección son complejos y variados, y están regulados por distintos factores moleculares y ambientales. Entre las variables ambientales, los micronutrientes juegan un papel fundamental, pero pese a ello, en el caso de *B. cinerea*, no existe mayor información respecto de cómo distintos micronutrientes pueden incidir en el desarrollo e infección causada por el hongo. En particular, se ha descrito que el hierro es un micronutriente esencial para el desarrollo de la mayoría de los organismos, jugando un papel fundamental en las infecciones de muchos patógenos. Además, está involucrado en las respuestas de plantas frente a estos organismos. En *B. cinerea*, los mecanismos de captación de hierro no están estudiados, pero la presencia en el genoma de secuencias que codifican para proteínas hipotéticas asociadas a captación de hierro hace pensar que este micronutriente, también estaría jugando un rol fundamental en este organismo. Las proteínas de interés corresponden a Fet3 y Ftr1, caracterizadas inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* como parte del sistema de captación de hierro de alta afinidad, que también ha sido descrito en hongos fitopatógonos. Fet3 es un ferroxidasa de membrana que permite la oxidación del metal, el que ingresa al intracelular por medio de Ftr1, una permeasa de hierro. Mediante recombinación homóloga en el genoma de *B. cinerea*, se deletaron los genes ortólogos a *fet3* y *ftr1*, los que fueron denominados *bcfet3* y *bcftr1*. De esta forma, se estudió cómo una variable ambiental, hierro, afecta el desarrollo de la infección causada por el hongo en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*. Los resultados muestran que la cepa mutante $\Delta bcfet3$ posee un fenotipo de crecimiento/ desarrollo atípico en condiciones de ciclos de luz/oscuridad. En comparación con la cepa silvestre, la mutante $\Delta bcfet3$ presenta un retraso en el desarrollo de conidias y formación de estructuras de sobrevivencia denominadas esclerocios, las que se generan normalmente condiciones desfavorables. La formación de estas estructuras se revierte de manera dependiente de la concentración de hierro. Adicionalmente, ensayos de virulencia indican que la cepa mutante $\Delta bcfet3$ genera lesiones significativamente más grandes, en comparación, con la lesión causada por la cepa B05.10 (silvestre). Contrario a lo que ocurre con la cepa $\Delta bcftr1$ donde no se observaron diferencias en el área de lesión. Ensayos cualitativos realizados *in planta* nos permiten sugerir fuertemente, que la lesión causada por la mutante $\Delta bcfet3$ provoca un estallido oxidativo más extenso que el causado por la cepa B05.10 o la mutante $\Delta bcftr1$.

3. Introducción

Los hongos son organismos eucariontes que pertenecen al reino fungi, el cual está conformado por especies muy diversas en cuanto a su estilo de vida, siendo posible encontrar representantes que utilizan variadas fuentes de nutrientes. Entre las estrategias empleadas para la obtención de nutrientes se pueden mencionar los modos saprófitos, parásito, necrotrófico y el utilizado por las micorrizas (Bidartondo, 2005), entre otros.

Los hongos fitopatógenos representan un campo relevante de estudio, tanto desde un punto de vista fundamental como aplicado. Como se mencionó anteriormente, estos organismos pueden utilizar distintas estrategias para la obtención de los nutrientes a partir del vegetal infectado. Algunos de estos hongos son causantes de pérdidas millonarias todos los años en el rubro agrícola, poniendo en riesgo la alimentación de buena parte de la población mundial (Oerke *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la industria arrocera, el hongo *Magnaporthe oryzae* provoca pérdidas superiores al 60% de la producción, lo que genera cuantiosas pérdidas económicas (Khush, 2005). Por esta razón y otras, *M. oryzae* ha sido sujeto de activo estudio en los últimos años (Jones *et al.*, 2016) siendo empleado como modelo biológico para entender la interacción planta-patógeno en diversos centros de investigación (Fisher *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 2012). Otro hongo muy relevante a nivel mundial es *Botrytis cinerea*. Este hongo es considerado el segundo fitopatógeno fúngico más importante a nivel mundial después de *M. oryzae*, tanto en términos científicos como comerciales (Dean *et al.*, 2012).

B. cinerea tiene gran relevancia en la industria agrícola en general y en la vitivinícola en particular ya que produce pérdidas estimadas entre 10 a 100 billones de USD al año en el mundo, lo que se explica esencialmente por el amplio rango de organismos vegetales que es capaz de infectar y su versatilidad para desarrollarse e infectar cultivos en climas muy diversos (Watkinson *et al.*, 2015). Se estima que los fungicidas asociados a su control, comúnmente denominados “Botrycidas”, representan aproximadamente el 10% de la producción mundial de este tipo de agroquímicos (Dean *et al.*, 2012), lo que permite ejemplificar en parte los problemas económicos asociados a este hongo necrotrófico.

3.1 Mecanismos de infección de *Botrytis cinerea*.

B. cinerea es un ascomicete filamentoso perteneciente a la familia *Sclerotiniaceae*. Este organismo fitopatógeno es causante de la enfermedad conocida como moho gris o pudrición gris, la que afecta a un gran número de especies y cultivos vegetales comerciales en Chile y en el mundo. La enfermedad se caracteriza por producir el deterioro de los tejidos vegetales que infecta hasta su completa maceración, lo que conlleva la aparición de un “moho” de color gris en la zona afectada (Elad *et al.*, 2015). Entre los principales organismos hospederos de este hongo fitopatógeno se encuentran frambuesas, arándanos, frutillas, uvas, brócoli, lechuga, repollo, porotos, garbanzos y habas (Pande *et al.*, 2005; van Kan, 2006).

B. cinerea presenta un modo de infección necrotrófico generando lesiones necróticas principalmente a plantas dicotiledóneas de tejido vegetal joven, maduro o senescente, ya que necesita producir la muerte de las células vegetales, degradando la pared celular y membranas, para obtener los nutrientes desde las células hospederas (van Kan, 2006). El hongo es capaz de infectar tanto hojas, tallos y frutos, pudiendo infectar en etapas tempranas del desarrollo de los cultivos, hasta las etapas finales o inclusive durante el periodo de postcosecha de los vegetales que son comercializados (Dean *et al.*, 2012).

Los procesos y los mecanismos moleculares que permiten el establecimiento exitoso de la infección causada por *B. cinerea* aún no se conocen por completo. Si bien el ciclo de infección de *B. cinerea* está descrito (Amselem *et al.*, 2011), aún no se conocen del todo los mecanismos moleculares involucrados. *B. cinerea* ha demostrado ser muy versátil al momento de iniciar una infección, logrando adaptarse y sobrepasar los mecanismos de defensa de la planta, las variaciones en el clima y las medidas de control biológico utilizados por agricultores (Latorre, Spadaro y Rioja, 2002; Saito, Michailides y Xiao, 2016).

Se han descrito dos maneras que permiten iniciar el ciclo infeccioso de *B. cinerea*. Por una parte, puede ocurrir que una conidia o espora (denominada formalmente macroconidia: forma teleomorfa) sea transportada por corrientes de aire, llegando hasta una herida de una planta o un tejido vegetal previamente infectado por otro patógeno. Si la conidia de *B. cinerea* logra germinar, el hongo es capaz de desarrollar la infección sin la necesidad de generar una penetración inicial en la superficie del tejido. Adicionalmente, el hongo es capaz de comenzar una infección en tejidos sanos, donde no existe una herida o entrada que facilite su desarrollo. Para producir la herida inicial el hongo secreta variadas enzimas hidrolíticas que degradan la cutícula, la pared y la membrana de la célula vegetal (Kars *et al.*, 2005; Abuqamar *et al.*, 2017). Cuando la conidia germina se desarrolla una estructura especializada denominada apresorio, que es una hifa modificada que le permite penetrar la pared celular de los tejidos vegetales y con la ayuda de la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, moléculas de bajo peso molecular y toxinas, se genera un ambiente ideal sobre el tejido vegetal, necesario para la actividad de las enzimas secretadas, y de esa forma penetrar y desarrollar una lesión primaria (Abuqamar *et al.*, 2017). Estas enzimas secretadas son principalmente celulasas, hemicelulasas y proteasas, necesarias para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular y la degradación de las proteínas de la membrana vegetal. Otras enzimas involucradas en la penetración de la pared celular primaria son las pectinasas, requeridas para degradar la pectina de la pared celular primaria de la célula vegetal, además de enzimas como cutinasas para degradar las capas de cerosas (cutina) en la superficie de las hojas, que forman la cutícula de la pared celular primaria de las plantas (Holz, Coertze y Williamson, 2007).

Entre las moléculas de bajo peso molecular se puede mencionar la producción de ácido oxálico. Este ácido orgánico puede influir en la capacidad de generar una infección por parte de *B. cinerea* y se plantea que es la secreción de este compuesto, el primer agente de fitopatogenicidad del hongo (Manteau *et al.*, 2003). Se ha visto que, en ambientes con pH bajos, se ve aumentada la producción de enzimas que son secretadas al medio por el hongo, además de estimular la producción de oxalato (Holz, Coertze y Williamson, 2007).

3.2 Ciclo de vida e infección en condiciones naturales de *Botrytis cinerea*.

Cuando *B. cinerea* establece una infección exitosa sobre un tejido vegetal, destruye grandes porciones de la planta, macerando finalmente todo el tejido. El hongo logra desarrollar hifas que se diferencian de aquellas vegetativas y que producen la formación de conidióforos sobre los tejidos afectados, con la concomitante producción de conidias que vuelven a iniciar el ciclo de la infección (Amselem *et al.*, 2011). Los conidióforos son estructuras microscópicas especializadas en la producción de conidias durante el ciclo de vida asexual del hongo, lo que permite su diseminación vía conidias en el ambiente, posibilitando el ciclo infeccioso en otra planta. Por otro lado, el hongo es capaz de formar otras estructuras en los tejidos infectados y en suelos con materia orgánica, denominados esclerocios, que le permiten sobrevivir por más tiempo, superando periodos donde las condiciones ambientales son adversas para su desarrollo e infección. Los esclerocios se forman generalmente durante el invierno cuando las bajas temperaturas favorecen su desarrollo. Para que las conidias o los esclerocios germinen deben presentarse las condiciones propicias que le permitan salir del estado dormante en que se encuentran (van Kan, 2006).

El ciclo de reproducción sexual del hongo se inicia cuando las condiciones ambientales son desfavorables. La formación de esclerocios va acompañada de la generación de estructuras mononucleadas denominadas microconidias las que pueden fertilizar los esclerocios (de *mating type* opuesto) y que luego de un proceso de vernalización, transcurrido el invierno, permiten el desarrollo de una estructura denominada apotecio. En esta estructura es donde se desarrollan las ascas que contienen las ascosporas. Cuando estas ascosporas se depositan sobre un sustrato adecuado, germinan y comienzan nuevamente con el ciclo de vida. El método de reproducción que emplee el hongo va a estar controlado principalmente, por las variables ambientales incluyendo esencialmente luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Schumacher y Tudzynski, 2012.).

El proceso de germinación de las conidias producidas por *B. cinerea* ocurre cuando las condiciones ambientales lo permiten. El principal nutriente requerido es el propio tejido vegetal, el que es infectado cuando las condiciones de humedad relativa en el ambiente

superan el 80%. Se ha observado que el hongo tiene mayor facilidad para desarrollarse e iniciar la infección cuando los niveles de humedad son cercanos al 99% (Droby y Lentz, 1968). Otra variable ambiental crítica que permite el desarrollo de la enfermedad causada por *B. cinerea*, es la temperatura. Al respecto, se ha descrito que *B. cinerea* es capaz de germinar, crecer e infectar un tejido vegetal de manera óptima a 20°C (Berg y Lentz 1968) observándose que, existen diferencias en la tasa de germinación, crecimiento y nivel de infección cuando las temperaturas varían, siendo capaz de germinar, crecer e infectar entre 12° y 30°C (Droby y Lichter, 2004; Shpialter *et al.*, 2009).

El desarrollo del hongo no sólo se ve afectado por variables ambientales como humedad y temperatura. Además, existen variables como el pH, concentración de azúcares, concentración de sales, presencia o ausencia de luz y las concentraciones de nutrientes, que son necesarias para el desarrollo de *B. cinerea* (Holz, Coertze y Williamson, 2007; Nassr y Barakat, 2013). En particular, la disponibilidad de micronutrientes es determinante en el desarrollo del *B. cinerea*. Sin estos, la capacidad de generar la lesión -y crecer en el tejido vegetal- se ve afectada. Esto se debe a que muchas de las enzimas que están involucradas en el desarrollo de la infección tanto en hongos como en bacterias, en procesos como, la degradación de la cutícula, pared celular y desestabilización de la membrana y la pared vegetal utilizan distintos micronutrientes, como iones metálicos, necesarios para la estabilización de los sitios catalíticos de las enzimas, actuando como cofactores de éstas. Dentro de los cofactores enzimáticos, se encuentran iones metálicos, como Mg, Mn, Ni, Cu, Zn y Fe (Porcheron *et al.*, 2013; Gerwien *et al.*, 2017).

3.3 Hierro, un micronutriente esencial.

Este elemento metálico, conocido como elemento de transición al igual que el aluminio, cobre y níquel, posee un electrón desapareado, por lo que reacciona muy fácilmente con moléculas que se encuentran en el interior de las células (Brock y Gustafson, 1976). El hierro se encuentra entre los minerales metálicos más comunes y abundantes del planeta, tanto en las capas externas (corteza), como en las internas (núcleo), asociando su

presencia fuertemente a cuerpos rocosos ubicados en la corteza terrestre. En general el hierro no está biodisponible en gran cantidad (disponible para la incorporación de los organismos) dado que usualmente se encuentra asociado a otros compuestos que son capaces de quelar el metal cambiando su estado de oxidación, volviendo más compleja su incorporación (Jickells *et al.*, 2005). Además, existen otros factores como el pH y el potencial redox que alteran la solubilidad de los metales en los suelos, influyendo en la biodisponibilidad de estos, presionando a los organismos como plantas, hongos y bacterias a utilizar sistemas de incorporación de alta afinidad para la captura de metales en condiciones de baja biodisponibilidad, como por ejemplo en ambientes con un alto nivel de oxígeno, donde los metales se vuelve menos solubles y más tóxicos (Silviera *et al.*, 2003; Basta *et al.*, 2004).

Este micronutriente es esencial para todas las formas de vida, ya que es crucial para la catálisis de reacciones redox, las que involucran la transferencia de electrones entre distintas moléculas requeridas para importantes procesos bioquímicos.

Es posible encontrar hierro en dos estados de oxidación, Fe^{2+} y Fe^{3+} . Sin embargo, también se han encontrado compuestos con estados de oxidación poco convencionales ($4+$, $5+$, $6+$) (Snyder *et al.*, 1989). Los estados de oxidación del hierro se encuentran en una dinámica constante dentro de los organismos ya que, existen moléculas oxidantes producidas como por ejemplo, el peróxido de hidrógeno u otras, que generan la oxidación de Fe^{2+} formando Fe^{3+} . Dentro de las principales reacciones de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) se encuentra la oxidación de hierro Fe^{2+} producto de la presencia de peróxido de hidrógeno, la que genera radical hidroxilo el que, debido su alta inestabilidad, provocando mayor estrés oxidativo. Para mantener una dinámica cíclica del hierro en la célula, el Fe^{3+} luego es reducido por agentes antioxidantes o enzimas como hierro reductasas, asegurando la disponibilidad de hierro Fe^{2+} y el control en la formación de ROS (Fenton, 1899; Lyon, Goodman y Williamson, 2007).

Este micronutriente es un importante cofactor requerido por cientos de enzimas involucradas en diversos procesos como la síntesis de distintos componentes celulares, lo que incluyen lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Dentro de los procesos bioquímicos más

relevantes que requieren hierro se puede mencionar la fijación de nitrógeno, el ciclo de Krebs, la respiración celular, el transporte y flujo de electrones, reparación y replicación del DNA, remodelamiento de la cromatina, traducción de proteínas y transporte de oxígeno (Pérez *et al.*, 2005; Philpott, 2006). Adicionalmente, distintas proteínas que unen hierro sirven como sensores y reguladores de la expresión de varias vías de señalización relacionadas con los procesos celulares y moleculares mencionados anteriormente. Sin embargo, la desregulación en las concentraciones de hierro intracelular puede producir efectos tóxicos debido a la formación de radicales libres en el citoplasma. Por esto, es de vital importancia para la célula mantener un adecuado control de los niveles de hierro y de iones metálicos, que garanticen por un lado la disponibilidad, pero que al mismo tiempo no sean tóxicos para la célula. La acumulación de radicales libres es altamente perjudicial ya que genera daño a nivel del DNA, superoxidación de lípidos y oxidación de proteínas lo que puede generar desestabilización en las membranas celulares y daños en distintos organelos (Bigarella, Liang y Ghaffari, 2014).

En general las estrategias para capturar hierro desde el ambiente son bastante conservadas. De hecho, en organismos eucariontes como plantas y hongos, se han descrito dos estrategias principalmente: el primer sistema de captación de hierro involucra la producción moléculas de bajo peso molecular denominadas sideróforos, los que son producidos también por bacterias, y utilizados por hongos y plantas. Estas moléculas son sintetizadas y excretadas al medio extracelular en condiciones de estrés por la falta de hierro, debido a la baja biodisponibilidad del metal o una baja concentración de este. Existen muchos tipos de sideróforos, los que incluyen la familia de los hidroxamatos, una de las más grandes descritas (Ferramola, *et al.* 2014). Estas moléculas actúan como agentes quelantes del metal, capturándolo para que luego sean reconocidos por receptores de membrana para incorporarlos al intracelular (Miethke y Marahiel, 2007). El segundo mecanismo consiste en la captación del metal por medio de la absorción durante el proceso de reducción de Fe^{3+} biodisponible en el ambiente, el que es reducido inicialmente a Fe^{2+} , acoplado a oxidación y posterior transporte del metal (Haas *et al.*, 2008). A continuación, se describen en mayor detalle los sistemas de captación de hierro, asociados a reducción del metal, en algunos organismos representativos del reino Fungi:

Saccharomyces cerevisiae

El sistema de captación de hierro de *S. cerevisiae* se ha descrito de manera completa y se han establecidos dos principales mecanismos: la adquisición mediada por complejos de membrana que reducen Fe^{3+} , permitiendo la incorporación del metal y un segundo mecanismo, mediado por sideróforos. Sin embargo, *S. cerevisiae* no puede sintetizar estas moléculas, pero pese a ello, es capaz de capturar e incorporar sideróforos producidos por otros organismos como fuente de hierro. Dentro de los sistemas de incorporación de hierro vía complejo de membrana, en *S. cerevisiae*, se describen de dos tipos, de sistemas de baja afinidad y sistemas de alta afinidad (Phillpott, 2006).

Uno de los mecanismos de captación de hierro más estudiados es la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por el sistema de alta afinidad que involucra la acción del sistema de captación denominado RIA (del inglés, *Reductive Iron Assimilation*). Este sistema está conformado principalmente, por el complejo de membrana Fet3/Ftr1, cuyo rol es incorporar a la célula Fe^{3+} desde el medio extracelular (Askwith, *et al.* 1994; Askwith y Kaplan, 1997).

La proteína Fet3 fue originalmente descrita en *S. cerevisiae*. Es una proteína perteneciente a la familia de las oxidasas multicobre (Askwith *et al.*, 1994). Su función bioquímica es oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} . Fet3 forma parte de un sistema de transporte de hierro junto con otra proteína ubicada en la membrana de la célula, conocida como Ftr1. Esta última proteína ha sido descrita como una permeasa de alta afinidad al metal, encargada de transportar hierro (Fe^{3+}) hacia el interior de la célula, incorporando el hierro previamente oxidado por Fet3. En su estructura, presenta siete segmentos transmembrana (Schothorst, Zeebroeck, y Thevelein, 2017).

Cryptococcus neoformans

Al igual que en *S. cerevisiae*, *C. neoformans* es una levadura, pero a diferencia de la primera es un basiomicete. Esta levadura es capaz de infectar mamíferos y posee

mecanismos similares a *S. cerevisiae* para adquirir hierro. La reducción de Fe^{3+} por medio de reductasas es la principal forma de captar hierro tanto para los sistemas de alta afinidad como los de baja afinidad. Se ha descrito que los sistemas de alta afinidad sufren una drástica disminución en su actividad en condiciones deficientes de cobre, lo que no es de extrañar dado que como se mencionó anteriormente, uno de los integrantes del sistema de alta afinidad de captación de hierro es una proteína que pertenece a la familia de las oxidasas multicobre, las que requieren de este metal en su estructura para su actividad catalítica (Solomon, Uma y Timothy, 1996). Las levaduras no producen sideroforos, pero en caso de infectar un mamífero, son capaces de usar transferrinas pertenecientes al organismo hospedero como fuente de hierro, dado que esta proteína es la encargada de transportar el metal por la sangre hasta la médula ósea donde es liberado (Jung *et al.*, 2008).

Candida albicans

Este hongo saprófito oportunista ha sido objeto de estudio por muchos años debido a su capacidad de colonizar tejidos humanos, creciendo en los epitelios de la mucosa, alimentándose de células muertas y en ocasiones generando infecciones sistémicas en hospederos inmunodeprimidos. Desde un punto de vista filogenético esta levadura es muy cercana a *S. cerevisiae* y muchos de sus genes tienen funciones homólogas y secuencias altamente conservadas. Las estrategias de captación de hierro en *C. albicans* son similares a las de *S. cerevisiae* (Howard, 1999). Se ha descrito la presencia de una proteína Fe^{3+} reductasa regulada a nivel transcripcional por la concentración de hierro (Morrissey, Williams y Cashmore., 1996; Ramanan y Wang, 2000). Además, se ha descrito una proteína cobre reductasa regulada por ambos metales (hierro y cobre) (Knight, *et al.* 2005). Estas observaciones sugieren que existe una estrecha asociación entre el metabolismo de cobre y hierro.

Utilizando un modelo murino de infección se determinó que la presencia de la permeasa FRT1 en *C. albicans* es esencial para establecer una infección exitosa, estableciéndose que CaFTR1 (la proteína FTR1 de *C. albicans*) media la captación de hierro, constituyendo un factor de virulencia muy importante de esta levadura (Knight, *et al.* 2005).

En general, se ha descrito que organismos eucariontes con alteraciones en las concentraciones intracelulares de hierro presentan una respuesta inmune deficiente (Bullen *et al.*, 2005). Las infecciones en general son procesos que requieren de la presencia de hierro, ya que juega un papel determinante en la interacción hospedero-patógeno. En humanos se ha demostrado que el aumento en proteínas relacionadas con el transporte de hierro favorece el riesgo de desarrollar una infección provocada por hongos (Weinberg, 2009).

3.4 Hierro en el contexto de la infección de plantas por hongos filamentosos.

Si bien se conoce que los componentes del sistema RIA (Fet3 y Ftr1) participan en el desarrollo de la infección de organismos fúngicos, el caso particular de hongos fitopatógenos ha sido menos estudiado. Un ejemplo es *Ustilago maydis*, un patógeno de maíz que presenta dificultades para desarrollar su ciclo infectivo en ausencia de cualquiera de estas proteínas (Eichhorn *et al.*, 2006). Por el contrario, en el caso de *Cochliobolus heterostrophus*, otro patógeno de maíz que desarrolla lesiones necróticas, el sistema RIA es prescindible para su infección (Condon *et al.*, 2014) al igual que lo observado en *Fusarium graminearum*, otro hongo necrotrófo (Park *et al.* 2009).

Como se mencionó anteriormente, distintas variables ambientales influyen en el desarrollo de *B. cinerea*, y en la infección causada por este hongo. Sin embargo, existen variables que aún no han sido exploradas en el contexto de la infección, siendo una de ellas el micronutriente hierro. En otros hongos patógenos se ha observado que este metal juega un papel fundamental en el proceso infectivo, existiendo muy poca información con respecto a los requerimientos de hierro por parte de *B. cinerea* durante la infección de tejidos vegetales. Para este hongo existen descripciones de la influencia del calcio, fósforo y magnesio (agregados sobre el tejido vegetal) durante el proceso de infección (Shpialter *et al.*, 2009). Los mecanismos por los cuales *B. cinerea* utiliza u obtiene hierro durante el proceso de infección no están descritos. Es más, se desconoce si el metal modula o altera el proceso de infección (Canessa y Larrondo, 2013). Hasta la fecha, sólo existe evidencia de la producción

de hidroxamatos, una familia de sideróforos (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988). Sin embargo, se desconoce si estas moléculas alteran o modulan la infección causada por *B. cinerea*.

Por su parte, en *A. thaliana* se ha demostrado que el hierro es un factor relevante en la respuesta a patógenos (Aznar *et al.*, 2015). La respuesta de defensa de estos organismos frente a patógenos es muy compleja y posee una importante componente en la regulación de la producción de fitohormonas y la interacción entre las distintas vías de señalización. La producción de ácido salicílico es una de las principales vías inducidas durante el ataque de un patógeno biotrófico, lo que a su vez regula la activación de otras vías de fitohormonas como el ácido jasmónico y etileno (Abuqamar *et al.*, 2017), hormonas relacionadas a los procesos de infección por organismos necrotróficos. *A. thaliana*, en respuesta a un patógeno bacteriano necrotrófico, moviliza reservas intracelulares de hierro hacia las zonas que están siendo afectadas por algún patógeno, favoreciendo la reacción de Fenton y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) las que se acumulan en el borde de las lesiones causadas por el fitopatógeno para provocar un ambiente altamente oxidativo, induciendo la deposición de callosa (barrera física para el ataque de patógenos) en las células próximas a la lesión (Aznar *et al.*, 2015). Se ha propuesto que esta deposición funciona como una barrera física que ayuda a frenar el avance de la infección (Liu *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito que plantas de *A. thaliana* mutantes para el gen *IRT1* (que codifica para una proteína que es esencial para la incorporación de Fe^{2+}) son más susceptibles a las lesiones producidas por la infección de la bacteria fitopatogéna *D. dadantii*, en comparación con plantas silvestres de *A. thaliana* (Vert, Briat y Curie, 2002; Nishida, Aisu y Mizuno, 2012).

Considerando que el hierro ha sido descrito anteriormente como un elemento esencial para el desarrollo de una infección exitosa en muchos organismos patógenos incluyendo hongos (Bullen *et al.*, 2005), y teniendo en consideración que se desconoce cómo *B. cinerea* obtiene hierro durante la infección y si este metal modula o altera el proceso de infección, se decidió evaluar la participación del sistema RIA de *B. cinerea*, generando mutantes simples de pérdida de función para los genes ortólogos de *Fet3* y *Ftr1* en este organismo, esperando disminuir la captación de hierro, con la finalidad de entender el papel del metal en el proceso infectivo.

4.Hipótesis

El sistema de captación de hierro Fet3/Ftr1 de *Botrytis cinerea*, es requerido para el desarrollo de la infección en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*.

5.Objetivos

5.1 Objetivo general.

Estudiar la influencia del micronutriente hierro como una variable ambiental que modula el desarrollo de la infección de *Botrytis cinerea*, en cepas mutantes de los principales componentes del sistema RIA de captación hierro.

5.2 Objetivos Específicos.

- I. Generar cepas mutantes de pérdida de función en *B. cinerea* para los genes *bcfet3* y *bcftr1*.
- II. Determinar los fenotipos de desarrollo y capacidad de incorporación de hierro en medios de cultivo en cepas mutantes de los componentes del sistema RIA de *B. cinerea*.
- III. Determinar los fenotipos de infección de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$, en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*.

6. Materiales y Métodos

6.1.0 Materiales biológicos utilizado en esta tesis.

En esta tesis se empleó la cepa B05.10 de *B. cinerea* Pers. Fr. [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], la que fue aislada originalmente en Alemania, por el laboratorio del Dr. Paul Tudzynski. Esta cepa fue gentilmente cedida al Laboratorio de Genética de Hongos Fitopatógenos de la Universidad Andrés Bello y se usó para la generación de mutantes y los experimentos propuestos. Para la realización de contrucciones genéticas (ver más adelante), se utilizó la cepa BY4741 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para los ensayos de infección de plantas se utilizó *Arabidopsis thaliana* Columbia cero (Col-0), y *Phaseolus vulgaris* (variedad “Venus”) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Chile).

6.1.1 Identificación y caracterización bioinformática de genes ortólogos del sistema RIA en *B. cinerea*.

Utilizando la base de datos GenBank se obtuvo las secuencias de los genes *fet3* y *ftr1* de *S. cerevisiae*. Estas secuencias fueron empleadas para realizar un BLAST utilizando la base de datos del genoma de *B. cinerea* B05.10 disponible en la página web Ensembl Fungi (<http://fungi.ensembl.org/index.html>). De esta forma, se identificaron dos genes, los que corresponden a los códigos Bcin02g02780 y Bcin02g02790, los que fueron denominados *bcfet3* y *bcftr1*, respectivamente. Los porcentajes de identidad de secuencia, a nivel nucleotídico como aminoacídico, fueron calculados con el programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Para la identificación de motivos proteicos conservados, se utilizó la base de datos pfam (<https://pfam.xfam.org/>).

6.1.2 Diseño de construcciones génicas para delecionar mediante reemplazo alélico los genes *bcfet3* y *bcftr1* de *B. cinerea*.

Una vez identificados los genes *bcfet3* y *bcftr1*, se diseñaron y ensamblaron construcciones génicas que permitieran delecionar los genes mencionados en *B. cinerea*, utilizando el método de recombinación homóloga en levadura (*S. cerevisiae*). Este método permite unir fragmentos de DNA generados por PCR que poseen complementariedad de bases en los extremos sin utilizar enzimas de restricción (Oldenburg *et al.*, 1997). Esta complementariedad se logra al introducir secuencias adaptadoras en los oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de PCR.

Para ensamblar las construcciones genéticas que permitieron generar las mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*, se amplificaron por PCR fragmentos de DNA de aprox. 700 pb correspondientes a una zona río arriba y río abajo de cada uno de los genes mencionados (denominados *5'-flank* y *3'-flank*, respectivamente). Adicionalmente, se amplificó por PCR un *cassette* genético de resistencia a higromicina (*hph*) a partir del vector pCSN44. Los partidores empleados en las distintas reacciones de PCR se detallan en la **Tabla 1**. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 25 μ l del sistema comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 2.0 μ l de cada partidor (10 μ M), 1 μ l de DNA genómico de *B. cinerea* y 20 μ l de H₂O ultrapura, en un volumen total de 50 μ l para cada reacción. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler de Applied Biosystems, utilizando el siguiente perfil térmico de amplificación: 95 °C por 1 min., 95 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg. y 70 °C por 2 min.

Una vez obtenidos y comprobados mediante electroforesis en geles de agarosa los distintos fragmentos de DNA requeridos para la generación de las construcciones génicas, se procedió a amplificar el vector de clonación pRS426 utilizando los partidores oL774 y oL775 (**Tabla 1**). Este vector fue usado para la posterior transformación de *S. cerevisiae* (Oldenburg *et al.*, 1997).

Tabla 1. Partidores utilizados para amplificar por PCR y ensamblar mediante recombinación homóloga en levadura las construcciones genéticas que permitieron generar las mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*. Fw: partidor directo; Rc: partidor inverso.

| Amplicón | Partidor | Secuencia 5'-3' | Tamaño (pb) |
|-----------------------------|----------------|---|-------------|
| $\Delta bcfet3$ 5'-flank | Pc04 Pc05 | Fw AAAAAATGCTCCTTCAATATCATCTTCTGTGAGGGTAGCTGTTGACGGATG Rc GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCTCGTCCCGTCTCTTCTCTG | 662 |
| $\Delta bcfet3$ 3'-flank | Pc02 Pc03 | Fw GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTTCTGTGGGATCTGGTTTCC Rc GACCGGGATCCACTTAACGTTACTGAAATCGTGTGATTTGGCTCGTGATG | 759 |
| $\Delta bcftr1$ 5'-flank | Pc49 Pc50 | Fw GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTCATCGCGTTACCTAGCTCAT Rc GACCGGGATCCACTTAACGTTACTGAAATCAGAGAGGGTCTGAGCCATCA | 668 |
| $\Delta bcftr1$ 3'-flank | Pc51 Pc52 | Fw AAAAAATGCTCCTTCAATATCATCTTCTGTCCGACTTAGCTGGCTGGGATA Rc GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCTCTCGACGATCGATTAGCC | 653 |
| Cassette <i>hph</i> | oL768 oL687 | Fw GACAGAAAGATGATATTGAAGGAGC Rc GATTTTCAGTAACGTTAAGTGG | 1.435 |
| Vector pRS426 | oL774 oL775 | Fw GCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT Rc CGACAAAGGACACACTTAAACAA | 5.5 kb |

6.1.3 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* para ensamblar las construcciones génicas.

Para ensamblar las construcciones genéticas descritas en la sección 6.1.2, se transformó *S. cerevisiae* utilizando el protocolo descrito por (Oldenburg *et al.*, 1997), utilizando la cepa BY4741 (auxotrófica para uracilo). Para esto, se inocularon 10 ml de medio YPD con una colonia aislada (a partir de medio YPD sólido) y se incubó toda la noche a 28 °C, 200 rpm. A la mañana siguiente, se tomaron 300 µl del inóculo obtenido, los que se utilizaron para inocular 5 ml de medio YPD fresco incubando nuevamente durante cuatro horas a 28 °C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se procedió a centrifugar el cultivo obtenido durante 5 minutos a 3.000 rpm, suspendiendo las células en 1 ml de agua estéril. Posteriormente, se realizaron dos lavados adicionales utilizando agua estéril en tubos Eppendorf de 1,5 ml, centrifugando durante 1 minuto a 13.000 rpm. Realizados los lavados, se descartó el sobrenadante y se resuspendió las células en 100 µl LiAc 10 mM. Posteriormente, las células fueron colectadas mediante centrifugación durante 30 segundos a 13.000 rpm, para finalmente suspenderlas en 1 ml de LiAc 100 mM. Luego, se centrifugó y eliminó el sobrenadante, para añadir la mezcla de transformación compuesta por 240 µl de PEG (polietilenglicol 2250; 50% w/v), 36 µl de LiAc 1.0 M y 20 µl de DNA de espermio de salmón y todos los productos de PCR necesarios para ensamblar la construcción (25 µl de cada fragmento de PCR mencionado en el punto anterior, junto con 15 µl del vector pRS426 lineal; amplificado por PCR utilizando los partidores oL774 y oL775 (Tabla 1). La mezcla final fue agitada vigorosamente mediante vortex durante 90 seg. Finalmente, los tubos fueron incubados durante 30 min. a 30 °C, seguido de 30 min. a 42 °C, para ser centrifugados a 8.000 rpm por 1 min. Finalmente, se removió la mezcla de transformación y se agregó 1 ml de agua estéril. Las levaduras fueron sembradas en placas de Petri preparadas con medio de selección sintético completo sin uracilo (SC URA (-)) e incubadas durante 5 días a 28 °C hasta la formación de colonias aisladas.

6.1.4 Selección de colonias de *S. cerevisiae* y PCR de diagnóstico.

Las colonias aisladas obtenidas de las placas de Petri con medio de selección SC-URA (-) fueron seleccionadas y aisladas para realizar una comprobación rápida a través de PCR de colonias, amplificando uno de los fragmentos de la construcción. Se analizaron aproximadamente 8 colonias para cada construcción. Con la ayuda de una punta de micropipeta se inoculó una fracción de cada colonia aislada en tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 20 μ l de NaOH 20 mM, para posteriormente incubar durante 45 min a 95 °C y centrifugar por 10 min. a 13.000 rpm los restos celulares. Utilizando 1 μ l del sobrenadante como DNA molde, se realizó una amplificación mediante PCR en 50 μ l totales, utilizando el sistema comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), utilizando el siguiente perfil térmico de amplificación: 95 °C por 1 min., 95 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg. y 70 °C por 1 min. Los productos de PCR resultantes fueron observados posteriormente en una electroforesis (durante 30 min. a 90 volts) en gel de agarosa al 1%, teñido con 0.1 μ l de GelRed™. Los clones positivos fueron seleccionados para realizar una extracción posterior de DNA plasmidial, a partir de los clones aislados de levadura.

6.1.5 Extracción de DNA plasmidial de colonias transformadas.

Para la extracción de DNA plasmidial desde levaduras, se usó el sistema comercial Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep. Primero, se inoculó un tubo del 50 ml con medio de cultivo SC-URA (-) líquido con una colonia aislada y se incubó a 28 °C con agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente se centrifugó el medio conteniendo las células a 5.000 rpm por 12 min. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 1 ml de agua y traspasado a un tubo Eppendorf de 1,5ml, el que se centrifugó posteriormente durante 10 min. a 13.000 rpm, descartando el sobrenadante. Utilizando el remanente, se agregó 150 μ l de la solución I del sistema mencionado. Luego se agregó 2,0 μ l de la enzima Zimoliasa, homogenizando e incubando durante 1 hora a 37 °C la solución obtenida. Transcurrido este

tiempo, se agregaron 150 μ l de la solución II y III del sistema comercial, centrifugando la solución final durante 8 min. a 13.000 rpm. Se rescató el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril. Se agregó 400 μ l de isopropanol y se obtuvo el plásmido mediante centrifugación, el que fue resuspendido en 35 μ l de solución tampón TE y se almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

6.1.6 Amplificación de la construcción desde DNA plasmidial.

Para la generación de las mutantes de *B. cinerea* se requiere la construcción genética lineal y en grandes cantidades. Para esto, se amplificó por PCR cada construcción, desde el DNA plasmidial extraído en el punto anterior. Para esto se utilizó el sistema comercial de Kapa Biosystem HiFi-PCR, utilizando 10 μ l de buffer, 34 μ l de H₂O ultra pura, 1,5 μ l de dNTPs, 1,5 μ l de cada partidor (Pc04-Pc05 para la construcción de $\Delta bcfet3$ y Pc49-Pc52 para la construcción $\Delta bcftr1$, **Tabla 1**), 1 μ l de DNA molde y finalmente 0,5 μ l de la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad incluida en el sistema comercial. El perfil térmico de amplificación por PCR fue el siguiente: 95 °C por 1 min., seguido por 35 ciclos a 95 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg. y 70 °C por 3 min. y 30 seg. Los productos de PCR resultantes fueron observados posteriormente a una electroforesis (durante 30 min. a 90 volts) en gel de agarosa al 0.8 %, teñido con 0.1 μ l de GelRedTM. Los productos de PCR con las construcciones amplificadas fueron almacenadas a -20 °C, hasta el día de la transformación de *B. cinerea* (detallada en la siguiente sección).

6.1.7 Condiciones de crecimiento y transformación de la cepa B05.10 de *B. cinerea*.

La transformación génica de *B. cinerea* se basa en la generación de esferoplastos (células esféricas de hongo sin pared celular). Para la formación de esferoplastos, se cosechó conidias sexuales de *B. cinerea* desde una placa de Petri conteniendo medio PDA-planta (medio de cultivo PDA, suplementado con 50 gr/L de cotiledones de *P. vulgaris*). Utilizando

agua estéril y con la ayuda de un asa, se raspó la placa removiendo las conidias. El sobrenadante en la placa fue posteriormente recolectado con la ayuda de una micropipeta. Este volumen fue filtrado a través de una tela denominada “Nytex” dispuesta en un matraz estéril con 100 ml de medio extracto de malta líquido (5 gr. de glucosa, 15,0 gr. extracto de malta, 1,0 gr. extracto de levadura (BD Biosciences), 1 gr. casaamino ácidos (Sigma-Aldrich). Esta solución conteniendo las conidias fue incubada durante 18 horas a 20 °C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, el medio contenía micelio joven (derivado de la germinación de las conidias), el que fue filtrado en otro matraz utilizando la misma tela. Se eliminó el exceso de agua del micelio lavando éste con buffer KC (buffer isotónico preparado con 400 ml H₂O, 17,90 gr. KCl, 2,95 gr. CaCl₂ 1M x H₂O), para posteriormente ser recolectado y masado en un matraz estéril. Aproximadamente 2 gr. de micelio fueron incubados en una solución de generación de esferoplastos conteniendo: 200 mg. de la enzima “Taste Pro-Novo” (Novozyme), 100 mg. de enzima de lisis de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich), 0,5 mg. de Yatalase™ (TAKARA) y 0,5 mg. de Novozyme 234 (Novozyme), para un volumen total de 11 ml de buffer KC. La solución final fue esterilizada mediante filtración. El micelio fue dispuesto en un matraz de 100 ml estéril y se agregó la solución anteriormente señalada, homogenizando suavemente. El matraz fue incubado para recuperar las células durante 2 horas a 28 °C y 95 rpm. Luego de la incubación, se centrifugó la solución a 5.000 rpm a 4 °C por 10 min., se eliminó el sobrenadante y se agregó aproximadamente 25 ml buffer KC. La solución fue centrifugada a 5.000 rpm a 4 °C por 10 min. nuevamente. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió en una pequeña alícuota de buffer KC para ser traspasado a un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril. A partir de ese tubo se realizó una dilución 1:50 de la solución obtenida y se cuantificó el número de esferoplastos en una cámara de Neubauer. Se transformaron 1×10^7 esferoplastos.

Para el procedimiento de transformación de *B. cinerea*, la construcción genética se obtuvo mediante PCR (3 reacciones de 50 µl), las que fueron concentradas mediante precipitación utilizando etanol absoluto a -20 °C. Las construcciones fueron resuspendidas en 32 µl de buffer TE, agregando además 70 µl de buffer KC más 100µl de una solución conteniendo los esferoplastos (1×10^7). Estas células se incubaron durante 5 min. en hielo. Luego se agregó 100 µl de solución PEG (polietilenglicol 3350, Sigma Aldrich) y se incubó

por 20 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 500 µl de la misma solución PEG y se incubó durante 10 min en hielo, para luego agregar 200 µl de buffer KC obteniendo un volumen final de 1 ml.

Finalmente, se tomaron 500 µl de la solución de anterior (conteniendo los esferoplastos) y se agregó a 50 ml de medio SH agar líquido (a 45°C). Se transfirió este volumen de a 10 ml por placa de Petri de 100 mm de diámetro, las cuales fueron incubadas a 20 °C durante 20 horas, para posteriormente agregar 10 ml adicionales del mismo medio suplementado con el antibiótico de selección (higromicina; 70 µg/ml). Las colonias crecidas sobre la capa de agar con antibiótico fueron aisladas en placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo medio Gamborg B5 (Duchefa) 2 % glucosa con higromicina (140 µg/ml), observando el crecimiento de colonias después de 96 horas. Aproximadamente, se obtuvieron 15 aislados independientes para la mutante $\Delta bcfet3$ y 7 aislados independientes para la mutante $\Delta bcfr1$.

6.1.8 Extracción de DNA genómico de las cepas transformadas y genotipificación de las mutantes.

Se inocularon placas de Petri con medio PDA. Este medio fue cubierto con una lámina estéril de papel celofán, sobre el cual se inculó un trozo de micelio desde cada uno de los aislados independientes mencionados en el punto anterior. Cada placa inoculada se incubó durante 2-3 días a temperatura ambiente, para obtener micelio libre de agar y exceso de agua, que facilita la extracción de DNA genómico, utilizando el protocolo descrito por Cenis, 1992. Una vez colectado el micelio, este fue congelado en nitrógeno líquido para posteriormente ser molido con ayuda de un vástago estéril. Una vez molido el tejido, se adiciono 1,6 ml de buffer de lisis (SDS 10 %, 0,4 mg/ml Proteinasa K (Sigma Aldrich), en solución tampón TE 1X), homogenizando mediante vortex. Esta solución conteniendo micelio de hongo molido fue incubado a 65 °C durante 1 hora, para luego centrifugar a 14.000 rpm a 4 °C por 15 min, eliminando los restos celulares. Para eliminar las proteínas, se agregó 350 µl de acetato de

potasio 5M, se incubó en hielo durante 1 hora y se centrifugó nuevamente. Utilizando 800 μ l de sobrenadante, se precipitó el DNA con 600 μ l de isopropanol y centrifugación. El DNA fue resuspendido en 50 μ l de solución tampón TE y almacenado a 4 °C hasta su posterior uso. La concentración del DNA genómico extraído que se obtuvo mediante espectrofotometría utilizando la relación $\lambda_{260/280}$ nm como parámetro de calidad de la extracción.

Las reacciones de PCR usadas como diagnóstico para la selección de los clones transformados se llevó a cabo utilizando partidores que hibridan en zonas que flanquean la inserción de la construcción génica y zonas internas de la construcción, empleando los partidores son detallados en la Tabla 2. Las reacciones se realizaron usando el sistema comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) amplificando DNA genómico de cada cepa mutante.

Tabla 2. Partidores utilizados para comprobar por PCR los clones transformados de $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*. Fw: partidor directo; Rc: partidor inverso.

| Amplicón | Partidor | Secuencia 5'-3' | Tamaño (pb) |
|--|-----------------|--|--------------------|
| $\Delta bcfet3$ integración <i>5' flank</i> | oL29 Pc06 | Fw TCGCCCTCCGAGAGCTGCAT Rc AGACGGACAGCACTTTGCAT | 1.268 |
| $\Delta bcfet3$ Integración <i>3' flank</i> | Pc01 oL32 | Fw AACTTGATCCCCACAACCTC Rc ATGGCTGTGTAGAAGTACTC | 946 |
| $\Delta bcftr1$ Integración <i>3' flank</i> | Pc53 oL32 | Fw TCTCCCCTCGTACAACCAAC Rc ATGGCTGTGTAGAAGTACTC | 789 |
| $\Delta bcfet3$ Integración <i>5' flank</i> | oL29 Pc54 | Fw TCGCCCTCCGAGAGCTGCAT Rc GACCACGTAAGCACGGTAT | 1.286 |

6.1.9 Determinación del número de inserciones del gen de resistencia *hph* en cepas transformadas de *B. cinerea*.

Para determinar el número de inserciones del gen *hph* en las mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcfr1$ de *B. cinerea*, se realizó un PCR en tiempo real (qPCR). Para esto, se diseñaron 2 parejas de partidores (**Tabla 3**) las que amplifican un fragmento definido y específico de los genes *bcfrq1* de *B. cinerea* y *hph*. El gen *bcfrq1* de *B. cinerea* se encuentra en copia única en el genoma (Canessa *et al.*, 2013; Hevia *et al.*, 2015) Para ambas parejas de partidores se sintetizó *in vitro* el producto de amplificación de PCR (como hebra simple de DNA), los que fueron denominados amplicones “amp97/98” y “amp32/687”, haciendo referencia a las parejas de partidores que permiten su amplificación (**ver Tabla 3**). Utilizando concentraciones conocidas de estos amplicones y diluciones seriadas, se construyeron las curvas de calibración de qPCR para cada pareja de partidores. Se emplearon seis diluciones seriadas 1:10, obteniendo en la más concentrada 500.000 moléculas/ μ l de amplicón amp97/98 o amp32/687.

Para las reacciones de qPCR se utilizó el sistema comercial de KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystem), el cual se usó según las indicaciones establecidas por el fabricante. Cada reacción contiene 1,2 μ l de H₂O ultrapura, 10 μ l de buffer comercial mix KAPA, 0,4 μ l del normalizador ROX low, 0,4 μ l de una solución de partidores 10 μ M (para cada partididor) y 8,0 μ l de DNA molde (provenientes de las diluciones seriadas mencionadas), completando un volumen total de reacción de 20 μ l. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el equipo AriaMx Real-time PCR System utilizando el siguiente perfil de amplificación: una denaturación inicial de 60 seg. a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 5 seg. a 95 °C y 15 seg. a 62 °C. Todas las reacciones de qPCR contemplaban un control negativo que no contiene DNA molde el que fue denominado NTC.

Tabla 3. Partidores utilizados para determinar el número de inserciones del gen *hph* mediante reacciones de qPCR en las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea*. Fw: partidor directo; Rc: partidor inverso.

| Amplicón | Partidor | Secuencia 5'-3' | Tamaño (pb) |
|---------------|---------------|--|-------------|
| <i>bcfrq1</i> | oL97 oL98 | Fw CCCTCGCCTTCCTGTAAA Rc GGGAGCGGAAGGACAGATTT | 86 |
| <i>hph</i> | oL32 oL687 | Fw GATTCAGTAACGTTAAGTGG Rc GATTCAGTAACGTTAAGTGG | 111 |

Una vez realizadas las curvas de calibración para cada amplicón, se logró definir los parámetros necesarios para obtener eficiencias de amplificación cercanas al 100 %. Luego, se realizaron reacciones de qPCR utilizando DNA genómico de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ utilizando los partidores mencionados en la Tabla 3. Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen total de 20 μ l, utilizando las mismas condiciones empleadas para la generación de las curvas de calibración, pero reemplazando cada amplicón de qPCR (“amp97/98” o “amp32/687”) por DNA genómico de cada cepa mutante de interés. En paralelo con la amplificación de las muestras de DNA genómico de interés, se amplificaron las curvas de calibración con las diluciones de los amplicones “amp97/98” y “amp32/687”, utilizando los mismo parámetros y controles mencionados. Los valores de C_p obtenidos para las muestras de DNA genómico de cada cepa mutante fueron interpolados en las curvas de calibración de los amplicones y con estos datos, fue posible determinar el número de moléculas de DNA amplificadas para cada muestra, los cuales fueron comparadas entre sí (número de moléculas amplificadas para los fragmentos del gen *bcftr1* y *hph*), determinando la razón existente entre ambas reacciones de amplificación.

6.2.0 Crecimiento miceliar de la cepa mutante $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ en medio PDA y PDA-planta en condiciones de fotoperíodo.

Se utilizaron los medios de cultivo PDA y PDA-planta. Para el medio PDA-planta se masó 50 gr. de cotiledones de porotos molidos en 800 ml de H₂O, solución que fue autoclavada. Posteriormente, se masó 39,0 gr el PDA (agar papa dextrosa) en polvo (BD Biosciences) y se aforó a 1 L, autoclavado la solución final. El medio PDA se preparó masando solamente 39,0 g/L de PDA en polvo.

Una vez obtenidas las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo, éstas fueron inoculadas con un trozo de micelio joven (utilizando un sacabocado estéril de 0,5 mm de diámetro), no diferenciado, proveniente las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$. Las placas fueron

incubadas a 20 °C, con ciclo de luz/oscuridad 12h/12h. El fenotipo desarrollado *in vitro* se registró mediante fotografías a los 3, 4, 7 y 21 días post-inoculación.

Adicionalmente, se prepararon medios de cultivo PDA suplementados con concentraciones crecientes de FeCl₃ (100, 250, 500 y 750 µm). Las placas de Petri conteniendo estos medios fueron inoculadas con un trozo de micelio joven, no diferenciado, proveniente de placas de PDA previamente inoculadas con las cepas *Δbcfet3* y *Δbcftr1*. Las placas fueron incubadas a 20 °C con ciclo de luz/oscuridad 12h/12h y fueron registradas a través de fotografías a los 10 días post-inoculación.

6.2.1 Cuantificación de hierro en la cepa mutante *Δbcfet3*.

Para determinar el contenido de hierro en el tejido fúngico, se crecieron las cepas B05.10 y *Δbcfet3* en placas de Petri conteniendo medio PDA cubierto con una lámina de papel celofán estéril. Un área definida de micelio (15,9 cm²) se colectó en tubos Eppendorf de 2,0 ml a los 4 días post inoculación, liofilizando el tejido durante 12 horas a -44 °C y 0.090 mbar. Con las muestras completamente deshidratadas, se pulverizó el micelio con un vástago limpio. Luego, las muestras fueron digeridas en 1,0 ml de ácido nítrico al 3% (16 horas a 95 °C), para la posterior medición en un espectrómetro de absorción atómica (AAS). Las mediciones se realizaron con la ayuda del personal del Departamento de Química de la Universidad Andrés Bello, quienes facilitaron el equipo y su uso. Las muestras fueron analizadas con la ayuda del software GraphPad Prism (versión 6).

6.3.0 Ensayos de infección de plantas de *Phaseolus vulgaris* (poroto) y *Arabidopsis thaliana*.

Para realizar los ensayos de infección se escogió inicialmente una especie de crecimiento rápido y de hojas grandes (cotiledones) como es el poroto (*Phaseolus vulgaris*) que facilita la rápida observación del fenotipo de infección. Las semillas de *P. vulgaris* fueron sembradas de forma directa en el sustrato comercial “Green power complete mix” (TopCrop) que contiene 35 % de humus, 10 % de perlita, 10 % de vermiculita, 30 % de fibra de coco y 15 % turba rubia, el que fue dispuesto en maceteros plásticos redondos. Se sembró una

semilla por macetero y se colocaron en una bandeja plástica para propagar esquejes y mantener la humedad. Cada bandeja fue regada con 1,3 L de agua destilada. Las plantas fueron crecidas durante 8 días con luz artificial LED y fotoperiodo luz/oscuridad 12h/12h a 22 °C aproximadamente.

El ensayo de infección se realizó a partir de una solución de conidias previamente ajustada a $2,5 \times 10^5$ conidias/ml, las cuales fueron ser colectadas el mismo día de la infección desde placas PDA-planta inoculadas con la cepa B05.10 (utilizada como control de infección) y las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ crecidas por 7 días. Utilizando un sacabocado estéril de 0.5 mm de diámetro, se cortó un trozo de micelio con conidias desde cada placa de Petri PDA-planta y se traspasó este trozo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 1 ml de medio de cultivo líquido Gamborg B5 2% glucosa. El tubo obtenido se agitó vigorosamente mediante vortex durante 1 minuto para disgregar las conidias.

Posteriormente, el sobrenadante de cada tubo se filtró a través de una punta de micropipeta p1000 estéril que en su interior contenía lana de vidrio (Sigma). El filtrado fue dispuesto en el interior de un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, ajustando el número de conidias a $2,5 \times 10^5$ /ml en medio Gamborg B5 2% glucosa + buffer fosfato 1M 1 %, con la ayuda de una cámara de Neubauer. Con estas conidias se procedió a inocular las plantas.

Para cada infección se emplearon 40 plantas de *P. vulgaris* las que fueron inoculadas con 7 μ l de la solución de conidias. Usando como referencia a la vena central de la hoja de poroto (cotiledón), la cepa B05.10 fue inoculada al lado izquierdo, mientras que las mutantes fueron inoculadas al lado derecho. Los ensayos de infección se realizaron bajo las mismas condiciones empleadas para crecer las plantas detalladas más arriba. Las lesiones desarrolladas fueron registradas con una cámara digital 72 horas post inoculación. Las infecciones fueron analizadas con el programa ImageJ para determinar el área de la lesión causada por el hongo con la ayuda de una regla como referencia de longitud en cada una de las fotografías.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de infección utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas fueron sembradas directamente en el mismo sustrato empleado con *P.*

vulgaris, posterior a una esterilización mediante lavados sucesivos con hipoclorito de sodio al 50 %. Las semillas se estratificaron durante 48 horas a 4 °C antes de ser sembradas. Las plantas fueron crecidas en condiciones de luz artificial LED y fotoperiodo luz/oscuridad 16h/8h a 22 °C aproximadamente, durante 4 semanas. Los ensayos de infección de *A. thaliana* se realizaron con al menos 20 plantas de 4 a cuatro semanas de edad, inoculando al menos 6 hojas por planta, utilizando conidias de cada una de las cepas mutantes de interés. El procedimiento, así como el número de conidias usadas para infectar *A. thaliana*, fue el mismo que el utilizado en los ensayos de infección de *P. vulgaris*. Consecuentemente, transcurridas 72 horas post infección, las plantas fueron registradas mediante fotografías, las que fueron analizadas con el programa ImageJ determinando el área de la lesión causada por *B. cinerea*.

6.3.1 Desarrollo del fenotipo de infección de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ en plantas de *A. thaliana* cultivadas en medio hidropónico en condiciones de deficiencia de hierro.

Para evaluar cómo influye la disponibilidad de hierro en la infección causada por *B. cinerea*, plantas de *A. thaliana* fueron sometidas a condiciones controladas de deficiencia de este micronutriente. Para esto, *A. thaliana* cultivadas en medio hidropónico durante 5 semanas (50 μ M FeNa-EDTA) fueron sometidas a un lavado de raíces con el agente BPSD (ácido bialofenantrolina disulfónico), permitiendo inicialmente el desarrollo normal de las plantas y una deficiencia controlada de hierro posterior a este período. Los detalles de la estrategia hidropónica fueron replicados según lo descrito por Kieu *et al.*, 2012. En forma resumida, plántulas de 5 días de edad de *A. thaliana* fueron trasplantadas desde placas de Petri conteniendo medio MS sólido a un sustrato inerte (lana de roca; GRO-SLAB) humedecido con medio hidropónico: 0,25 mM Ca (NO₃)₂x4H₂O, 1 mM KH₂PO₄, 0,5 mM KNO₃, 1 mM MgSO₄x7H₂O, 50 μ M H₃BO₃, 19 μ M MnCl₂x4H₂O, 10 μ M ZnCl₂, 1 μ M CuSO₄x5H₂O, 0,02 μ M Na₂MoO₄x2H₂O y 50 μ M FeNa-EDTA. Para generar la deficiencia de hierro en las plantas, transcurridas 5 semanas de crecimiento en medio hidropónico, se lavaron las raíces

durante 5 minutos con una solución conteniendo el agente reductor ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 5,7mM y BPDS 0,3 mM según lo descrito por Segond *et al.*, 2009. Transcurrido este tiempo, las raíces fueron lavadas con agua destilada y transferidas a un medio hidropónico sin hierro. Por otro lado, el grupo control de plantas fue sometido al mismo tratamiento de lavado de raíces, pero sólo con agua destilada, transfiriendo las plantas a medio hidropónico fresco (50 μM FeNa-EDTA). Las plantas se mantuvieron durante 4 días en las condiciones recién descritas y se realizó el ensayo de infección del mismo modo a lo realizado con plantas obtenidas en sustrato sólido, inoculando una solución definida de conidias sobre las hojas de *A. thaliana*. Luego de 72 horas post-inoculación de las conidias, las hojas infectadas fueron registradas con una cámara digital y las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

6.3.2 Tinción con 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) y Azul algodón sobre hojas de *A. thaliana* infectadas con las cepas mutantes $\Delta bcft3$ y $\Delta bcft1$.

Para observar el estallido oxidativo sobre el tejido vegetal infectado por *B. cinerea*, se realizó una tinción con DAB (3,3'-Diaminobenzidine) que permite la formación de un precipitado de color café en las zonas donde hubo estrés oxidativo. El procedimiento usado fue adaptado del original descrito por Daudi, 2012.

La tinción se preparó masando 50 mg del reactivo DAB los que fueron disueltos en 1 ml de DMSO dentro de tubo plástico de 50 ml envuelto en papel aluminio. Previamente, se autoclavó y ajustó 500 ml de agua destilada a pH 3,40 para luego disolver el reactivo DAB hasta 45 ml. Posteriormente, se agregó 2,5 ml de Na_2HPO_4 200 mM y 25 μl Tween-20, aforando hasta 50 ml con el agua ajustada.

Una vez preparada la solución, se tomaron las hojas infectadas las que se sumergieron aproximadamente en 15 ml de solución de tinción, incubando al vacío por 5 minutos en oscuridad para luego mantener en agitación suave y constante durante 4 horas bajo la misma condición de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se eliminó la tinción y comenzó a desteñir

las hojas agregando una solución de etanol al 80 %, aplicando pulsos de temperatura con la ayuda de un microondas hasta desteñir la hoja por completo.

Posteriormente, se realizó una segunda tinción denominada azul algodón, la que permite la tinción de quitina, un polisacárido presente en la pared celular de hongos (Roncero, 2002), facilitando la visualización de micelio sobre el tejido vegetal. Esta tinción se preparó a partir de la modificación del protocolo detallado en Leck, 1999. Para esto se utilizó 0,05g de azul de anilina (azul algodón), 20 ml de ácido láctico y 20 ml de agua destilada. Esta solución se empleó sobre hojas previamente teñidas con DAB. Usando una micropipeta, se agregó una gota de la tinción sobre el área de la lesión y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez eliminado el exceso de tinción, se registró el tejido fúngico con la ayuda de una lupa, registrando las imágenes con una cámara digital. Ambas tinciones fueron realizadas para ambas cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ y el control B05.10.

6.4 Análisis estadísticos.

Todos los experimentos de cuantificación de área y cuantificación de hierro fueron realizados de forma independiente al menos 2 veces, cada uno por triplicado en donde se presenta el valor de error estándar. El nivel de diferencias significativas entre los valores fue determinado de acuerdo con un análisis de varianza ANOVA, con ($P < 0.05$), utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00.

7. Resultados

7.1 El genoma de *B. cinerea* codifica para un sistema ortólogo al complejo de captación de alta afinidad a hierro Fet3/Ftr1 de *S. cerevisiae*.

Según lo descrito por Askwith *et. al.*, 1994, *S. cerevisiae* posee un sistema de captación de hierro de alta afinidad denominado Fet3/Ftr1. Este se encuentra conservado en diversas especies fúngicas incluyendo hongos filamentosos (Canessa, Larrondo, 2013; Kues y Ruhl *et al.*, 2011). Al analizar la base de datos del genoma de *B. cinerea*, se identificó un *locus* génico que presenta una alta identidad de secuencia al *locus* Fet3/Ftr1 de *S. cerevisiae*. El gen *bcfet3* presenta una extensión de 2.341 pb cuyo marco de lectura abierto (ORF) codifica para 615 aminoácidos, presentando cinco exones. A nivel aminoacídico, comparte un 49 % de identidad de secuencia con su ortólogo *fet3* de *S. cerevisiae*. Como se observa en la **Figura 1A**, los motivos proteicos “Cu-oxidasa” previamente identificados en la proteína Fet3 de *S. cerevisiae*, también se encuentran en la proteína BcFet3 de *B. cinerea*. Estos motivos corresponden a tres sitios de unión a cobre que permiten la actividad enzimática de oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , la que es necesaria para la incorporación del metal desde el medio extracelular al intracelular a través de la permeasa de hierro Ftr1 (Hassett y Kosman, 1998). El gen *bcftr1*, por su parte, posee una extensión de 1.617 pb cuyo ORF está interrumpido por cuatro intrones. La secuencia codifica para 404 aminoácidos. A nivel aminoacídico, BcFtr1 posee un 44 % de identidad de secuencia con la proteína Ftr1 de *S. cerevisiae*. Como se muestra en la **Figura 1B**, BcFtr1 presenta un motivo denominado “FTR1”, el que contiene 7 segmentos transmembrana descritos de esta proteína, conservando los motivos REGLE que permiten la actividad de permeasa de hierro (Kosman *et al.*, 2004). En conjunto, estos resultados *in silico* nos permiten sugerir fuertemente que *B. cinerea* codifica para un sistema de captación de hierro tipo Fet3/Ftr1 descrito en *S. cerevisiae* (Sinhg *et al.*, 2006).

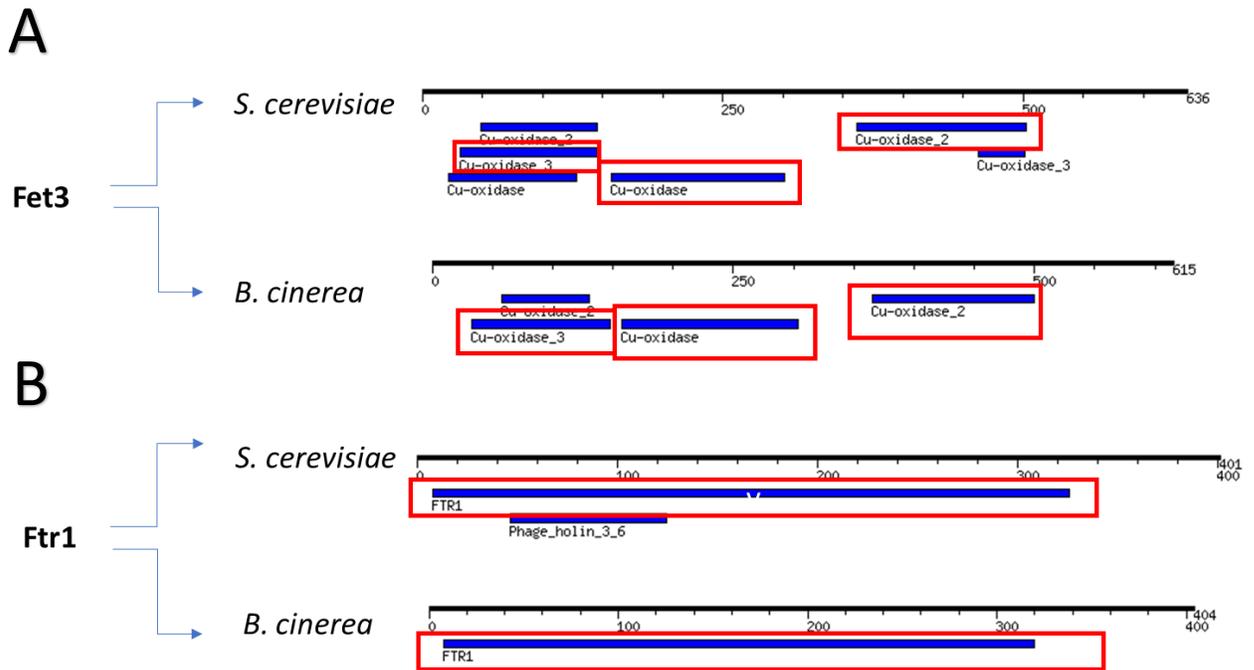


Figura 1. Esquema comparativo de motivos conservados en las proteínas BcFet3 y BcFtr1 de *B. cinerea*. (A) Comparación de los motivos en la secuencia aminoacídica de la proteína Fet3 de *S. cerevisiae* y la proteína BcFet3 de *B. cinerea*. Los recuadros en rojo indican la presencia de motivos conservados, anotados como sitios de unión a cobre. (B) Comparación de los motivos en la secuencia aminoacídica de la proteína Ftr1 de *S. cerevisiae* con la proteína BcFtr1 de *B. cinerea*. El recuadro rojo indica la presencia del motivo denominado “FTR1” presente en ambas proteínas. Las comparaciones y la identificación de los motivos indicados fueron realizadas mediante búsqueda en la base de datos de proteínas Pfam.

7.2 Obtención de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcfr1$ de *B. cinerea*.

Con el fin de estudiar y analizar el impacto que tiene la captación de hierro en la virulencia de *B. cinerea*, mediante genética inversa, se generaron mutantes de pérdida de función para los genes *bcfet3* y *bcfr1* (**Figura 2A**) mediante reemplazo alélico. Las mutantes generadas fueron denominadas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcfr1$. Estas cepas mutantes se obtuvieron en el laboratorio mediante recombinación homóloga de una construcción genética descrita anteriormente (ver Materiales y Métodos). Para ello, se amplificó mediante PCR tres fragmentos de DNA que conforman ambas construcciones génicas (para cada gen), las que luego de ser amplificadas mediante PCR, se transformaron en *S. cerevisiae* de modo que este organismo, utilizando la maquinaria de reparación/recombinación homóloga, ensamblara los tres fragmentos de PCR dada la complementariedad de bases en los extremos de cada producto. Para esto, se utilizó el vector de pRS426 (Christianson *et al.*, 1992; Joska *et al.*, 2014). Una vez recuperado este vector de clonación conteniendo la construcción deseada, se amplificó mediante PCR la construcción génica completa, resultando en la obtención en una única molécula de DNA lineal que contiene los fragmentos de PCR contiguos en el orden diseñado (paneles inferiores de **Figura 2B y 2C**). Cada molécula de DNA lineal está compuesta de dos zonas de recombinación homóloga (Figura 2, recuadros en rojo) en el genoma de *B. cinerea* denominadas 5' y 3' *flank* y el *cassette* de resistencia a higromicina (*hph*), permitiendo así la posterior selección de los aislados transformados.

Mediante el proceso de transformación de esferoplastos de la cepa B05.10 de *B. cinerea* descrito en la metodología (Williamson *et al.*, 2007) se obtuvieron 15 aislados independientes para la mutante $\Delta bcfet3$ y 7 aislados independientes para la mutante $\Delta bcfr1$. Estos clones mutantes aislados fueron posteriormente, genotipificados mediante PCR y qPCR.

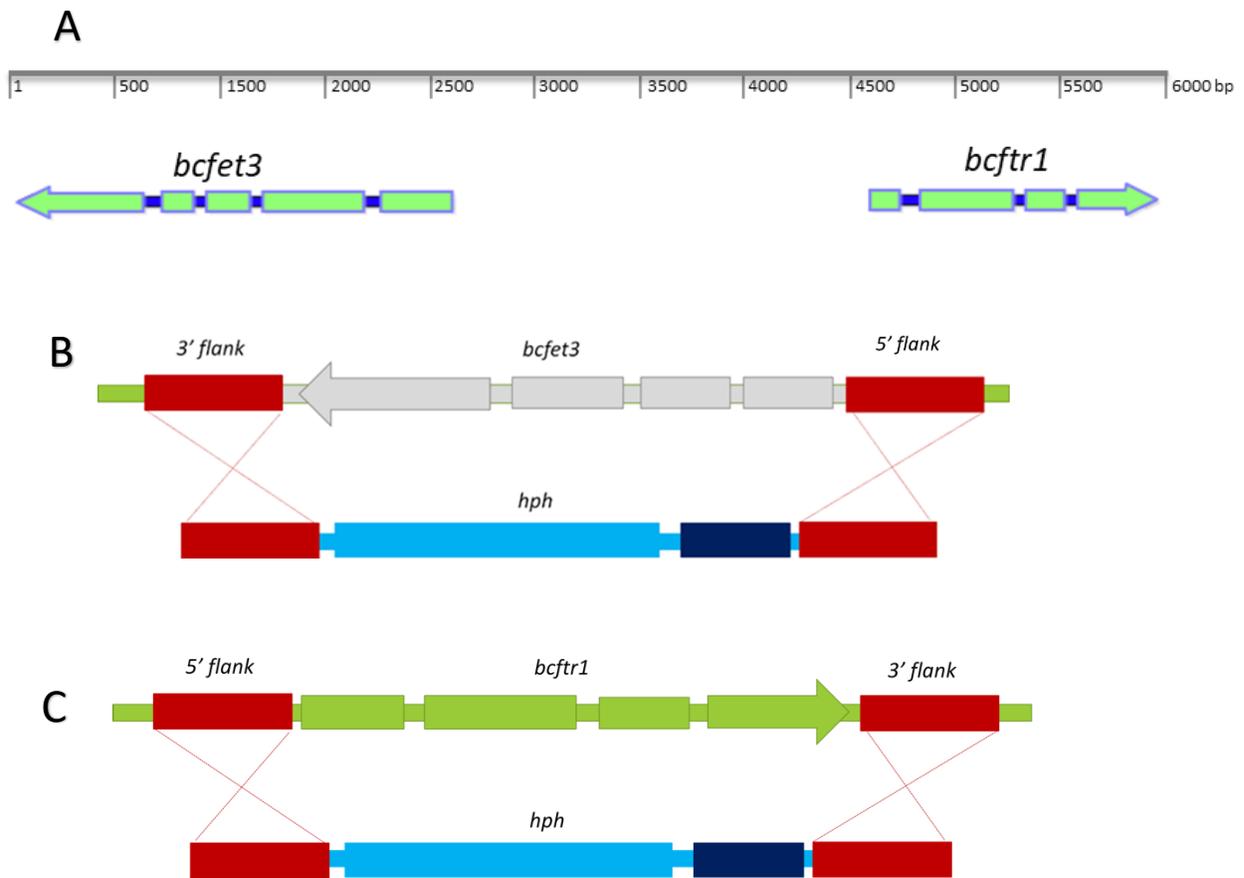


Figura 2. Locus *bcfet3/bcftr1* de *B. cinerea*. (A) Esquema del locus *bcfet3/bcftr1* de *B. cinerea* (aprox. 6,000 pb) localizado en el cromosoma 2, entre las coordenadas genómicas 1,013,115-1,018,274. Las flechas verdes indican la dirección transcripcional (divergente) de cada gen. (B) Esquema que representa el gen *bcfet3*, indicando (en rojo) las zonas de recombinación homóloga río arriba y río abajo que permitieron la generación de la cepa mutante $\Delta bcfet3$. La construcción génica para la generación de la cepa $\Delta bcfet3$ se esquematiza en la parte inferior de la figura. (C) Esquema que representa el gen *bcftr1*, indicando (en rojo) las zonas de recombinación homóloga río arriba y río abajo, que permitieron la generación de la cepa mutante $\Delta bcftr1$ (la construcción génica utilizada para generar la mutante $\Delta bcftr1$ se esquematiza en la parte inferior).

7.3 Genotipificación de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ mediante PCR de diagnóstico y qPCR.

Con el fin de validar que los aislados obtenidos son realmente células transformadas y que la construcción génica se insertó correctamente en el *locus* esperado del genoma de *B. cinerea*, se realizó una extracción de DNA genómico de cada aislado, el que fue utilizado como molde para diversas reacciones de PCR. De esta forma, y para las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$, se diseñaron partidores específicos para amplificar una región comprendida entre el gen *hph* (presente en la construcción genética) y en una región río arriba del *flank* 5' de recombinación. Adicionalmente, se amplificó un fragmento de DNA entre el gen *hph* y una región río abajo del *flank* 3' de recombinación. Esto permitió comprobar que el gen de resistencia se insertó en el *locus* seleccionado. Así, se logró validar tres aislados independientes para la mutante $\Delta bcfet3$ y dos aislados independientes para la mutante $\Delta bcftr1$. Como se observa en la **Figura 3A y 3B**, para cada mutante se pudo comprobar la inserción 5' y 3' del *cassette* de *hph*, y la ausencia de cada gen deletado.

Dado que en el procedimiento de transformación de *B. cinerea* se obtienen esferoplastos multinucleados, para conseguir cepas con un único genotipo, se realizó un proceso de homocarionización de los clones obtenidos. Este consiste en la eliminación de los núcleos silvestres (no transformados) de las células multinucleadas del hongo, de manera de obtener una cepa homocarionte para el gen *hph* y mutante de delección para cada gen de interés. En este proceso se aislaron conidias únicas para cada cepa mutante en presencia de higromicina y de forma iterativa, realizando rondas de aislación, se presionó la replicación sólo de los núcleos transformados. Para la cepa $\Delta bcfet3$, se requirió de tres pasajes en medio con antibiótico, mientras que para la cepa $\Delta bcftr1$ se necesitó de ocho pasajes para eliminar todos los núcleos silvestres no transformados. Como se muestra en la **Figura 3A y 3B**, no se observó la amplificación de los genes *bcfet3* y *bcftr1* mediante PCR de diagnóstico en las mutantes generadas. Sólo los aislados correctamente genotipificados (y homocariontes) fueron utilizados en experimentos posteriores.

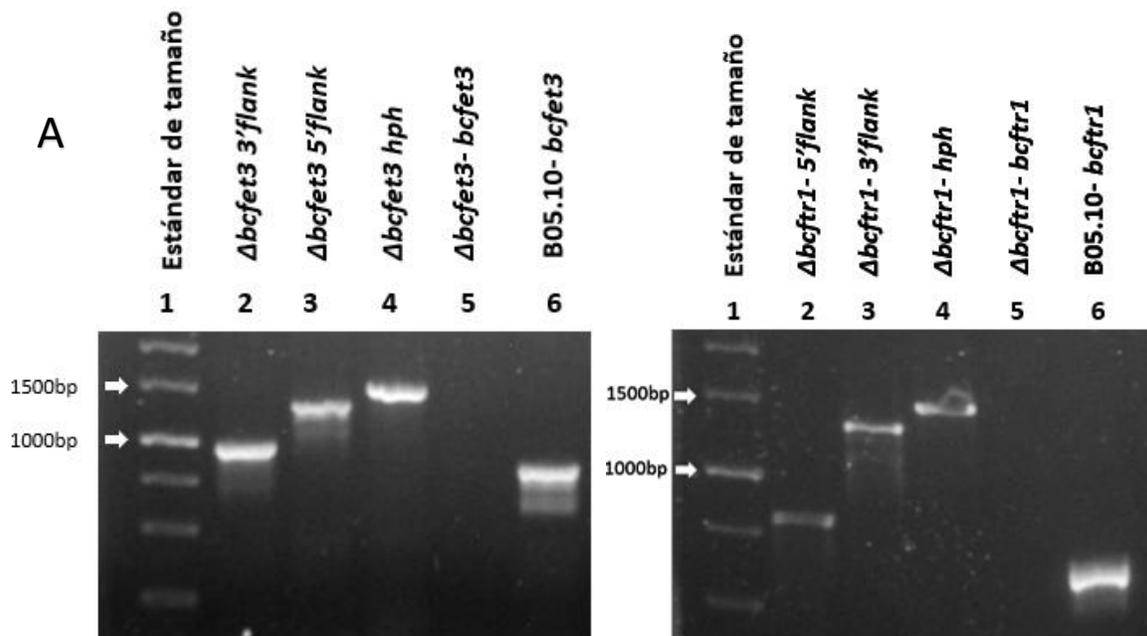


Figura 3. Visualización en gel de agarosa al 0.8% de los fragmentos amplificados mediante PCR para genotipificar las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$. (A) Productos de PCR amplificados desde DNA genómico de una cepa $\Delta bcfet3$ representativa. En el carril 1 se cargo el estándar de tamaño. En el carril 2 y 3, se observa la amplificación de un fragmento de PCR indicativo de la correcta inserción *in locus* de los *flanks* de recombinación 3' y 5', respectivamente. El carril 4 muestra la amplificación del gen *hph*. Finalmente, los carriles 5 y 6 muestran la ausencia de producto de PCR para el gen *bcfet3* en la mutante $\Delta bcfet3$ y el control positivo de amplificación del gen utilizando la cepa B05.10 silvestre. (B) Productos de PCR amplificados desde DNA genómico de una cepa $\Delta bcftr1$ representativa. En el carril 1 se cargó el estándar de tamaño, seguido del carril 2 y 3, donde se muestra la amplificación de un fragmento de PCR indicativo de la correcta inserción *in locus* de los *flanks* de recombinación 5' y 3', respectivamente. El carril 4 muestra la amplificación del gen *hph*, mientras los carriles 5 y 6 muestran la ausencia de producto de PCR para el gen *bcftr1* en la mutante $\Delta bcftr1$ y el control de amplificación de dicho gen en la cepa B05.10 silvestre.

Para determinar el número de inserciones del gen de resistencia *hph* (lo que es indicativo del número de inserciones de la construcción génica) en las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcfir1$, se realizó un qPCR empleando curvas de calibración con concentraciones conocidas de DNA de los blancos de amplificación (ver detalles en Materiales y Métodos). Para esto se utilizaron curvas de calibración absolutas, con un número definido y conocido de los productos blancos de amplificación. Como se observa en la **Figura 4**, las curvas de calibración de qPCR permitieron determinar eficiencias de amplificación de qPCR muy similares entre las dos parejas de partidores oL32/oL687 (que tiene como blanco *hph*) y oL97/oL98 (que tiene como blanco el gen *bcfrq1* de *B. cinerea*), siendo estas de un 98,95 % y 98,33 %, respectivamente.

Una vez obtenidas las curvas de calibración se analizaron los DNA genómicos correspondientes a tres aislados independientes de la cepa mutante $\Delta bcfet3$ y a dos aislados independientes de la cepa $\Delta bcfir1$. Con los valores de C_p de cada una de las muestras, se calculó el respectivo número de copias de moléculas amplificadas dado un volumen definido de DNA genómico. Con estos valores, se calculó la razón entre el número de copias del gen *hph* y el gen *bcfrq1*, el que se encuentra en copia única en el genoma (Hevia *et al.*, 2015). Si la razón entre *hph/bcfrq1* es cercana a 1, se puede concluir que el gen *hph* se encuentra en una única copia en el genoma. En promedio, los tres aislados de la cepa mutante $\Delta bcfet3$ presentaron una razón *hph/bcfrq1* de $1,12 \pm 0,13$. Los resultados de este análisis se describen en detalle en la **Tabla 4**.

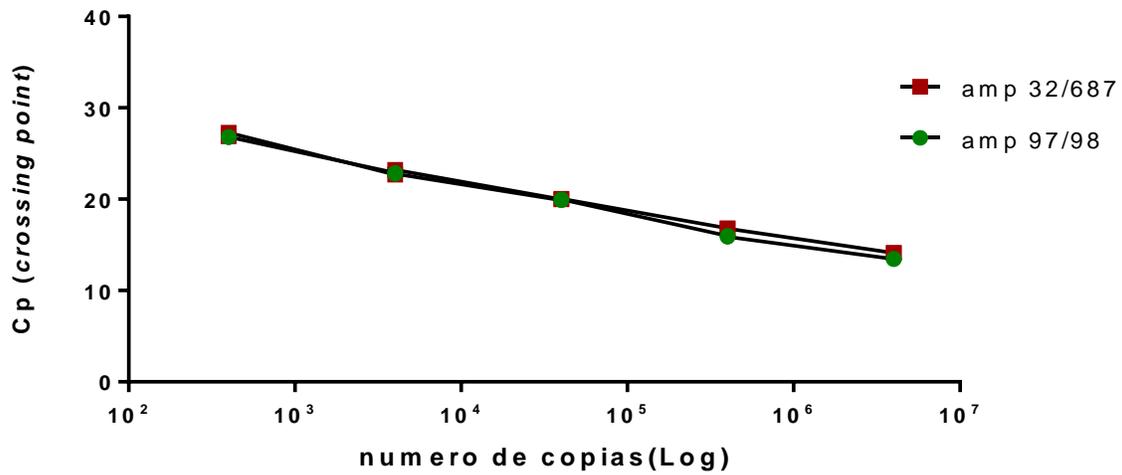


Figura 4. Curvas de calibración para los amplicones de qPCR denominados “amp97/98” y “amp32/687”. Las respectivas parejas de partidores se indican en la Tabla 3. El eje X corresponde al logaritmo del número de copias de amplicón en cada reacción de qPCR. El eje Y corresponde al *crossing point* (Cp; ciclo de amplificación en el cual cada dilución supera el umbral de fluorescencia). El coeficiente de correlación (R^2) determinado de cada curva fue 0,995 y 0,997, para la curva obtenida con los partidores oL97/oL98 y oL32/oL687, respectivamente.

Tabla 4. Promedio y razón del número de copias amplificadas por qPCR desde DNA genómico de los aislados de las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcfr1$. Utilizando un volumen definido de DNA genómico para cada una de las muestras (8 μ l), y las curvas de calibración indicadas en la Figura 4, se determinó el número de moléculas presentes en dicho volumen para los genes *hph* y *bcfrq1*.

| Aislados | Promedio del # de moléculas del gen <i>hph</i> | Promedio del # de moléculas del gen <i>bcfrq1</i> | Razón <i>hph/bcfrq1</i> |
|-----------------|---|--|--------------------------------|
| T2.C3.A2 | 513 | 471 | 1,08 |
| T2.C6.A3 | 533 | 521 | 1,02 |
| T3.C5.A5 | 1.275 | 997 | 1,27 |
| C6 A | 1.122 | 1.020 | 1,1 |
| C7 J | 1.099 | 1.052 | 1,04 |

7.4 Las cepas mutantes $\Delta bcfr1$ y $\Delta bcfet3$ desarrollan menos conidias en medio PDA, en comparación con la cepa B05.10.

Para determinar el fenotipo de crecimiento de la cepa mutante $\Delta bcfr1$ se usaron placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA o PDA-planta que fueron inoculadas con dicha mutante. Se utilizó además la cepa silvestre B05.10 como control. Ambas cepas fueron incubadas en condiciones de ciclo luz/oscuridad 12h/12h. Como se observa en la **Figura 5**, la cepa mutante $\Delta bcfr1$ presenta un área de desarrollo de conidias inferior al nivel de conidiación observado para la cepa silvestre B05.10. Así, la cepa $\Delta bcfr1$ muestra un halo central poco pigmentado donde la formación de conidias se ve disminuida (**Figura 5**; indicado con flechas negras sobre las zonas alteradas). Por otro lado, en medio PDA-planta no se observaron diferencias en cuanto al desarrollo de conidias o el desarrollo de otras estructuras en la cepa $\Delta bcfr1$ (datos no mostrados).

Para estudiar el desarrollo de la cepa mutante $\Delta bcfet3$, se replicaron las mismas condiciones de ciclo luz/oscuridad 12h/12h, utilizadas con la cepa $\Delta bcfr1$. La cepa $\Delta bcfet3$ mostró un retraso en la conidiación con respecto a la cepa B05.10 (**Figura 6**). Transcurridas 96 h. desde la inoculación del hongo, si bien la cepa $\Delta bcfet3$ produce conidias asexuales (**Figura 6D**), se observa una menor conidiación en comparación con la cepa B05.10 (**Figura 6C**), observándose para esta última cepa una mayor área con conidias en la placa de cultivo. En medio PDA-planta, utilizado para estimular el desarrollo de conidias, también se observó esta diferencia de 24 h de retraso en el desarrollo de éstas en la cepa $\Delta bcfet3$. Esto indica que la ausencia del gen genera una alteración en el desarrollo del ciclo asexual del hongo, considerando que la cepa B05.10 produce conidias en un menor tiempo y en toda la superficie de la placa de cultivo. Al utilizar períodos de incubación más extensos (7 y 21 días, **Figura 7**), en la cepa mutante $\Delta bcfet3$ se pudo observar la formación de estructuras densas e inicialmente blanquecinas, las que se desarrollaron en ambos medios de cultivo (**Figura 7 C, D**) contrastando claramente con el fenotipo de la cepa B05.10 (**Figura 7 A, B**). Luego de 21 días de cultivo, sólo para la cepa $\Delta bcfet3$ fue posible observar estructuras densas y altamente pigmentadas denominadas esclerocios (**Figura 7 E, F**), mientras la cepa B05.10 continua con el desarrollo del tipo asexual esperado sin formar esclerocios (**Figura 7 E**).

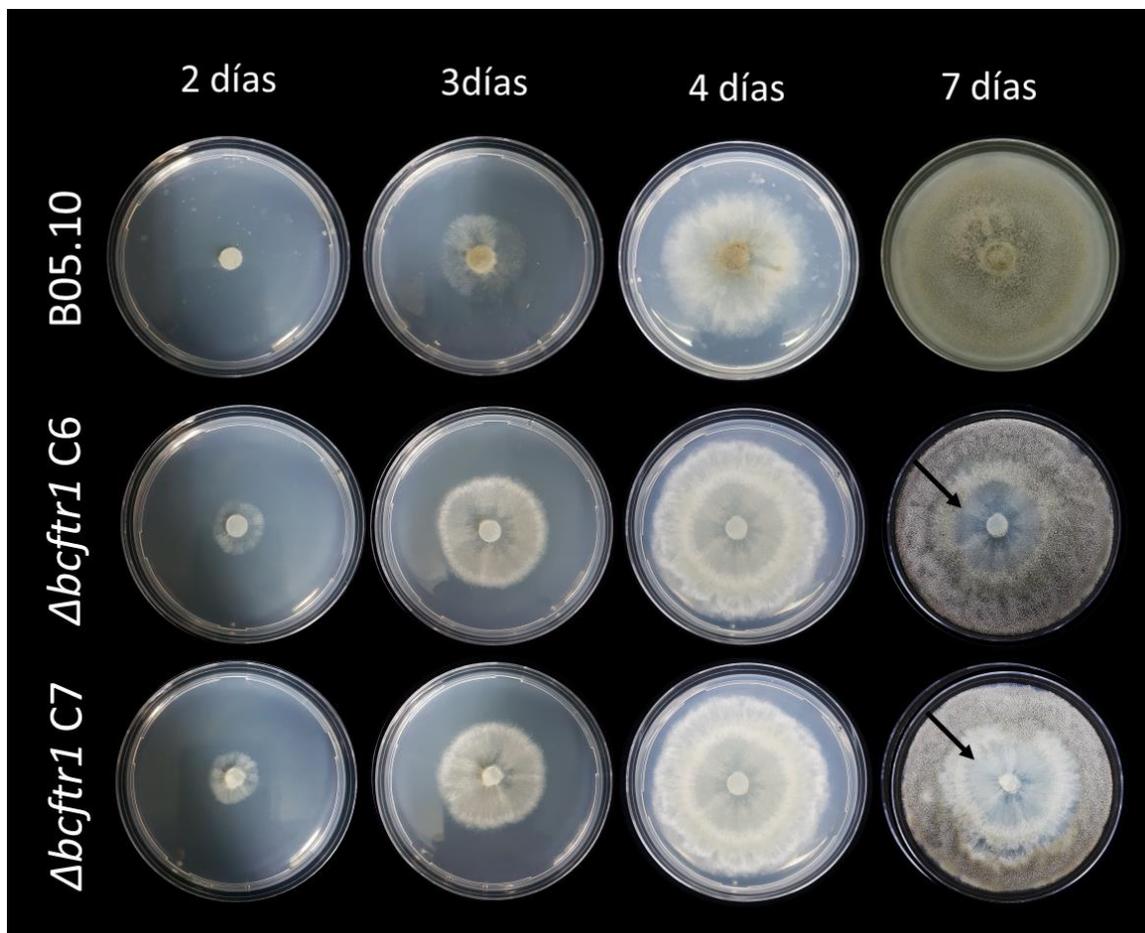


Figura 5. Caracterización fenotípica del desarrollo de conidias de la cepa mutante $\Delta bcftr1$. Micelio joven no diferenciado de las cepas B05.10 y $\Delta bcftr1$ (clones C6 y C7) fue inoculado en placas de Petri conteniendo medio PDA, registrado el crecimiento/conidiación mediante fotografías durante los primeros 7 días de desarrollo. Las flechas negras indican las zonas sin desarrollo de conidias en la cepa $\Delta bcftr1$.

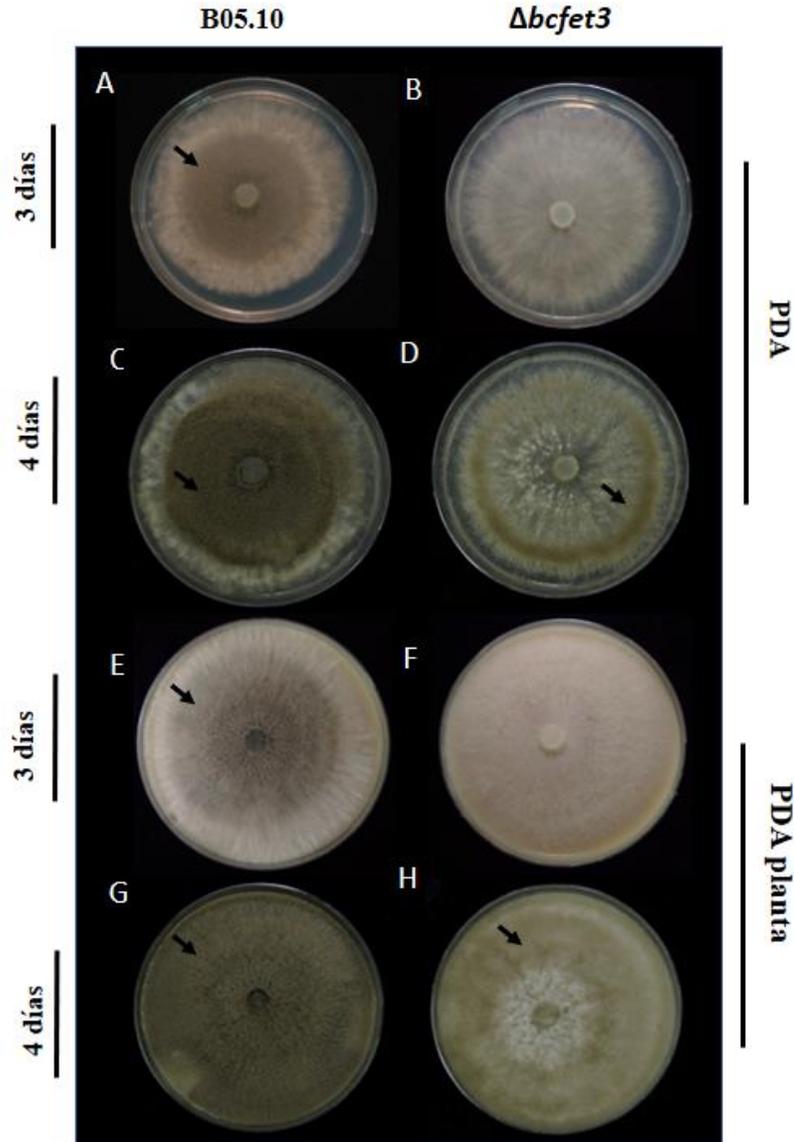


Figura 6. Caracterización fenotípica del desarrollo de conidias de la cepa mutante $\Delta bcfet3$. Las placas de Petri fueron incubadas bajo condiciones de ciclo luz: oscuridad 12h:12h a 20 °C durante 4 días. La cepa B05.10 desarrolla conidias a partir del tercer día de crecimiento, tanto en medio PDA (A,C) como en PDA-planta (E,G). La presencia de conidias de la cepa mutante $\Delta bcfet3$ en medio PDA (B,C) sólo se observa a partir del cuarto día, al igual que en medio PDA-planta (F,H). Las flechas negras sobre las placas indican la presencia de conidias.

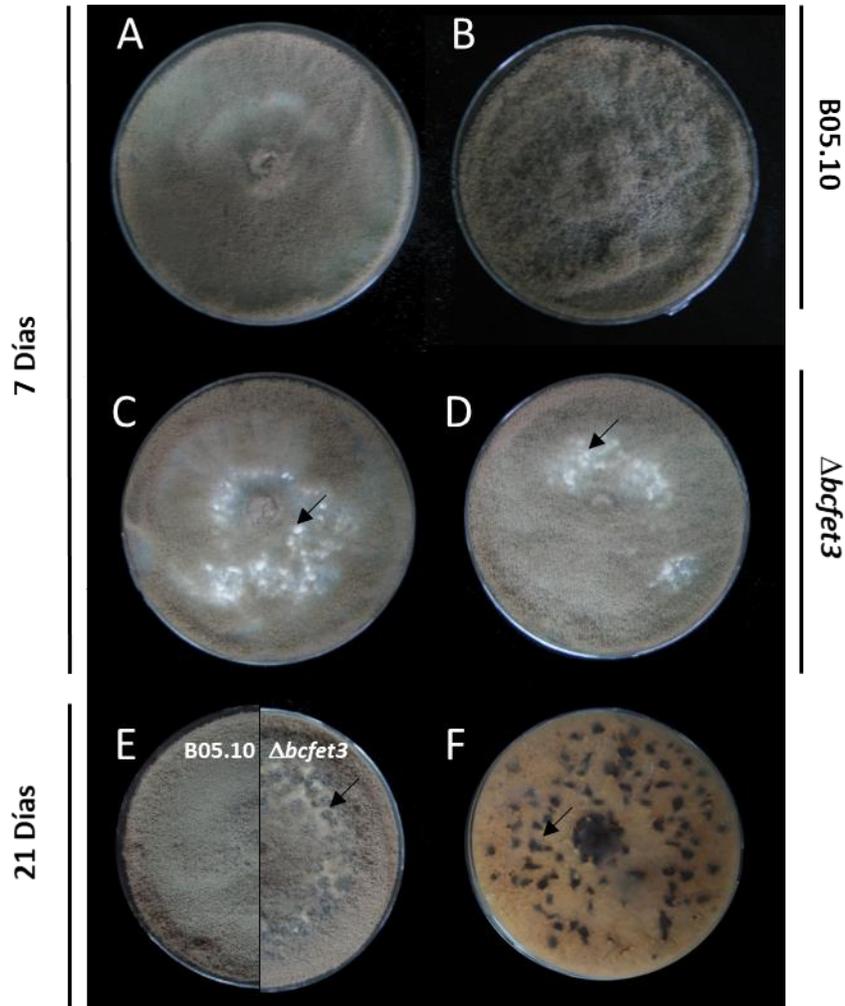


Figura 7. Caracterización fenotípica del desarrollo de esclerocios en la cepa mutante $\Delta bcfet3$ en medios PDA y PDA-planta. Se inocularon placas de Petri con la cepa mutante $\Delta bcfet3$ y la cepa B05.10. Las placas fueron incubadas a 20 °C en condiciones de ciclo de luz: oscuridad 12h:12h. En la figura se observan fotografías representativas a los 7 días post-inoculación de la cepa B05.10 en medio PDA (A) y medio PDA-planta (B), así como para la cepa mutante $\Delta bcfet3$ (C y D, respectivamente). En (E) se observa una fotografía compuesta de ambas cepas mencionadas después de 21 días de cultivo en medio PDA-planta mostrando el anverso (E) y el reverso de la placa de cultivo (F). Las flechas negras indican la presencia de esclerocios en las placas señaladas.

7.5 La formación de esclerocios en la cepa $\Delta bcfet3$ disminuye con la adición de hierro al medio de cultivo.

Para determinar si la formación de esclerocios observada para la mutante $\Delta bcfet3$ depende de la concentración de hierro, a partir de micelio no diferenciado de esta cepa se inocularon placas de Petri conteniendo medio PDA suplementadas con concentraciones crecientes de $FeCl_3$. Como se observa en la **Figura 8**, el desarrollo de esclerocios (**Figura 8A**), sufre una disminución significativa en cada condición experimental durante los primeros 10 días de cultivo (**Figura 8B**).

7.6 La cepa mutante $\Delta bcfet3$ presenta una disminución en la concentración de hierro determinada a partir de micelio total.

Como método para validar los supuestos sobre la cepa $\Delta bcfet3$ en cuanto a su capacidad para incorporar hierro, se realizó una medición cuantitativa de este metal al micelio de la cepa $\Delta bcfet3$ y B05.10. Este tejido fue tratado con ácido nítrico como se especifica en la sección de metodología para su posterior medición y análisis (en partes por millón de hierro; ver Métodos). Como se observa en la **Figura 9**, la cepa $\Delta bcfet3$ mostró diferencias significativas en el contenido total de hierro en comparación a la cepa silvestre, en medio PDA con y sin suplementar con el metal.

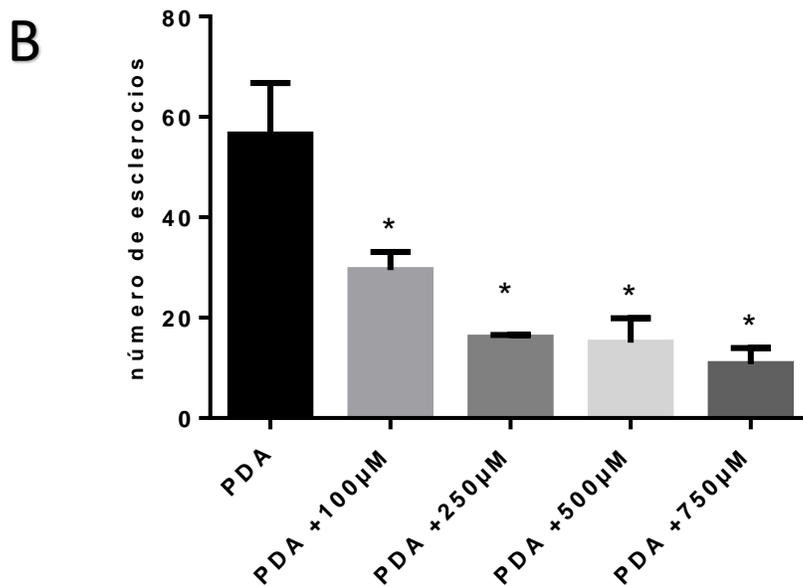
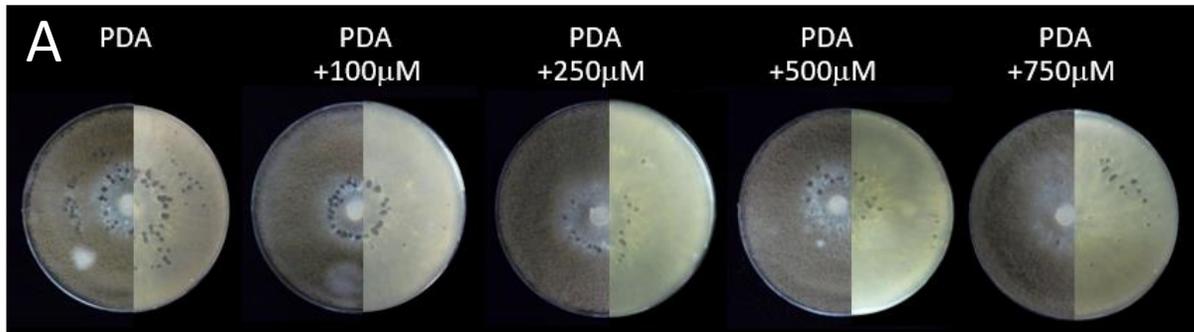


Figura 8. La mutante $\Delta bcfet3$ desarrolla esclerocios de manera dependiente de la concentración de hierro. (A) Fotografías representativas de la cepa $\Delta bcfet3$ creciendo en medio PDA estándar o suplementado con concentraciones crecientes de $FeCl_3$ (100, 250, 500 y 750 μM). La figura muestra fotografías compuestas (anverso y reverso de una placa de Petri; izquierda y derecha, respectivamente). (B) Cuantificación del número de esclerocios formados por la cepa mutante $\Delta bcfet3$ observados en (A). Las diferencias significativas respecto al control (PDA) se indican con asteriscos ($p < 0.05$).

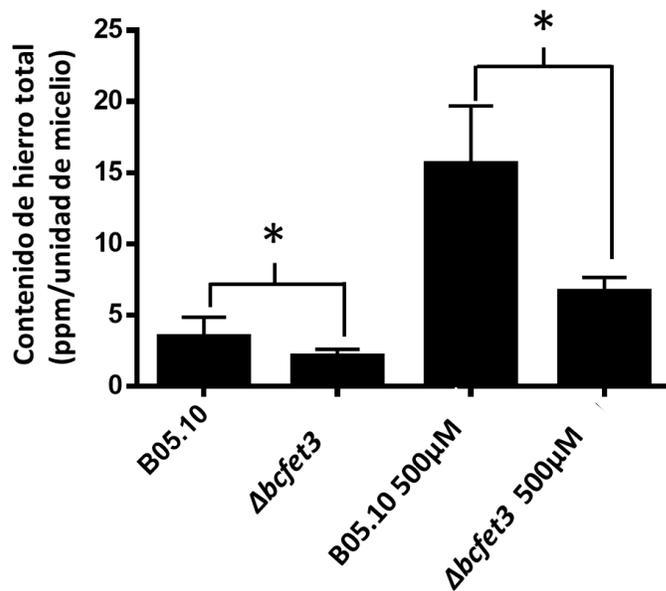


Figura 9. Cuantificación de hierro total a partir de micelio de la cepa $\Delta bcfet3$ crecida en medio PDA. La cuantificación se realizó mediante espectrometría de absorción atómica las que se llevaron a cabo en dos condiciones distintas: medio PDA no modificado y medio PDA suplementado con 500 μ M FeCl₃. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (p<0.05).

7.7 Sólo la mutante $\Delta bcfet3$ de *B. cinerea*, pero no la mutante $\Delta bcftr1$, posee un fenotipo de virulencia alterado.

Los ensayos para evaluar la capacidad infectiva de la cepa $\Delta bcftr1$ se realizaron en plantas de *A. thaliana* de cuatro semanas luego de 72 hrs post infección. Al observar el área de lesión producida por la cepa mutante $\Delta bcftr1$, no se apreciaron diferencias con la cepa silvestre B05.10 (**Figura 10A**). Para determinar esto se cuantificó el área de la lesión provocada por ambas cepas, utilizando 9 plantas por condición, infectadas de manera individual con la cepa silvestre (B05.10) y $\Delta bcftr1$, concluyendo que no hay diferencias significativas en comparación al área afectada con la cepa silvestre B05.10 (**Figura 10B**). Dado estos resultados y con propósito de entender el rol del sistema RIA de *B. cinerea* en la infección, se prosiguió con el estudio de la cepa $\Delta bcfet3$.

Para evaluar la capacidad infectiva de la cepa $\Delta bcfet3$ se realizaron ensayos en plantas de *A. thaliana* bajo las mismas condiciones que los ensayos realizados con la cepa $\Delta bcftr1$. Al observar el área de la lesión producida por la cepa mutante $\Delta bcfet3$ se observó que ésta era significativamente mayor en comparación con la lesión producida por la cepa B05.10 (**Figura 11A**). Para determinar de forma cuantitativa la diferencia entre la infección de la cepa $\Delta bcfet3$, se realizó el ensayo de infección en 9 plantas por condición, registrando las plantas 72 hrs post infección y cuantificando el área de la lesión. El área de lesión provocada por la cepa $\Delta bcfet3$ es, en promedio, un 54.1% más grande que la lesión causada por cepa la B05.10 (**Figura 11B**). Esta muestra grandes diferencias con la infección desarrollada por la cepa $\Delta bcftr1$.

Para descartar que el fenotipo de infección observado se deba a un efecto particular sobre el organismo hospedero utilizado, a pesar que *A. thaliana* es un organismo modelo para la interacción planta-patógeno (Gonzalez *et al.*,2006), se replicó el ensayo en plantas de *P. vulgaris* de 8 días de edad, las que fueron inoculadas con una solución de conidias ajustada a $2,5 \times 10^5$ conidias/ml, de igual modo que en los ensayos anteriores, evaluando a las 72 hrs post infección, registrando y cuantificando el área de la lesión. Como se observa en la **Figura 11 C, D**, al igual que en el caso del ensayo de infección realizada en *A. thaliana*, los resultados del ensayo en *P. vulgaris* muestran que la cepa $\Delta bcfet3$ es capaz de desarrollar una mayor

área de lesión que la cepa silvestre, presentando en promedio un 60.1% más de área lesionada en comparación con la cepa B05.10.

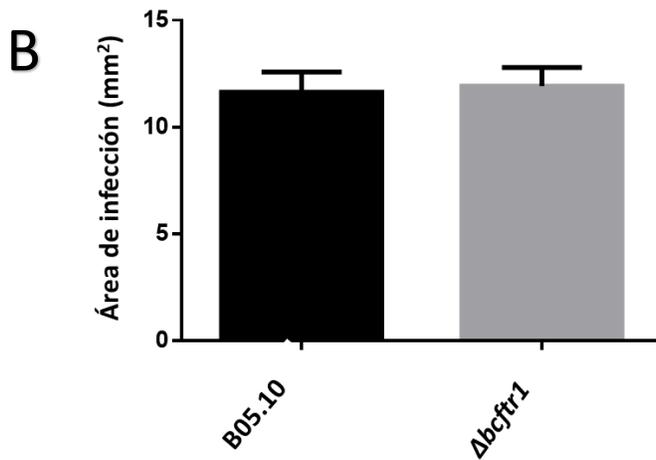


Figura 10. Ensayo de infección y cuantificación del área de la lesión provocada por la infección de la cepa $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*. A) Registro de las hojas infectadas con la cepa B05.10 (izquierda) y con la cepa $\Delta bcftr1$. El círculo rojo en las hojas indica el área lesionada. B) Cuantificación del área de la lesión provocadas por las ambas cepas en condiciones deficientes de hierro. No se encontraron diferencias significativas entre el área de lesión. Para cada ensayo se utilizaron 30 plantas por condición.

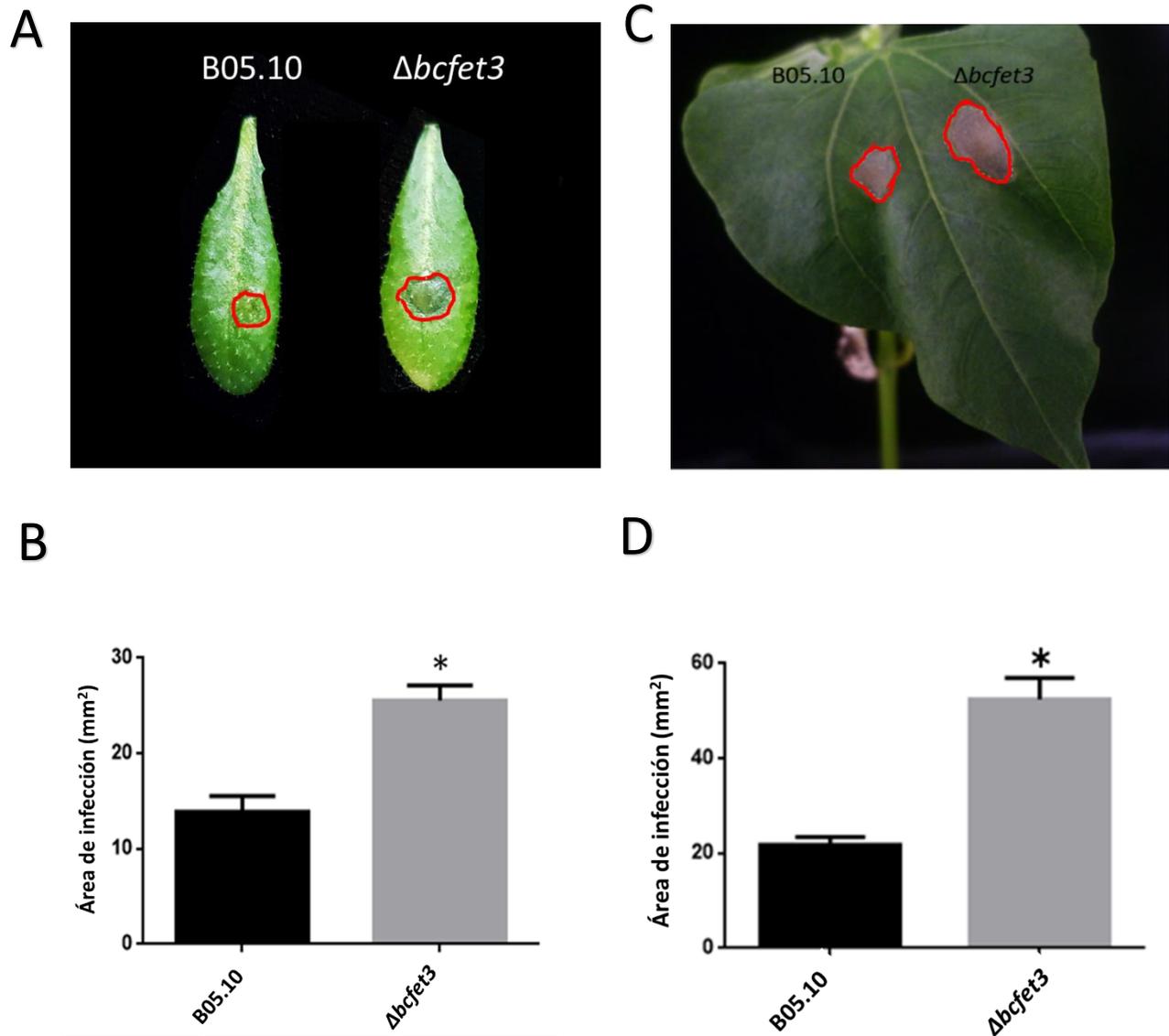


Figura 11. Ensayo de infección y cuantificación del área de la lesión provocada por la cepa $\Delta bcfet3$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* y *P. vulgaris* A) Registro de las hojas infectadas con la cepa B05.10 y $\Delta bcfet3$ en *A. thaliana*. B) Cuantificación del área de la lesión producidas por las cepas B05.10 y $\Delta bcfet3$ en *A. thaliana*. Las Diferencias significativas se indican con asterisco ($p < 0.05$). C) Registro de las hojas infectadas con la cepa B05.10 y $\Delta bcfet3$ en *P. vulgaris*. D) Cuantificación del área de la lesión producidas por las cepas B05.10 y $\Delta bcfet3$ en *P. vulgaris*. El contorno rojo sobre las hojas delimita el área de la lesión. Las diferencias significativas se indican con asterisco ($p < 0.05$). Para cada ensayo se utilizaron 30 plantas por condición.

7.8 Las lesiones causadas por las cepas mutantes $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ en *A. thaliana* disminuyen significativamente sólo en condiciones limitantes de hierro.

Para analizar la influencia del hierro en la virulencia de las cepas mutantes del sistema RIA ($\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$), se realizaron experimentos de infección utilizando plantas de *A. thaliana* obtenidas mediante cultivo hidropónico con concentración de hierro definida. Para esto, se replicó un experimento publicado por Kieu *et al.* 2012 donde se infectan con *B. cinerea* plantas de *A. thaliana* sometidas a deficiencia en hierro (ver detalles en Materiales y Métodos).

Luego de 72 hrs de la inoculación con *B. cinerea*, como se observa en la **Figura 12**, el área de infección de los grupos de plantas sin tratamiento ([Fe]⁺ (50 μ M hierro)) conservan el mismo patrón de infección observado anteriormente para ambas cepas. La cepa $\Delta bcftr1$ no mostró diferencias significativas en el área de la lesión con respecto a la cepa silvestre en condiciones de suficiencia de hierro (**Figura 12 A, B**). Sin embargo, la cepa $\Delta bcfet3$ presenta diferencias significativas con respecto a la infección de la cepa silvestre bajo condiciones de suficiencia de hierro (**Figura 12 C, D**) siendo en promedio 34,7% más grande. Por otro lado, en el grupo de plantas sometidas al tratamiento en donde se queló el metal, se observó una disminución significativa en el área de lesión causada por ambas cepas mutantes.

Una vez que las hojas fueron utilizadas para evaluar el tamaño de la lesión causada por *B. cinerea*, éstas fueron teñidas con 3'3-diaminobenzidina (DAB), reactivo que forma un precipitado de color café en los tejidos donde hay presencia de especies reactivas de oxígeno. Esto permite hacer una evaluación cualitativa del proceso de estallido oxidativo que ocurre en el tejido frente a la infección con *B. cinerea*. Adicionalmente, las hojas fueron teñidas con azul algodón, una tinción ampliamente utilizada para teñir estructuras fúngicas, con el objetivo de definir el avance del hongo sobre el tejido vegetal infectado. Como se puede observar en la **Figura 13**, el precipitado café formado en las hojas infectadas con la cepa $\Delta bcftr1$ no muestra grandes diferencias a la formación de precipitado causada por la cepa B05.10 silvestre. A diferencia de lo determinado para la cepa $\Delta bcftr1$, el precipitado observado en las hojas infectadas con la cepa $\Delta bcfet3$ (**Figura 13**) muestra una mayor área café sólo en plantas obtenidas con un régimen de suficiencia de hierro.

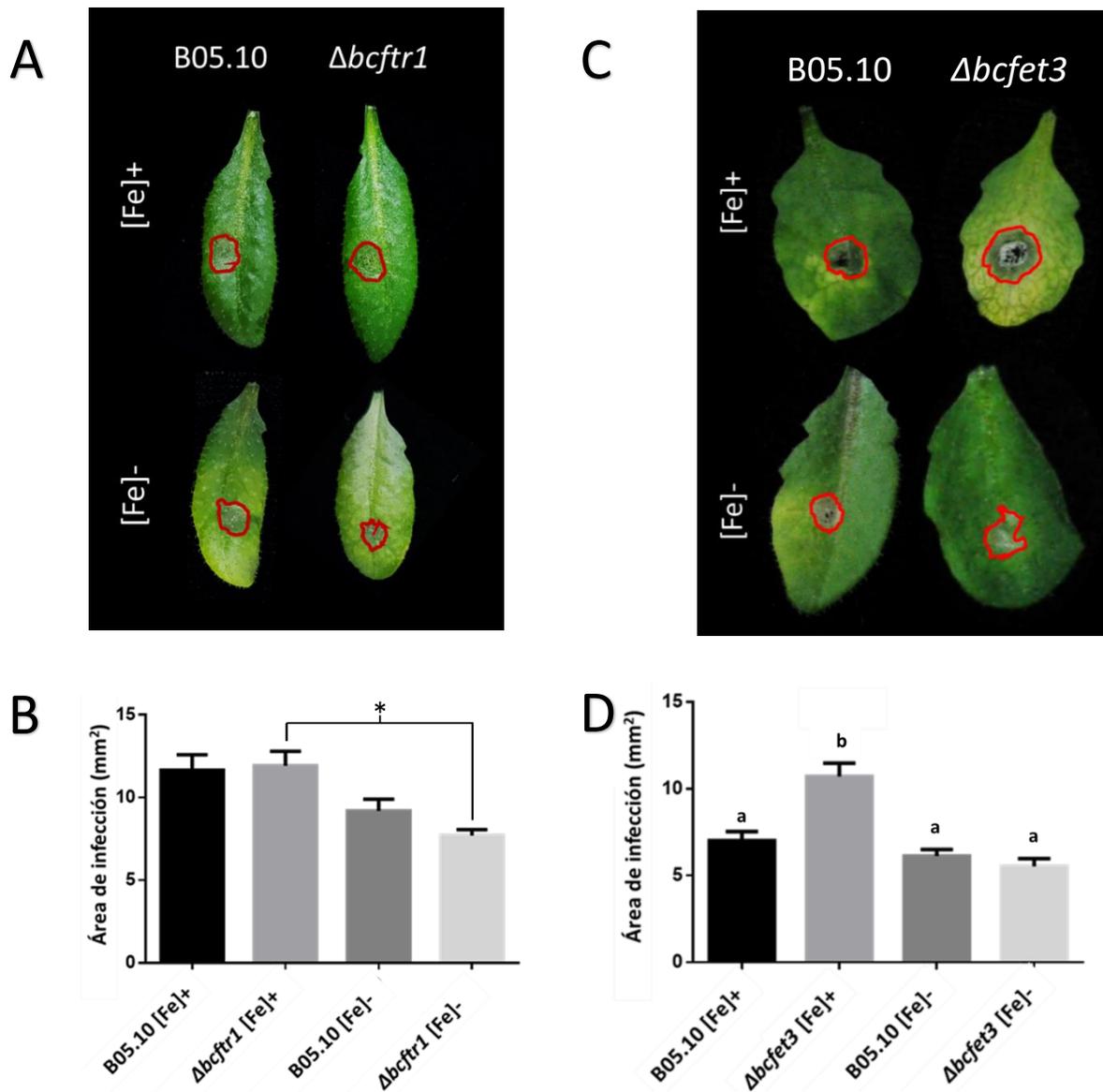


Figura 12. Ensayo de infección provocado por la infección de la cepa $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana* en condiciones deficientes de hierro. (A) registro de las hojas infectadas con la cepa B05.10 (izquierda) y con la cepa $\Delta bcftr1$. (B) Cuantificación del área de la lesión mostrado en (A). (C) Registro de las hojas infectadas con la cepa B05.10 (izquierda) y con la cepa $\Delta bcfet3$. (D) Cuantificación del área de la lesión mostrado en (C). La diferencia entre el área de la cepa $\Delta bcfet3$ en condiciones suficientes de hierro, es significativamente superior a la cepa control ($p < 0.05$). El contorno rojo en las hojas indica el área lesionada. [Fe]⁺ representa condiciones suficientes de hierro y [Fe]⁻ representa condiciones limitantes de hierro. Todos los ensayos se realizaron en 5 plantas por condiciones analizando al menos 6 hojas. Los asteriscos en el gráfico B representan diferencias significativas en los grupos comparados del mismo modo que las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos comparados en el gráfico D.

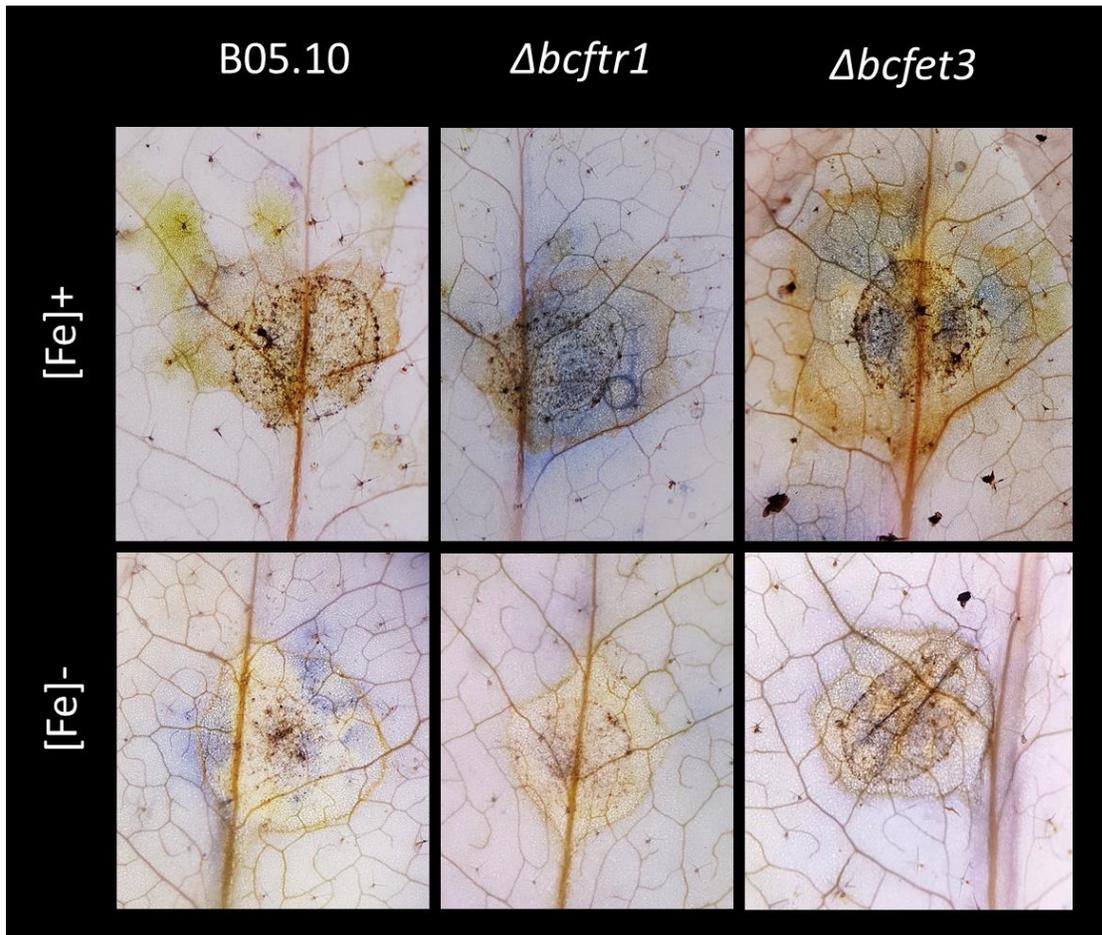


Figura 13. Hojas de *A. thaliana* infectadas con la cepa $\Delta bcftr1$ y $\Delta bcfet3$ de *B. cinerea*. Mediante tinción DAB y azul algodón, se determinó la formación de un precipitado café (indicativo de ROS) y el avance del hongo, respectivamente. Se muestran las lesiones provocadas por la cepa B05.10 al lado izquierdo, en el centro la cepa $\Delta bcftr1$ y a la derecha, las lesiones generadas por la cepa $\Delta bcfet3$. La simbología [Fe]+ señala la condición suficiente de hierro y [Fe]- condiciones limitantes. Las tinciones se realizaron en nueve hojas por condición, evaluadas 72 horas post-inoculación.

8. Discusión

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio el hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Si bien el hierro y los sistemas de captación de este metal han sido descritos como moduladores de la capacidad de infección de distintos patógenos y fitopatógenos, incluyendo diversos hongos, los sistemas de captación de hierro en *B. cinerea* no han sido estudiados (Canessa y Larrondo, 2013). Por esta razón, se desconoce si este metal puede modular la virulencia de este importante fitopatógeno. La metodología utilizada en esta tesis nos permitió estudiar si el micronutriente hierro juega un papel en el proceso de infección de *B. cinerea*. Para esto, se generaron cepas del tipo *knock-out* para los genes que conforman el principal sistema de incorporación de alta afinidad de hierro, el que se denomina RIA (del inglés, *Reductive Iron Assimilation*). Además, utilizando *A. thaliana* obtenidas en medios hidropónicos, sometimos las plantas a dos concentraciones contrastantes del metal, para realizar infecciones posteriormente.

En la base de datos del genoma de *B. cinerea* los genes ortólogos a *fet3* y *ftr1* de *S. cerevisiae* no se encuentran anotados como tales, sino sólo identificados como modelos génicos. De hecho, el gen *bcfet3* se encuentra incorrectamente anotado como una oxidasa multicobre tipo lacasa (denominada BcLcc13). Estas enzimas oxidan compuestos fenólicos, y no Fe^{2+} . Tampoco hay reportes ni estudios de otros sistemas de captación de hierro en *B. cinerea*, salvo un antiguo reporte en donde se determina la producción de sideróforos (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988). Sin embargo, dentro del reino Fungi, los distintos mecanismos de captación de hierro se encuentran conservados y descritos en diversas especies (Phillpott, 2006), por lo que es de esperar que en *B. cinerea* se conserven algunos de estos sistemas. Los resultados aquí presentados sugieren fuertemente que *B. cinerea* posee un sistema homólogo al RIA originalmente descrito en *S. cerevisiae*. Los productos de los genes identificados, denominados BcFet3 y BcFtr1, no sólo muestran un alto porcentaje de identidad de secuencia superior al 40% en comparación con sus ortólogos en *S. cerevisiae*, sino además, presentan motivos conservados en las secuencias de distintos sistemas canónicos de incorporación de hierro en otros hongos (Knight *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006; Canessa y Larrondo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Adicionalmente, análisis filogenéticos no publicados de nuestro laboratorio permiten afirmar que el genoma de *B. cinerea* codifica para

14 oxidasas multicobre, siendo BcFet3 la única ferroxidasa tipo MCO identificada, mientras que las restantes 13 MCOs codificarían para lacasas. Estas enzimas se encuentran ampliamente conservadas en varios reinos, incluyendo el Fungi (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013), siendo descritas como relevante en los procesos infectivos de *B. cinerea* (Claus, 2017).

La falta de estudios relacionados al metabolismo y captación de hierro en *B. cinerea* plantea interesantes interrogantes si consideramos que, por un lado, este micronutriente juega un importante papel en los procesos infectivos de distintos patógenos fúngicos (Eichhorn *et al.*, 2006; Eliahu *et al.*, 2007; Verbon *et al.*, 2017) y que, además, participa de la respuesta de defensa en plantas, en donde estos organismos cuando se ven enfrentados a un patógeno, modifican la captación y movilización del metal como ha sido descrito en plantas de *A. thaliana* infectadas con una bacteria necrotrófica (Segond *et al.*, 2009; Maurer, Müller y Bauer, 2011; Aznar *et al.*, 2015).

Frente al ataque de patógenos necrotróficos, *A. thaliana* induce varias vías de señalización para la síntesis de fitohormonas involucradas en la respuesta a este tipo de patógenos. La producción de ácido jasmónico ha sido reportada como la principal hormona encargada de inducir la respuesta de defensa ante necrótrofos, lo que provoca entre otras cosas la disminución en la captura de hierro desde la rizosfera por parte de la planta, estrategia de defensa que busca disminuir la cantidad de hierro que el patógeno potencialmente pueda adquirir durante la infección (Maurer, Müller y Bauer, 2011; Verbon *et al.*, 2017). Considerando esto, si se infecta con un organismo necrotrófico deficiente en la incorporación de hierro, en plantas crecidas en un régimen suficiente de dicho metal, se podría sugerir que el resultado de la lesión provocada por la infección de la cepa deficiente en la incorporación de hierro sea igual o menor que la cepa silvestre.

Los resultados presentados en esta tesis contrastan con lo observado en otros hongos patógenos mutantes en alguno de los componentes del sistema RIA. Por ejemplo, en el caso de *U. maydis* y *C. heterostrophus*, patógenos específicos de maíz (Eichhorn *et al.*, 2006; Eliahu *et al.*, 2007) se ha observado que en ausencia del sistema RIA, estos organismos presentan dificultades en el desarrollo de la infección, mostrando una disminución en los síntomas o una reducción en el área de la lesión causada. En el caso de *C. albicans*, una levadura patógena de mamíferos se ha observado que el desarrollo del proceso infectivo se

ve significativamente limitado en ausencia del gen *ftr1* (Ramanan y Wang, 2000). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el fenotipo de desarrollo de la cepa $\Delta bcfet3$ está relacionada con la disminución en la incorporación de hierro determinado en el medio de cultivo, mostrando una interesante y compleja situación de explicar, ya que, se presenta un organismo fitopatógeno que es deficiente en la captación de hierro cuando crece como saprófito (en placas de cultivo), pero que cuando se desarrolla como un fitopatógeno, posee una ventaja frente a la cepa silvestre. Al evaluar la lesión necrótica causada por las cepas $\Delta bcftr1$ y $\Delta bcfet3$, la primera mostró un nivel de infección (medido como área de lesión) equivalente al de la cepa B05.10. Por el contrario, la cepa $\Delta bcfet3$ mostró un fenotipo hipervirulento en las dos especies vegetales analizadas. Si consideramos que el metal es crucial para distintos procesos infectivos (Aznar *et al.* 2015; Verbon *et al.* 2017), en ambas mutantes se estaría compensado la falta del sistema RIA mediante un sistema alternativo de incorporación de hierro, ya que cuando se realiza la infección con ambas mutantes en condiciones de suficiencia de metal, no disminuye el área de lesión causada.

Por otro lado, las cepas mutantes para los genes *bcfet3* y *bcftr1* presentan marcados y diferentes fenotipos en medio de cultivo en comparación a la cepa silvestre B05.10, lo que también difiere a lo descrito en los organismos fúngicos antes mencionados, donde, por ejemplo, no se reporta la producción de estructuras de sobrevivencia como los esclerocios observados en la cepa $\Delta bcfet3$. El desarrollo de estas estructuras en condiciones de fotoperiodo 12h:12h luz: oscuridad contrasta fuertemente con lo observado con la cepa B05.10, la que desarrolla esclerocios normalmente sólo en oscuridad bajo condiciones ambientales desfavorables (Williamson, Tudzynski, 2007). La formación de estructuras de sobrevivencia a tiempos tempranos de crecimiento, como lo observado en esta tesis, sugiere que la mutante $\Delta bcfet3$ se encuentra altamente estresada y/o activando un mecanismo de protección por la carencia del micronutriente. Sin embargo, la formación de estas estructuras bajo condiciones de ciclo luz: oscuridad puede ser estimulada por la falta de nutrientes, desecación del medio o inclusive estrés oxidativo (Georgiou *et al.*, 2006; Erental, Dickman y Yarden, 2008).

En *S. cerevisiae*, las proteínas Fet3 y Ftr1 interactúan físicamente a nivel citoplasmático, formando un complejo proteico inicial para luego migrar a la membrana

plasmática de manera conjunta (Singh *et al.*, 2006), lo que claramente ejemplifica su alta interdependencia funcional. De esta forma, en *S. cerevisiae* se ha descrito que la ausencia de la proteína Ftr1 provoca una disminución en la migración de Fet3 hacia la membrana, acumulándose una fracción de ésta en compartimientos citoplasmáticos. De igual forma, en ausencia de Fet3, también se observa una migración parcial de Ftr1 a la membrana (Singh *et al.*, 2006).

Considerando la interdependencia funcional que al menos ha sido descrito para el RIA de *S. cerevisiae*, para las cepas $\Delta bcfr1$ y $\Delta bcfet3$, como mutantes del mismo sistema ortólogo de captación de hierro, se esperaba un fenotipo de desarrollo miceliar o de infección similar. Si bien ambas cepas muestran una disminución en el desarrollo de conidias, sólo la cepa $\Delta bcfet3$ desarrolla esclerocios. Además, si bien no determinamos los niveles de hierro total en la cepa $\Delta bcfr1$, los resultados obtenidos sugieren que la cepa $\Delta bcfet3$ se encuentra en un estado de mayor estrés que la cepa $\Delta bcfr1$, lo que sugiere un menor déficit nutricional para esta última cepa en comparación con la mutante $\Delta bcfet3$. En *Aspergillus fumigatus*, la mutación de genes que participan de la ruta de síntesis de sideróforos genera una disminución en la formación de conidias. No obstante, a diferencia de lo observado para *B. cinerea*, las mutantes de *A. fumigatus* exhiben un crecimiento retardado en comparación con la cepa silvestre (Hass, 2012).

Para tratar de entender cómo la mutante $\Delta bcfet3$ puede provocar las diferencias en la infección observadas, se evaluó la presencia de especies reactivas de oxígeno en el tejido vegetal infectado con el hongo. La presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) gatilla una serie de respuestas tanto en el hongo como en el organismo hospedero, modulando la interacción de ambos (Aznar *et al.*, 2015). Además, la formación de ROS está directamente relacionada con la presencia de hierro en las zonas afectadas, induciendo estallido oxidativo e implicando movimientos de las fuentes de hierro en células vegetales, junto con la activación de sistemas antioxidantes del hongo (Tenberge *et al.*, 2002; Aznar *et al.*, 2015; Abuqamar *et al.*, 2017; López-Cruz *et al.* 2017).

Considerando lo anterior, determinamos que el área donde hay precipitado indicativo de ROS en la cepa $\Delta bcfet3$ es mayor que el observado para la cepa silvestre e inclusive que el determinado para $\Delta bcfr1$. Esto concuerda con la generación de una mayor área de lesión,

observando además un área con generación de ROS disminuida en plantas con baja cantidad de hierro. El aparente aumento en la formación de precipitado en la lesión provocada por la cepa $\Delta bcfet3$ indica que ésta no pareciera ser más sensible a la cantidad de ROS, ya que logra desarrollarse e infectar más tejido que la cepa silvestre, sugiriendo que, bajo condiciones de infección la cepa $\Delta bcfet3$ no tiene dificultadas para incorporar el metal ni sensibilidad al estrés oxidativo como se ha observado y modelado computacionalmente en hongos carentes de parte de la ruta de biosíntesis de sideróforos en el género *Aspergillus* (Eisendle *et al.*, 2006; Brando *et al.* 2015).

Las diferencias en los fenotipos de infección determinados para las mutantes de *B. cinerea* obtenidas en esta tesis nos sugieren fuertemente que existen posibles mecanismos compensatorios inducidos para incorporar el metal dado que, al menos en condiciones de suficiencia de hierro, no se ve disminuida el área de infección en ninguna de las cepas mutantes analizadas. Si bien es posible hipotetizar que la cepa $\Delta bcfet3$ podría tener una ventaja para capturar hierro bajo condiciones nutricionales suficientes durante la infección, en condiciones de desarrollo saprófito determinamos una disminución en los niveles totales de hierro. Sin embargo, esta disminución no puede ser extrapolada a la situación de infección.

¿Por qué la cepa $\Delta bcfet3$ genera mayor área de lesión sobre el tejido vegetal y no así la mutante $\Delta bcftr1$? Una alternativa, para explicar los fenotipos de infección, es considerar que las cepas $\Delta bcfet3$ y $\Delta bcftr1$ no son deficientes en la incorporación de hierro, dado que ninguna de las dos cepas mutantes presenta un fenotipo de infección disminuido y, por el contrario, la cepa $\Delta bcfet3$ tiene un fenotipo de infección exacerbado. Considerando que la proteína Fet3 es una oxidasa multicobre, la cual posee tres sitios de unión a este metal (Blackburn *et al.*, 2000), en *S. cerevisiae* se ha reportado que la apoproteína Fet3 no es capaz de ensamblarse ni migrar a la membrana como complejo Fet3/Ftr1 sin la activación mediada por la donación de un átomo de cobre (Singh *et al.*, 2006) por parte de la ATPasa transportadora de cobre denominada CCC2 (Yuan *et al.*, 1995). El ortólogo de este gen en *B. cinerea* ha sido denominado *bcccc2*, y es requerido para la incorporación de cobre. Interesantemente, la mutante $\Delta bcccc2$ no muestra ser deficiente en la incorporación de hierro (Saitoh *et al.*, 2010), lo que sugiere fuertemente que el hongo estaría capturando el metal utilizando un mecanismo independiente de Fet3.

Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en otras especies fúngicas es posible constatar que existe un cierto patrón en los mecanismos de incorporación de hierro que inducen distintos hongos patógenos, el que está estrechamente relacionado con el tipo de estrategia de infección utilizada. Así, la incorporación de sideróforos es favorecida en organismos fitopatógenos con estrategias de infección necrotrófica como *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum* u otros patógenos oportunistas de mamíferos que son capaces de destruir la célula hospedera como *A. fumigatus* (Tsai *et al.*, 1999; Schrettl *et al.*, 2004; Greenshields *et al.*, 2007; Condon *et al.*, 2014). Por otra parte, en organismos biotróficos y hemibiotróficos, los que a diferencia de los primeros requieren de la célula hospedera viva para su sobrevivencia en etapas iniciales de desarrollo (Greenshields, Liu y Wei, 2007), se ha visto que requieren de la incorporación de hierro mediante el sistema RIA, siendo el caso de *Colletotricum graminicola*, *Ustilago maydis*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Ramanan y Wang 2000; Eichhorn *et al.*, 2006; Eliahu *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008). Esta diferencia en la preferencia de un sistema u otro se relaciona con la capacidad de estos sistemas de disputar el hierro en las condiciones de infección, ya que como se ha mencionado el sistema RIA está anclado a la membrana, para incorporar el micronutriente en la frontera de la membrana plasmática del hongo. En cambio, dado que los sideróforos son secretados al medio extracelular en búsqueda de quelar hierro, esto permitiría formar complejos hierro-sideróforos en las zonas adyacentes a la lesión (Greenshields, Liu y Wei, 2007).

Alternativamente, componentes accesorios del sistema RIA podrían estar involucrados en el fenotipo exacerbado de infección. La proteína Fet3, para realizar su actividad enzimática, requiere de Fe^{2+} el que en *S. cerevisiae* es suministrado por la ferredoxina de membrana FRE1 (Yuan *et al.*, 1995). Si bien hasta ahora no hemos analizado funcional ni genéticamente ninguna de estas proteínas en *B. cinerea*, en el genoma de este hongo hemos identificado dos genes que codificarían para ferredoxinas, codificando uno de ellos para una ferredoxina hipotética de membrana. En ausencia de *bcfet3*, esta ferredoxina reduciría Fe^{3+} a Fe^{2+} , desplazándose el equilibrio químico del metal hacia la forma reducida al no estar presente BcFet3 (ferredoxina), lo que generaría la producción de una molécula mucho más reactiva y soluble que su estado oxidado. El Fe^{2+} al

ser más soluble y reactivo, en el contexto oxidativo de la defensa de la planta, podría reaccionar con el H_2O_2 , presente en las células, induciendo un mayor estallido oxidativo que la cepa silvestre y la cepa $\Delta bcfr1$, favoreciéndose la reacción de Fenton sobre el tejido vegetal. Esta situación no ocurriría en la cepa $\Delta bcfr1$ ya que, si bien proteína BcFet3 se encontraría parcialmente en la membrana (Singh *et al.*, 2006), el equilibrio redox del metal estaría desplazado hacia la forma oxidada.

Finalmente, para facilitar entender el contexto y las reacciones que ocurren durante captación de hierro mediante el sistema de incorporación RIA de *B. cinerea* a nivel de membrana, se generó un modelo de trabajo que representa supuestos e hipótesis de trabajo futuro generados a partir de los resultados obtenidos en esta tesis (Figura 14).

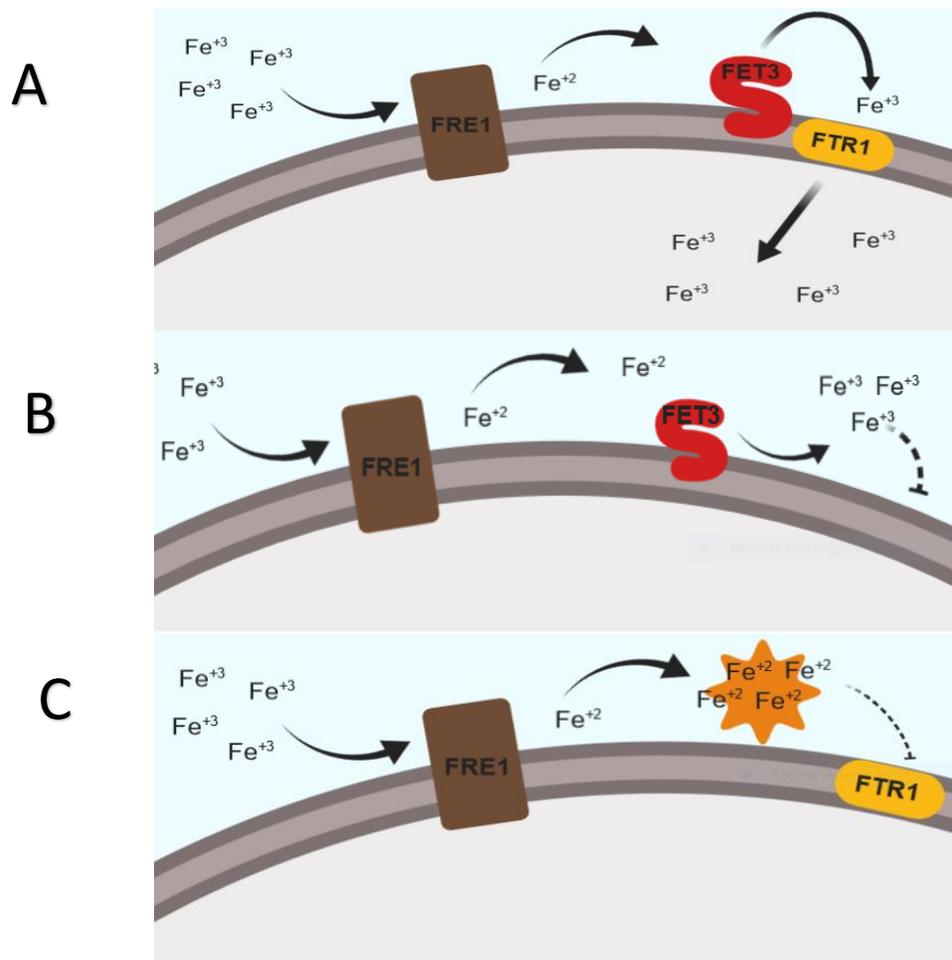


Figura 14. Modelo de trabajo generado a partir de los resultados obtenidos en esta tesis. Se representa un esquema del mecanismo de captación de hierro mediante el sistema incorporación RIA en *B. cinerea*. El sistema de captación de RIA anclado a la membrana del hongo está compuesto por tres proteínas que poseen dominios transmembrana, las que normalmente funcionan como se muestra en la parte A) de la figura, representando el contexto en la membrana para la cepa silvestre de *B. cinerea*, basado en lo descrito para *S. cerevisiae*. Según esto, la ferreductasa FRE1, reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} el que es posteriormente oxidado por la proteína FET3 para su incorporación al medio intracelular por la permeasa de hierro, FTR1. En B) se representa el contexto supuesto para la cepa mutante $\Delta bcfr1$, donde las reacciones por parte del sistema RIA acaban con la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por FET3, dado la falta de la permeasa de hierro. Finalmente, en C) se muestra el escenario propuesto que podría explicar los resultados obtenidos en esta tesis para la cepa mutante $\Delta bcfet3$, donde la actividad de la ferreductasa, FRE1, no estaría alterada, desplazándose el equilibrio químico del metal hacia su forma reducida (Fe^{2+}), dado que éste no estaría oxidado por la ferroxidasa FET3, aumentando el potencial de generar estrés oxidativo en el tejido.

9. Conclusiones

En esta tesis se presenta la caracterización de dos cepas mutantes de *B. cinerea*. Estas corresponden a las mutantes en los genes *bcfet3* y *bcftr1* del sistema de alta afinidad de captación de hierro. A partir de su estudio se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La eliminación de gen *bcftr1* en el genoma de *B. cinerea* provoca un fenotipo de desarrollo no característico del hongo, evidenciando una disminución en el desarrollo de conidias en medio PDA. Esta cepa mutante desarrolla lesiones necróticas de forma similar a la cepa silvestre solamente en condiciones de suficiencia de hierro.
- Por su parte, la eliminación de gen *bcfet3* en el genoma de *B. cinerea* genera un fenotipo alterado, retrasando el desarrollo de esporas asexuales, observándose estructuras de sobrevivencia bajo condiciones de fotoperiodo que reprimen este tipo de desarrollo.
- La formación de esclerocios de la cepa $\Delta bcfet3$ disminuye en concentraciones crecientes de hierro, lo que sugiere que la mutante presenta un déficit en la captación del metal, en medio PDA.
- La lesión necrótica causada por la mutante $\Delta bcfet3$ es significativamente más grande a la causada por la cepa silvestre. Si bien no hemos determinado los niveles de hierro de la cepa mutante durante la infección de plantas de *A. thaliana*, la lesión causada por ambas mutantes del sistema RIA permiten demostrar que *B. cinerea* requiere hierro para llevar a cabo un proceso infeccioso exitoso, y que en ausencia del sistema RIA, compensa utilizando un mecanismo que no hemos identificado.

10. Referencias

- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 262-274.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Albarouki, E., & Deising, H. B. (2013). Infection structure-specific reductive iron assimilation is required for cell wall integrity and full virulence of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(6), 695-708.
- Amselem, J., Cuomo, C. A., Van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., ... & Fournier, E. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal *pathogens Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS genetics*, 7(8), e1002230.
- Askwith, C., & Kaplan, J. (1997). An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 401-405.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., ... & Kaplan, J. (1994). The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*, 76(2), 403-410.
- Aznar, A., Patrit, O., Berger, A., & Dellagi, A. (2015). Alterations of iron distribution in *Arabidopsis* tissues infected by *Dickeya dadantii*. *Molecular plant pathology*, 16(5), 521-528.
- Basta N.T. 2004. Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: Implications on metal bioavailability and sustainable land application. In: Sustainable land application Conference, January 4-8, Florida; University of Florida.
- Berg, L. V. D., & Lentz, C. P. (1968). The effect of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, 46(12), 1477-1481.
- Bidartondo, M. I. (2005). The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist*, 167(2), 335-352.
- Blackburn, N. J., Ralle, M., Hassett, R., & Kosman, D. J. (2000). Spectroscopic analysis of the trinuclear cluster in the Fet3 protein from yeast, a multinuclear copper oxidase. *Biochemistry*, 39(9), 2316-2324.
- Booth, C. (1971). Chapter II Fungal Culture Media. In *Methods in microbiology* (Vol. 4, pp. 49-94). Academic Press.

- Brandon, M., Howard, B., Lawrence, C., & Laubenbacher, R. (2015). Iron acquisition and oxidative stress response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC systems biology*, 9(1), 19.
- Brock, T. D., & Gustafson, J. O. H. N. (1976). Ferric iron reduction by sulfur-and iron-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(4), 567-571.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2763–2788.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B., & Ward, C. G. (2005). Iron and infection: the heart of the matter. *Pathogens and Disease*, 43(3), 325-330.
- Camaschella, C. (2015). Iron-deficiency anemia. *New England Journal of Medicine*, 372(19), 1832-1843.
- Canessa P, Schumacher J, Hevia MA, Tudzynski P, Larrondo LF (2013) Assessing the Effects of Light on Differentiation and Virulence of the Plant Pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the White-Collar Complex. *PLoS ONE* 8(12): e84223.
- Canessa, P., & Larrondo, L. F. (2013). Environmental responses and the control of iron homeostasis in fungal systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 939-955.
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*, 20(9), 2380.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS microbiology letters*, 277(1), 1-10.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., Hieter, P., 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119–122.
- Claus, H. (2017). Laccases of *Botrytis cinerea*. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 339-356). Springer, Cham.
- Condon, B. J., Oide, S., Gibson, D. M., Krasnoff, S. B., & Turgeon, B. G. (2014). Reductive iron assimilation and intracellular siderophores assist extracellular siderophore-driven iron homeostasis and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 793-808.
- Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio Protoc*, 2(18), e263-e263.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial siderophores exert a subtle role in Arabidopsis during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant physiology*, *150*(4), 1687-96.
- Doss, R. P., Deisenhofer, J., von Nidda, H. A. K., Soeldner, A. H., & McGuire, R. P. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, *63*(6), 687-691.
- Droby, S., and Lichter, A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infections: etiology, development and management. Pages 349-367 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., ... & Blumentritt, M. (2011). The plant cell wall–decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science*, *333*(6043), 762-765.
- Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Müller, D., Illmer, P., & Haas, H. (2006). The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, *5*(10), 1596-1603.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M. and Stewart, A. (2015) Plant hosts of *Botrytis spp.* In: *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (Fillinger, S. and Elad, Y., eds.), pp. 413–486. Berlin: Springer
- Elad, Y., Pertot, I., Prado, A. M. C., & Stewart, A. (2016). Plant hosts of *Botrytis spp.* In *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 413-486). Springer, Cham.
- Eliahu, N., Igbaria, A., Rose, M. S., Horwitz, B. A., & Lev, S. (2007). Melanin biosynthesis in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* depends on two mitogen-activated protein kinases, Chk1 and Mps1, and the transcription factor Cmr1. *Eukaryotic cell*, *6*(3), 421-429.
- Erental, A., Dickman, M. B., & Yarden, O. (2008). Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a “Dormant” structure. *Fungal Biology Reviews*, *22*(1), 6-16.
- Fenton, H. J. H., & Jackson, H. J. (1899). I.—The oxidation of polyhydric alcohols in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, *75*, 1-11.
- Ferramola, M. S., Benuzzi, D., Calvente, V., Calvo, J., Sansone, G., Cerutti, S., & Raba, J. (2013). The use of siderophores for improving the control of postharvest diseases in stored fruits and vegetables. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science* (pp. 1385-1394). Technology and Education. Formatex Research Center Spain.

- Fisher, M. C., Henk, D. a, Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–94. Nature Publishing Group.
- Gammella, E., Recalcati, S., & Cairo, G. (2016). Dual role of ROS as signal and stress agents: iron tips the balance in favor of toxic effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., & Zervoudakis, G. (2006). Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and comparative Biology*, 46(6), 691-712.
- Gerwien, F., Skrahina, V., Kasper, L., Hube, B., & Brunke, S. (2017). Metals in fungal virulence. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux050.
- Gerwien, F., Skrahina, V., Kasper, L., Hube, B., & Brunke, S. (2017). Metals in fungal virulence. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux050.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Yeast Protocol*, 107-120.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4), 355-360.
- Gonzalez, J., Reyes, F., Salas, C., Santiag, M., Codriansky, Y., Coliheuque, N., & Silva, H. (2006). Arabidopsis thaliana: A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of Botrytis cinerea. *Biological Research*, 39(2), 221-228.
- Greenshields, D. L., Liu, G., & Wei, Y. (2007). Roles of iron in plant defence and fungal virulence. *Plant signaling & behavior*, 2(4), 300-302.
- Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J. I. E., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full Fusarium graminearum virulence. *Molecular plant pathology*, 8(4), 411-421.
- Grenier, A.-M., Duport, G., Pagès, S., Condemine, G., & Rahbé, Y. (2006). The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1956–1965.
- Haas, H. (2012). Iron—a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology*, 3, 28.
- Hassett, R. F., Yuan, D. S., & Kosman, D. J. (1998). Spectral and Kinetic Properties of the Fet3 Protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a Multinuclear Copper Ferroxidase Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23274-23282.

- Hevia, M. A., Canessa, P., & Larrondo, L. F. (2016). Circadian clocks and the regulation of virulence in fungi: Getting up to speed. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 57, pp. 147-155). Academic Press.
- Holz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In *Botrytis: Biology, pathology and control capitulo* (pp. 9-27). Springer Netherlands.
- Howard, D. H. (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 394-404.
- Jickells, T. D., An, Z. S., Andersen, K. K., Baker, A. R., Bergametti, G., Brooks, N., ... & Kawahata, H. (2005). Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. *science*, 308(5718), 67-71.
- Jones, G.S. (2005) What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59, 1–6.
- Jones, K., Jenkinson, C. B., Araújo, M. B., Zhu, J., Kim, R. Y., Kim, D. W., & Khang, C.H. (2016). Mitotic stopwatch for the blast fungus *Magnaporthe oryzae* during invasion of rice cells. *Fungal Genetics and Biology*, 93, 46-49.
- Jones, K., Jenkinson, C. B., Araújo, M. B., Zhu, J., Kim, R. Y., Kim, D. W., & Khang, C. H. (2016). Mitotic stopwatch for the blast fungus *Magnaporthe oryzae* during invasion of rice cells. *Fungal Genetics and Biology*, 93, 46-49.
- Joska, T. M., Mashruwala, A., Boyd, J. M., & Belden, W. J. (2014). A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *Journal of microbiological methods*, 100, 46-51.
- Jung, W. H., Sham, A., Lian, T., Singh, A., Kosman, D. J., & Kronstad, J. W. (2008). Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS pathogens*, 4(2), e45.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A., & Van Kan, J. A. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal*, 43(2), 213-225.
- Kars, Ilona, and Jan AL van Kan. "Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of Botrytis." *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer Netherlands, (2007). 99-118.
- Kevin R, O., Vo, K. T., Michaelis, S., & Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic acids research*, 25(2), 451-452.
- Knight, S. A., Vilaire, G., Lesuisse, E., & Dancis, A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and immunity*, 73(9), 5482-5492.

Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Huschka, H. G., & Winkelmann, G. (1988). Isolation and identification of the principal siderophore of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Biology of Metals*, 1(2), 90-98.

Kraepiel Y, Pédrón J, Patrit O, Simond-Côte E, Hermand V, Van Gijsegem F (2011) Analysis of the Plant bos1 Mutant Highlights Necrosis as an Efficient Defence Mechanism during *D. dadantii*/*Arabidopsis thaliana* Interaction. PLoS ONE 6(4): e18991.

Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Szekeres, A., Manczinger, L., & Nagy, E. (2004). Protease over-production in the presence of copper by a *Trichoderma harzianum* strain with biocontrol potential. *Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs IOBC/wprs Bulletin*, 27(8), 373-374.

Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Szekeres, A., Manczinger, L., & Nagy, E. (2004). Protease over-production in the presence of copper by a *Trichoderma harzianum* strain with biocontrol potential. *Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs IOBC/wprs Bulletin*, 27(8), 373-374.

Kues, U., & Ruhl, M. (2011). Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes-what for? *Current genomics*, 12(2), 72-94.

Khush, G.S. (2005) What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59, 1–6.

Labbé, S., Peña, M. M., Fernandes, A. R., & Thiele, D. J. (1999). A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36252-36260.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

Larrondo, L. F., Canessa, P., Melo, F., Polanco, R., & Vicuna, R. (2007). Cloning and characterization of the genes encoding the high-affinity iron-uptake protein complex Fet3/Ftr1 in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology*, 153(6), 1772-1780.

Latorre, B. A., Spadaro, I., & Rioja, M. E. (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21(10), 957-961.

Leck, A. (1999). Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health*, 12(30), 24.

Li, Y., Wang, Z., Liu, X., Song, Z., Li, R., Shao, C., & Yin, Y. (2016). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for the dimorphic fungus *Nomuraea rileyi* conidiation, dimorphism transition, resistance to oxidative stress, pigmented microsclerotium formation, and virulence. *Frontiers in microbiology*, 7, 931.

- Liu, S., Ziegler, J., Zeier, J., Birkenbihl, R. P., & Somssich, I. E. (2017). Botrytis cinerea B05. 10 promotes disease development in Arabidopsis by suppressing WRKY33-mediated host immunity. *Plant, cell & environment*, 40(10), 2189-2206.
- López-Cruz, J., Óscar, C. S., Emma, F. C., Pilar, G. A., & Carmen, G. B. (2017). Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces Botrytis cinerea virulence in Arabidopsis and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Molecular plant pathology*, 18(1), 16-31.
- LV, X., Zheng, F., Li, C., Zhang, W., Chen, G., & Liu, W. (2015). Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 67.
- Lyon, G. D., Goodman, B. A., & Williamson, B. (2007). *B. cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 119-141). Springer Netherlands.
- 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(3), 359-366.
- 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(3), 359-366.
- Maurer, F., Müller, S., & Bauer, P. (2011). Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(5), 530-536.
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science*, 7(8), 352-356.
- Morrissey, J. A., Williams, P. H., & Cashmore, A. M. (1996). Candida albicans has a cell-associated ferric-reductase activity which is regulated in response to levels of iron and copper. *Microbiology*, 142(3), 485-492
- Müller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K. L., Hause, G. & Abel, S. (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental cell*, 33(2), 216-230.
- Nishida, S., Aisu, A., & Mizuno, T. (2012). Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, 7(3), 329-331.
- Noda J, Brito N, Espino JJ, Gonzalez C: Methodological improvements in the expression of foreign genes and in gene replacement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. 2007, 8: 811-816. 10.1111/j.1364-3703.2007.00432. x.

- Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schönbeck, F., & Weber, A. (2012). Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier.
- Oldenburg KR, Vo KT, Michaelis S, Paddon C (1997) Recombination- mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* 25: 451–452.
- Pande, S., Stevenson, P., Rao, J. N., Neupane, R. K., Chaudhary, R. N., Grzywacz, D., ... & Kishore, G. K. (2005). Reviving chickpea production in Nepal through integrated crop management, with emphasis on *Botrytis* gray mold. *Plant Disease*, 89(12), 1252-1262.
- Park, R. F., Burdon, J. J., Guest, D. I., & Ayliffe, M. J. (2009). Dynamics of crop-pathogen interactions: from gene to continental scale. *Applied crop physiology: at the boundaries with genetic improvement and agronomy*. Elsevier, London, UK, 423-447.
- Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta (bba)-molecular cell research*, 1763(7), 636-645.
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 90.
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), 67-82.
- Roncero, C. (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current genetics*, 41(6), 367-378.
- Rutherford, J. C., & Bird, A. J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic cell*, 3(1), 1-13.
- Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2016). Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberry in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant Disease*, 100(10), 2087-2093.
- Saitoh, Y., Izumitsu, K., Morita, A., & Tanaka, C. (2010). A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(1), 33-43.
- Schothorst, J., Zeebroeck, G. V., & Thevelein, J. M. (2017). Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transeptors for activation of the PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 4(3), 74.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., ... & Haas, H. (2004). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1213-1219.

Schumacher, J. (2012). Tools for *Botrytis cinerea*: new expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal genetics and biology*, 49(6), 483-497.

Schumacher, J., & Tudzynski, P. (2012). Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. In *Morphogenesis and pathogenicity in fungi* (pp. 225-241). Springer, Berlin, Heidelberg.

Schweikert, C., Liskay, A., & Schopfer, P. (2002). Polysaccharide degradation by Fenton reaction-or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry*, 61(1), 31-35.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., & Expert, D. (2009). NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, 58(2), 195-207.

Severance, S., Chakraborty, S., & Kosman, D. J. (2004). The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochemical Journal*, 380(2), 487-496.

Shi, X., Stoj, C., Romeo, A., Kosman, D. J., & Zhu, Z. (2003). Fre1p Cu²⁺ reduction and Fet3p Cu¹⁺ oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50309-50315.

Shpialter, L., David, D. R., Dori, I., Yermiahu, U., Pivonia, S., Levite, R., & Elad, Y. (2009). Cultural methods and environmental conditions affecting gray mold and its management in *lisianthus*. *Phytopathology*, 99(5), 557-570.

Silviera M.L.A., L.R.F. Alleoni, and L.R.G. Guilherme. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola* 60 (4): 793-806.

Singh, A., Severance, S., Kaur, N., Wiltsie, W., & Kosman, D. J. (2006). Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p- Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13355-13364.

Smolke: Protocols/Yeast Colony PCR. (2013, May 22). *OpenWetWare*, Retrieved 19:40, November 10, 2018 from https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Smolke:Protocols/Yeast_Colony_PCR&oldid=699084.

Snyder, B. S., Patterson, G. S., Abrahamson, A. J., & Holm, R. H. (1989). Binuclear iron system ferromagnetic in three oxidation states: synthesis, structures, and electronic aspects of molecules with a Fe₂(OR)₂ bridge unit containing Fe(III, III), Fe(III, II), and Fe(II, II). *Journal of the American Chemical Society*, 111(14), 5214-5223.

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7), 2563-2606.

- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D., & Dancis, A. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*, 271(5255), 1552-1557.
- Tenberge, K. B., Beckedorf, M., Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M., & von den Driesch, M. (2002). In situ localization of AOS in host-pathogen interactions. *Microscopy and Microanalysis*, 8(S02), 250-251.
- Tsai, H. F., Wheeler, M. H., Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (1999). A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6469-6477.
- van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science*, 11(5), 247-253.
- van Kan, J. A., Stassen, J. H., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A., Faino, L., Farmer, A. D., & Edel, D. (2017). A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*, 18(1), 75-89.
- Verbon, E. H., Trapet, P. L., Stringlis, I. A., Kruijs, S., Bakker, P. A., & Pieterse, C. M. (2017). Iron and immunity. *Annual review of phytopathology*, 55.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., & Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell*, 14(6), 1223-1233.
- Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. (2015). *The fungi*. Academic Press, capitulo 8, Cardiff University, Cardiff, UK, Pp 245-292.
- Weinberg, E. D. (2009). Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(7), 600-605.
- Yuan, D. S., Stearman, R., DANcIs, A. N. D. R. E. W., Dunn, T., Beeler, T., & Klausner, R. D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2632-2636.